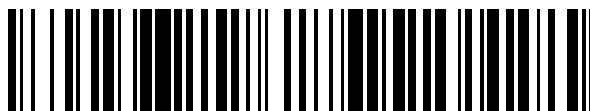


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 100**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61K 31/337 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2010** **PCT/US2010/031197**
87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010** **WO10121000**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010** **E 10765167 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019** **EP 2419732**

54 Título: **Composiciones de nanopartículas exentas de priones y métodos**

30 Prioridad:

28.08.2009 US 238052 P
15.04.2009 US 169665 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US

72 Inventor/es:

DESAI, NEIL P.;
PEYKOV, VIKTOR y
SOON-SHIONG, PATRICK

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 100 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

Composiciones de nanopartículas exentas de priones y métodos

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a composiciones exentas de priones que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y fármacos sustancialmente insolubles en agua, a métodos de prepararlas y a métodos de utilizar las mismas.

ANTECEDENTES

- 10 Las enfermedades priónicas, también conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs, por sus siglas en inglés), son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales y transmisibles. Ejemplos específicos de TSE incluyen tembladera, que afecta a las ovejas y las cabras, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, por sus siglas en inglés), la encefalopatía transmisible del visón, la encefalopatía espongiforme felina y la enfermedad degenerativa crónica (CWD, por sus siglas en inglés). En seres humanos, las enfermedades de TSE pueden presentarse como kuru (temblor de miedo), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, por sus siglas en inglés), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS, por sus siglas en inglés), insomnio fatal y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD, por sus siglas en inglés). La vCJD surgió en seres humanos como resultado de la epidemia de BSE en Gran Bretaña y probablemente es provocada por el consumo de productos alimenticios derivados de ganado infectado con BSE o "enfermedad de las vacas locas." (Will et al. (1996) Lancet 347:921-925) Debido a que el período de incubación de la enfermedad contraída por vía oral puede ser superior a 20 años en seres humanos, la verdadera incidencia de vCJD puede no manifestarse durante muchos años.

- 20 Además de la ingestión de productos infectados de origen bovino, la transfusión de sangre y el trasplante de órganos representan otro modo de transmisión de vCJD entre seres humanos (Brown et al. (1998) Transfusion 38:810-816; Diringier et al. (1984) Archives of Virology 82:105-109; Manuelidis et al. (1978) Nature 271:778-779). Desde mediados de la década de 1990 se plantearon importantes preocupaciones de que vCJD se puede transmitir a través de transfusiones de sangre u otros productos de la sangre de individuos infectados con TSE. Estos individuos pueden ser asintomáticos durante la larga fase preclínica y de incubación de vCJD, y la sangre obtenida de dichos donantes puede transmitir la enfermedad a las personas que reciben la sangre o los productos de la sangre derivados del donante.

- 30 Hasta el momento, hay al menos cuatro casos humanos reseñados de vCJD por transfusión de sangre en el Reino Unido. De 64 personas que recibieron sangre entera de 22 donantes, 4 personas desarrollaron vCJD. En la primera incidencia, el receptor enfermó 7 años después de recibir glóbulos rojos del donante que permaneció siendo asintomático y solo mostró signos de vCJD hasta 3 años después de la donación (Llewelly et al. (2004) Lancet 363:417-421). En la segunda incidencia, el donante murió de vCJD dos años después de la donación, y el receptor murió de un aneurisma (no vCJD) 5 años después de la donación (Peden et al. (2004) Lancet 364:527-529). En la autopsia del receptor, PrPsc estaba presente en los ganglios linfáticos y el bazo, pero no en el cerebro. En la tercera incidencia, el receptor murió de vCJD siete años y medio después de la transfusión de un donante que desarrolló vCJD 20 meses después de la donación (Wroe et al. (2006) Lancet 368:2061-2067). El cuarto incidente ocurrió en un receptor ocho años y medio después de una transfusión del mismo donante en el tercer caso (Informe de Protección de la Salud de la Agencia de Protección de la Salud, (2007) Vol 1, N° 3, 26. Disponible de: <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2007/news2007/news0307.htm>).

- 40 Una característica común de todas las enfermedades priónicas es la conversión de la proteína priónica celular normal (PrPc, por sus siglas en inglés) en una isoforma anormal (PrPsc, por sus siglas en inglés). Se cree que la diferencia entre PrPc y PrPsc es puramente conformacional, teniendo PrPc principalmente estructuras alfa-helicoidales y teniendo PrPsc principalmente láminas beta que con frecuencia se ensamblan para formar agregados. PrPsc actúa como un molde para inducir a las moléculas de proteínas normales a convertirse en la misma isoforma anormal, que a su vez convierte más PrPc en PrPsc (Prusiner et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13363-13383). Este proceso autocatalítico conduce a la formación exponencial de agregados neurotóxicos de PrPsc (Aguzzi et al. (2007) Nat Rev Mol. Cell Biol. 8:552-561). Ligandos de proteínas priónicas y sus usos se han descrito en los documentos WO04/050851, WO06/010915, WO04/090102 y WO06/044459. "PRDT Prion Reduction technology", ProMetic Biosciences, 2009 ([http://www.prometicbiosciences.com/assets/files/2009-02-09 PRDT brochure-pdf](http://www.prometicbiosciences.com/assets/files/2009-02-09_PRDT_brochure-pdf)) describe un método para separar priones de albúmina de suero comercial.

- 55 Estudios han demostrado que la aparición más temprana de infectividad priónica en la sangre puede ocurrir durante la fase temprana del período de incubación de la enfermedad (Brown et al. (2006) Blood infectivity in the transmissible spongiform encephalopathies. Capítulo 4 En: Turner ML, ed. 95-118). Debido a que puede pasar mucho tiempo antes del brote de los síntomas de la enfermedad, los individuos silenciosamente infectados aún pueden considerarse donantes de sangre activos y sanos. Además, algunos individuos pueden estar infectados de forma permanente o transitoria sin desarrollar la enfermedad. Por lo tanto, es difícil, si no imposible, garantizar que las fuentes de sangre para los productos derivados de la sangre estén exentas de priones.

Composiciones de nanopartículas a base de albúmina se han desarrollado como un sistema de administración de fármacos para administrar fármacos sustancialmente insolubles en agua. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s 5.916.596; 6.506.405; 6.749.868 y 6.537.579 y también en las Publicaciones de Patente de EE.UU. N°s 2005/0004002 y 2007/0082838. La tecnología de nanopartículas basada en albúmina utiliza las propiedades naturales únicas de la proteína albúmina para transportar y administrar fármacos sustancialmente insolubles en agua al sitio de la enfermedad. Estas nanopartículas se incorporan fácilmente en los procesos de transporte propios del cuerpo y son capaces de explotar la atracción de los tumores a la albúmina, permitiendo el suministro de concentraciones más altas del fármaco activo al sitio diana. Además, la tecnología de nanopartículas basada en albúmina ofrece la capacidad de mejorar la solubilidad de un medicamento al evitar la necesidad de productos químicos tóxicos, tales como disolventes, en el proceso de administración, mejorando así potencialmente la seguridad a través de la eliminación de efectos secundarios relacionados con el disolvente.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:

a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, y

b) separar una proteína priónica de dicha mezcla, en donde dicha separación comprende:

1) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y

2) separar de dicha mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo; y

en el que el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

La presente invención proporciona también un método de separar una proteína priónica de una composición de la que se sospecha que contiene una proteína priónica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:

a) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y

b) separar de la composición el ligando y las proteínas unidas al mismo; y en el que el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

La presente invención proporciona también una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

En una realización, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, y en donde el taxano es paclitaxel, docetaxel u ortataxel.

En una realización, en donde el ligando es un péptido.

En una realización, el péptido es DVR, YVHEA, AMN31, SYA o D4.

En una realización, el ligando es un compuesto basado en triazina.

En una realización, en donde el ligando es un anticuerpo que reconoce una proteína priónica.

En una realización, el anticuerpo es 3F4, 6H4, 16A18, ICSM-4 o ICSM-10.

En una realización, el ligando es un material polimérico que se une a una proteína priónica.

En una realización, el material polimérico comprende un grupo amino, un grupo fenilo o una cadena principal de metacrilato.

En el contexto de la presente invención, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

También se describen en esta memoria composiciones de nanopartículas exentas de priones (tales como composiciones farmacéuticas). En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición es estéril. En algunos ejemplos, la composición es estéril filtrable. En algunos ejemplos, la composición comprende, además, un soporte farmacéuticamente aceptable.

En algunos ejemplos, la composición tiene menos de aproximadamente 100 fg/ml de proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica menor que aproximadamente 10 UI-ic/ml. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica menor que aproximadamente 1 DL₅₀/ml.

En algunos ejemplos, la composición no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo de amplificación cíclica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA, por sus siglas en inglés). En algunos ejemplos, la composición no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo IPCR. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 10 UI-ic/ml y no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo de PMCA. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 10 UI-ic/ml y no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo de IPRC.

Las composiciones descritas en esta memoria están generalmente exentas en esencia de PrPsc. En algunos ejemplos, la composición está también sustancialmente exenta de PrPc. En algunos ejemplos, la relación molar de PrPsc y PrPc en la composición no es mayor que aproximadamente 1:1, tal como no mayor que aproximadamente uno cualquiera de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 o 1:100000.

La composición descrita en esta memoria en algunas realizaciones contiene una cantidad (por ejemplo una cantidad traza) de sustancias introducidas durante un proceso de separación de priones. Una composición de la invención que comprende nanopartículas comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica, comprende una cantidad (por ejemplo, una cantidad traza) de un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende una cantidad (por ejemplo, una cantidad traza) de un material de soporte (tal como un material de soporte descrito en esta memoria, incluyendo una resina). En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende una cantidad de una resina PRDT (por ejemplo una cantidad traza de una resina PRDT). En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende una cantidad de una resina DVR (por ejemplo una cantidad traza de una resina DVR).

En algunos ejemplos, el nivel de un estabilizador de albúmina en la composición es menor que una composición, en donde la albúmina no ha sido eliminada mediante un proceso de separación de priones. Estos estabilizadores de albúmina incluyen, por ejemplo, triptofanato de N-acetilo y caprilato de sodio.

En algunos ejemplos, la composición es bioequivalente a una composición en donde la albúmina no ha sido eliminada mediante un proceso de separación de priones.

En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el proceso de separación de priones comprende, además, separar dicho ligando y proteínas unidas al mismo de dicha composición de albúmina.

En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende: a) poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica para provocar la formación de un complejo entre el ligando y una proteína priónica, y b) separar el complejo de la composición inicial.

En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es un producto derivado de la sangre. En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es una composición de albúmina preparada a partir de un fluido corporal (tal como sangre). En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina sérica humana.

El ligando puede unirse a un material de soporte, que incluye, por ejemplo, columna, perla, matriz, filtro y membrana.

También se describen en esta memoria métodos de producir composiciones de nanopartículas exentas de priones. Por ejemplo, en esta memoria se describe un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que contiene dicho fármaco farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, dispersado en un disolvente orgánico, a una condición de alto cizallamiento, en el que la albúmina se obtuvo por un método que comprende separar una proteína priónica de una composición de albúmina inicial. En esta memoria se describe también un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, dispersado en un disolvente orgánico, a una condición de alto cizallamiento, en el que la albúmina se obtuvo por un método que comprende poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica.

En algunos ejemplos descritos en esta memoria se encuentra un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) separar una proteína priónica de una composición de albúmina inicial; b) someter una mezcla que comprende una solución que comprende la albúmina separada de priones y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento. En algunos ejemplos descritos en esta memoria se encuentra un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica para provocar la formación de un complejo entre el ligando y una proteína priónica, b) separar el complejo de la composición de albúmina inicial; y c) someter una mezcla que comprende una solución que comprende la albúmina separada de priones y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento.

En algunos ejemplos descritos en esta memoria se encuentra un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) poner en contacto una solución de albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, b) separar de la solución de albúmina el ligando y proteínas unidas al mismo, y c) someter una mezcla que comprende dicha solución de albúmina y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento. En algunas realizaciones, la mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos.

Los priones se pueden separar durante la formación de las nanopartículas. Por ejemplo, se describe un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) poner en contacto una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el método comprende, además: b) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunas realizaciones, el método comprende, además c) someter la mezcla a una condición de alto cizallamiento. En algunas realizaciones, la mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos.

Las proteínas priónicas también se pueden separar después de la formación de la composición de nanopartículas. Por ejemplo, en esta memoria se describe también un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende poner en contacto una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en el que la mezcla ha sido sometida a una condición de alto cizallamiento antes de entrar en contacto con el ligando. En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, y b) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el método comprende, además: c) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunos ejemplos, la mezcla está sustancialmente exenta de tensioactivos.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para separar una proteína priónica de una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) determinar la presencia o ausencia de una proteína priónica en la composición, b) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, y c) separar de la composición el ligando y las proteínas unidas al mismo- en donde el agente farmacológicamente activo es como se proporciona en esta memoria.

También se proporcionan composiciones hechas por métodos proporcionados en esta memoria. También se describen en esta memoria métodos de utilizar las composiciones exentas de priones descritas en esta memoria. Por ejemplo, en esta memoria se describe un método para administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. También se describe en esta memoria un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer), que comprende administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, en el que la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica.

También se describe en esta memoria un método para administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, en el que la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el proceso de separación de priones comprende, además, separar dicho ligando y proteínas unidas al mismo de dicha composición de albúmina. En algunos ejemplos, se proporciona un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer), que comprende administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la albúmina en la composición se obtuvo por un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica.

También se describen kits y formas de dosificación (tales como viales, por ejemplo viales sellados) que comprenden las composiciones de nanopartículas exentas de priones descritas en esta memoria y kits útiles para los métodos descritos en esta memoria. Se describen, además, sistemas (que incluyen aparatos) para llevar a cabo uno o más métodos descritos en esta memoria.

Estos y otros aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la subsiguiente descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas. Ha de entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en esta memoria pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona transferencias Western y geles SDS-PAGE de resina DVR enriquecidos con 0,01% y 0,005% de homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera en albúmina al 20% o 25%. AMN31 fue la resina de control positivo. La señal observada fue la fracción unida. "-PK" y "+PK" designan la ausencia o presencia de digestión con Proteinasa K.

La Figura 2 proporciona transferencias Western y geles SDS-PAGE de resinas YVHEA y SYA enriquecidos con 0,01% y 0,005% de homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera en albúmina al 20% o 25%. AMN31 fue la resina de control positivo. La señal observada fue la fracción unida. "-PK" y "+PK" designan la ausencia o presencia de digestión con Proteinasa K.

La Figura 3 proporciona transferencias Western y geles SDS-PAGE de resina D4 enriquecidos con 0,01% y 0,005% de homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera en albúmina al 20% o 25%. AMN31 fue la resina de control positivo. La señal observada fue la fracción unida. "-PK" y "+PK" designan la ausencia o presencia de digestión con Proteinasa K.

La Figura 4 representa el esquema de flujo del proceso para la separación de TSE por parte de la columna de resina de reducción de priones (columna PRDT (siglas inglesas de tecnologías de separación de patógenos y de diagnóstico) para albúmina al 20%.

La Figura 5 muestra un perfil de cromatografía de la tanda intensificada en el estudio de eliminación de TSE por parte de la columna PRDT para albúmina al 20%.

La Figura 6 muestra la prueba de interferencia de transferencia Western de solución de albúmina al 20% con centrifugación (con y sin concentración de 10 veces).

La Figura 7 representa el esquema de flujo del proceso para la separación de TSE por parte de la columna de resina de reducción de priones (columna PRDT) para albúmina al 25%.

La Figura 8 muestra un perfil de cromatografía de la tanda intensificada en el estudio de separación de TSE por parte de la columna PRDT para albúmina al 25%.

La Figura 9 muestra la prueba de interferencia de transferencia Western de solución de albúmina al 25% con centrifugación (con y sin concentración de 10 veces).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones exentas de priones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua y métodos para preparar composiciones exentas de priones.

- 5 Se describen en esta memoria composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica.

10 En una realización, la presente invención proporciona un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:

a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, y

b) separar una proteína priónica de dicha mezcla, en donde dicha separación comprende:

1) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y

- 15 2) separar de dicha mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo; y

en el que el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona un método de separar una proteína priónica de una composición de la que se sospecha que contiene una proteína priónica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:

a) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y

b) separar de la composición el ligando y las proteínas unidas al mismo; y

- 25 en el que el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

- 30 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.

También se describe en esta memoria un método de utilizar una composición exenta de priones (tal como composiciones farmacéuticas) que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua.

- 40 También se describen kits y formas de dosificación (tales como viales, por ejemplo viales sellados) que comprenden las composiciones de nanopartículas exentas de priones descritas en esta memoria y kits y sistemas (incluidos aparatos) útiles para los métodos descritos en esta memoria.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en esta memoria incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

- 45 Se entiende que el aspecto y las realizaciones de la invención descritas en esta memoria incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente" en aspectos y realizaciones.

Composiciones de nanopartículas exentas de priones

- 50 Se describe en esta memoria una composición (tal como una composición farmacéutica) que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición

es estéril. En algunos ejemplos, la composición es estéril filtrable. En algunos ejemplos, la composición comprende, además, un soporte farmacéuticamente aceptable.

En algunos ejemplos, una proteína priónica no puede detectarse en la composición mediante un método de detección que tiene una sensibilidad de detección de aproximadamente 100 fg/ml o superior, es decir, el resultado del test es negativo en un ensayo que utiliza un método que tiene una sensibilidad de detección de aproximadamente 100 fg/ml o superior (por ejemplo, una sensibilidad de detección de aproximadamente 50 fg/ml, aproximadamente 10 fg/ml, aproximadamente 1 fg/ml, aproximadamente 0,1 fg/ml). El contenido de priones en la composición se puede determinar directamente a partir de la composición. Alternativamente, la composición puede procesarse antes de la determinación, por ejemplo, concentrarse o enriquecerse para facilitar la detección y cuantificación de la proteína priónica en la composición.

Una forma de determinar si una composición está sustancialmente exenta o no de una proteína priónica es el ensayo de infectividad in vivo. Por ejemplo, la infectividad in vivo puede demostrarse mediante la inoculación de la composición de ensayo en modelos de ratón, visón, hámster o cabra. La infectividad se puede determinar por la dosis letal (DL50), es decir, la dosis que cuando se administra por una ruta dada (tal como por vía intracerebral) induce la enfermedad en el 50% de los animales expuestos. Alternativamente, la infectividad puede determinarse por unidades infecciosas, es decir, la dosis infecciosa mínima capaz de transmitir la enfermedad a un animal experimental a otro por una ruta dada. Generalmente, 100 UI-ic/ml (unidad infecciosa determinada por vía intracerebral) corresponde a aproximadamente 10 DL50/ml y 1 pg/ml de proteína priónica.

Otro método para determinar una proteína priónica en la composición es la reacción en cadena de la inmunopolimerasa (IPCR, por sus siglas en inglés), una técnica mediante la cual la capacidad de amplificación exponencial de la PCR se acopla a la detección de proteínas por anticuerpos en un formato ELISA y se aplica en un método IPCR en tiempo real modificado para detectar niveles ultra-bajos de proteína priónica. Véase Barletta et al., J. Virology Method, 127 (2005):154-104. Utilizando la IPCR, se detectó consistentemente PrPc de hámster recombinante a 1 fg/ml y se detectaron homogeneizados del cerebro de hámster infectados con tembladera digeridos con proteinasa K (PK) diluidos a 10^{-8} (aproximadamente 10-100 unidades infecciosas) con una respuesta de dosis semicuantitativa.

En algunos ejemplos, la proteína priónica en la composición se determina por amplificación cíclica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA, por sus siglas en inglés). Este método se ha utilizado para detectar PrPsc en la sangre. Otros métodos adecuados para determinar una proteína priónica en la composición incluyen, pero no se limitan a: ELISA sándwich cuantitativo utilizando tecnología de fluorescencia mejorada por disociación resuelta en el tiempo; exploración confocal fluorescente de doble color; inmunoensayo dependiente de conformación (CDI, por sus siglas en inglés). La transferencia Western, transferencia de perlas, ensayos de desplazamiento de movilidad en gel, análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés), seguimiento de marcadores radiactivos o bioluminiscentes, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética de electrones, espectroscopía de flujo detenido, cromatografía en columna, electroforesis capilar u otros métodos también se puede desarrollar para detectar proteínas priónicas en la composición.

En algunos ejemplos, la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica basada en uno de los ensayos para detectar proteínas priónicas (tales como cualquiera de los ensayos arriba descritos). En algunos ejemplos se utilizan dos o más ensayos para analizar la composición, y la correlación entre estos ensayos diferentes se utiliza para determinar si la composición está o no exenta de una proteína priónica.

Por lo tanto, en algunos ejemplos descritos en esta memoria se encuentra una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 100 fg/ml. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica menor que aproximadamente 10 UI-ic/ml. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica menor que aproximadamente 1 DL50/ml. En algunos ejemplos, la composición no muestra la presencia de una proteína priónica basada en el ensayo de amplificación cíclica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA). En algunos ejemplos, la composición no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo IPCR. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 10 UI-ic/ml y no muestra la presencia de una proteína priónica basada en el ensayo de PMCA. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 10 UI-ic/ml y no muestra la presencia de una proteína priónica basada en el ensayo de IPCR. En algunos ejemplos, la composición está exenta de proteína priónica según el patrón proporcionado en la Guía para la Investigación de Procesos de Fabricación de Medicamentos Derivados de Plasma con respecto al Riesgo de vCJD (CPMP5136/03), disponible en <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/513603en.pdf>.

Las composiciones descritas en esta memoria están en generalmente exentas en esencia de PrPsc. En algunos ejemplos, la composición está también sustancialmente exenta de PrPc. En algunos ejemplos, la relación molar de PrPsc y PrPc en la composición no es mayor que aproximadamente 1:1, tal como no mayor que aproximadamente uno cualquiera de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 o 1:100000.

En algunos ejemplos, la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica de seres humanos, bovinos, ovinos y roedores (tales como hámster, ratones y visón). En algunos ejemplos, la composición está sustancialmente exenta de la proteína priónica de tipo H, la proteína priónica de tipo L, o ambas. En algunos ejemplos, la composición está sustancialmente exenta de proteína priónica unida a las células, la proteína priónica libre, o ambas.

- 5 El término "PrPc" utilizado en esta memoria se refiere a la molécula de proteína priónica nativa que se expresa de forma natural dentro del cuerpo del mamífero. El término "PrPsc" utilizado en esta memoria se refiere a la forma alterada conformacionalmente de la molécula de PrPc que se cree que es infecciosa.

"Albúmina" utilizada en esta memoria se refiere a la albúmina que se produce de forma natural y no abarca la albúmina producida de forma recombinante. La albúmina que se produce de forma natural es ventajosa frente a la albúmina recombinante, porque es el ligando natural para los receptores de albúmina in vivo. La albúmina utilizada en los métodos descritos en esta memoria generalmente retiene las modificaciones post-traduccionales de la albúmina y, por lo tanto, tiene riesgos reducidos de inmunogenicidad. En algunas realizaciones, la albúmina se obtiene de una composición derivada de la sangre. "Composición derivada de sangre", utilizada en esta memoria, incluye sangre entera, concentrado de glóbulos rojos, plasma, suero, fracción plaquetaria rica en plaquetas y pobre en plaquetas, concentrado de plaquetas, glóbulos blancos, precipitado de plasma sanguíneo, precipitado de fraccionamiento de plasma sanguíneo y sobrenadante, fraccionamiento de plasma intermedio, diversas otras sustancias que se derivan de la sangre y similares. En algunas realizaciones, la albúmina es de seres humanos. En algunas realizaciones, la albúmina proviene de un animal, tal como bovino, ovino y roedor (tal como ratón, hámster y visón). En algunas realizaciones, la albúmina se obtiene de una población de individuos (tales como seres humanos), al menos algunos de los cuales han sido infectados con priones. En algunas realizaciones, la albúmina se obtiene de una población de individuos (tales como seres humanos), al menos algunos de los cuales se sospecha que han sido infectados con priones. En algunas realizaciones, la albúmina se obtiene de un grupo de individuos de gran tamaño de lote.

La composición descrita en esta memoria en algunas realizaciones contiene una cantidad traza de sustancias introducidas durante el proceso de separación de priones. En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica, y en donde la composición comprende una cantidad traza de un material de soporte (tal como material de un material de soporte descrito en esta memoria, incluyendo una resina). En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica, y en donde la composición comprende una cantidad traza de un ligando capaz de unirse a una proteína priónica y una cantidad traza de un material de soporte (tal como material de un material de soporte descrito en esta memoria, incluyendo una resina).

"Cantidad traza" se refiere a una cantidad detectable que no afecta a la propiedad de la composición, por ejemplo en términos de biodisponibilidad y/o bioequivalencia.

En algunos ejemplos, la composición es bioequivalente a una composición en donde la albúmina no ha sido eliminada mediante un proceso de separación de priones. La bioequivalencia se puede establecer, por ejemplo, mediante un intervalo de confianza del 90% de entre 0,80 y 1,25 tanto para $C_{máx}$ como para AUC, o un intervalo de confianza del 90% de entre 0,80 y 1,25 de AUC y un intervalo de confianza del 90% de entre 0,70 y 1,43 para $C_{máx}$.

En algunos ejemplos, el nivel de un estabilizador de albúmina en la composición es menor que una composición, en donde la albúmina no ha sido eliminada mediante un proceso de separación de priones. Estos estabilizadores de albúmina incluyen, por ejemplo, triptofanato de N-acetilo y caprilato de sodio.

Las composiciones descritas en esta memoria abarcan generalmente nanopartículas que comprenden un agente farmacéuticamente activo, sustancialmente insoluble en agua y una albúmina. En algunos ejemplos, la composición de nanopartículas comprende nanopartículas que comprenden un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua y una albúmina. En algunas realizaciones, las nanopartículas en la composición descrita en esta memoria tienen un diámetro medio no mayor que aproximadamente 1000 nm, que incluye, por ejemplo, no mayor que aproximadamente cualquiera de 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70 o 60 nm. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente uno cualquiera del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de todas las nanopartículas en la composición tienen un diámetro no mayor de aproximadamente 1000 nm, incluyendo, por ejemplo, no mayor que aproximadamente uno cualquiera de 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70 o 60 nm. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos uno cualquiera del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de todas las nanopartículas en la composición caen dentro del intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 nm, incluyendo, por ejemplo, uno cualquiera de aproximadamente 30 a aproximadamente 180 nm, y uno cualquiera de aproximadamente 40 a aproximadamente 150, aproximadamente 50 a aproximadamente 120 y aproximadamente 60 a aproximadamente 100 nm.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 5% (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente uno cualquiera de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%) de la albúmina en la porción de nanopartículas de la composición está reticulado (por ejemplo, reticulado a través de uno o más enlaces disulfuro).

- 5 En algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (tal como paclitaxel) recubierto con una albúmina (p. ej., albúmina de suero humano). En algunas realizaciones, la composición comprende un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, tanto en forma de nanopartículas como de no nanopartículas, en donde al menos aproximadamente uno cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición está en forma de nanopartículas. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo,
- 10 sustancialmente insoluble en agua en las nanopartículas constituye más de aproximadamente uno cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las nanopartículas en peso. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen una matriz no polimérica. En algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden un núcleo de agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua que está sustancialmente exento de materiales poliméricos (tal como una matriz polimérica).
- 15 En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está sustancialmente exenta (tal como exenta) de tensioactivos o disolvente orgánico (tal como Cremophor®, Tween 80, o cualesquiera otros disolventes orgánicos utilizados para la administración de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua). En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas contiene menos de aproximadamente uno cualquiera de 20%, 15%, 10%, 7,5%, 5%, 2,5%, 1% o menos de disolvente orgánico.
- 20 La separación del prion de la composición que contiene albúmina permite administrar mayores cantidades de albúmina sin preocuparse de los priones. Se describen en esta memoria composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la relación ponderal de albúmina al agente farmacéutico sustancialmente insoluble en agua es aproximadamente 20:1 o más, tal como aproximadamente cualquiera de aproximadamente 30:1
- 25 o más, aproximadamente 40:1 o más o aproximadamente 50:1 o más. Relaciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, aproximadamente 20:1 a aproximadamente 40:1, aproximadamente 40:1 a aproximadamente 60:1, aproximadamente 60:1 a aproximadamente 80:1 o aproximadamente 90:1 a aproximadamente 100:1. En algunos ejemplos, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición de nanopartículas es de aproximadamente 18:1 o menos, tal como aproximadamente 15:1 o menos,
- 30 por ejemplo aproximadamente 10:1 o menos. En algunos ejemplos, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición cae dentro del intervalo de uno cualquiera de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 18:1, aproximadamente 2:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 3:1 a aproximadamente 13:1, aproximadamente 4:1 a aproximadamente 12:1, aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1. En algunos ejemplos, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente
- 35 activo, sustancialmente insoluble en agua en la porción de nanopartículas de la composición es aproximadamente uno cualquiera de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15 o menos.

En algunas realizaciones, la composición de partículas comprende una o más de las características anteriores.

- En algunos ejemplos, la composición de nanopartículas es Abraxane™. Composiciones de nanopartículas que comprenden otros agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua (tales como docetaxel y ortataxel) también pueden comprender una o más de las características anteriores.
- 40

- En algunos ejemplos, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el proceso de separación de priones comprende, además, separar dicho
- 45 ligando y proteínas unidas al mismo de dicha composición de albúmina.

- También se describe en esta memoria una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende: a) poner en contacto una composición inicial que comprende albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica para provocar la formación de un complejo entre el ligando y una proteína priónica, y b) separar el complejo de la composición inicial.
- 50

- Las nanopartículas que comprenden albúminas y fármacos sustancialmente insolubles en agua se describen adicionalmente más adelante con más detalle. El método para separar priones de una composición (tal como una composición de albúmina inicial, una composición de nanopartículas que comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, o una composición intermedia formada durante el procedimiento de fabricación de las nanopartículas) se describen más detalladamente más adelante.
- 55

Las composiciones descritas en esta memoria tienen generalmente un nivel reducido de proteína priónica en comparación con composiciones en las que la albúmina no se ha eliminado mediante un proceso de separación de

priones. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la composición tiene menos de aproximadamente uno cualquiera de 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos de proteína priónica que una composición en la que la albúmina no se ha eliminado mediante un proceso de separación de priones. En algunos ejemplos, la composición tiene cualquiera de aproximadamente 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7 u 8 logs o menos de proteína priónica que una composición en la que la albúmina no se ha eliminado mediante un proceso de separación de priones. En algunos ejemplos, la composición tiene cualquiera de aproximadamente 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7 u 8 logs o menos de infectividad que una composición en la que la albúmina no se ha eliminado mediante un proceso de separación de priones. En algunos ejemplos, la composición de la presente invención es bioequivalente a una composición en donde la albúmina no ha sido eliminada mediante un proceso de separación de priones.

10 Otras proteínas que normalmente se encuentran en la sangre o el plasma, que incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulina (incluidas IgA e IgG), lipoproteínas, apolipoproteína B, glucoproteína de ácido alfa, beta-2-macroglobulina, tiroglobulina, transferina, fibronectina, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X y similares también se describen en esta memoria. Todas las descripciones relevantes sobre la albúmina proporcionadas en esta memoria son igualmente aplicables a estas otras proteínas en la medida en que se utilicen en la formación de nanopartículas.

15 Métodos de preparar composiciones de nanopartículas exentas de priones

En otro aspecto, se proporcionan métodos para producir composiciones de nanopartículas exentas de priones. Por ejemplo, en algunos ejemplos se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que contiene dicho fármaco farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, dispersado en un disolvente orgánico, a una condición de alto cizallamiento, en el que la albúmina se obtuvo por un método que comprende separar una proteína priónica de una composición de albúmina inicial. En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, dispersado en un disolvente orgánico, a una condición de alto cizallamiento, en el que la albúmina se obtuvo por un método que comprende poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que contiene dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, dispersado en un disolvente orgánico, a una condición de alto cizallamiento, en el que la albúmina se obtuvo por un método que comprende: a) poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica y b) separar de la composición inicial el ligando y la proteína unida al mismo.

35 En algunos ejemplos, se proporciona un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) separar una proteína priónica de una composición de albúmina inicial; b) someter una mezcla que comprende una solución que comprende la albúmina separada de priones y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento. En algunos ejemplos, se proporciona un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica para provocar la formación de un complejo entre el ligando y una proteína priónica y b) separar el complejo de la composición de albúmina inicial; c) someter una mezcla que comprende una solución que comprende la albúmina separada de priones y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento.

En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) poner en contacto una solución de albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, b) separar de la solución de albúmina el ligando y proteínas unidas al mismo, c) someter una mezcla que comprende dicha solución de albúmina y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento. En algunas realizaciones, la mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos.

55 Los priones se pueden separar durante la formación de las nanopartículas. Por ejemplo, en algunos ejemplos, se proporciona un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) poner en contacto una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el método comprende, además: b) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunos ejemplos, el método comprende, además, c) someter la mezcla a una condición

de alto cizallamiento. En algunos ejemplos, el método comprende, además, separar el disolvente orgánico de la mezcla. En algunas realizaciones, la mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una solución de albúmina y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento; y b) separar una proteína priónica de dicha mezcla, en donde la separación comprende: 1) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y 2) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunas realizaciones, el método comprende, además, separar el disolvente orgánico de la mezcla. En algunas realizaciones, la mezcla no contiene sustancialmente tensioactivos.

En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende poner en contacto una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en el que la mezcla ha sido sometida a una condición de alto cizallamiento antes de entrar en contacto con el ligando. En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, b) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica y c) separar el ligando y las proteínas unidas al mismo de la mezcla. En algunas realizaciones, el método comprende, además: d) separar la fase acuosa de la mezcla. En algunas realizaciones, la mezcla está sustancialmente exenta de tensioactivos.

En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, b) separar dicho disolvente orgánico y c) poner en contacto la mezcla con un disolvente orgánico separado con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, el método comprende, además: d) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunos ejemplos, el método comprende, además: d) separar la fase acuosa de la mezcla. En algunos ejemplos, la mezcla está sustancialmente exenta de tensioactivos.

En algunos ejemplos, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, b) separar dicho disolvente orgánico, c) añadir albúmina a la mezcla y d) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, el método comprende, además: e) separar de la mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunos ejemplos, el método comprende, además: f) separar la fase acuosa de la mezcla. En algunos ejemplos, la mezcla está sustancialmente exenta de tensioactivos.

Los métodos descritos en esta memoria incluyen generalmente la etapa de someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento. En algunas realizaciones, la condición de alto cizallamiento es la homogeneización a alta presión, por ejemplo a una presión en el intervalo de aproximadamente 3000 (207) a aproximadamente 30.000 psi (2.070 bares), que incluye por ejemplo aproximadamente 6000 (414) a aproximadamente 25.000 psi (1724 bares), aproximadamente 9.000 (602) a aproximadamente 18.000 psi (1204 bares), aproximadamente 10.000 (689) a aproximadamente 25.000 psi (1724 bares), aproximadamente 15.000 (1034) a aproximadamente 25.000 psi (1724 bares). En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es una mezcla de un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible en agua (tal como cloroformo o cloruro de metileno) y un disolvente orgánico soluble en agua (tal como un alcohol soluble en agua, que incluye etanol y t-butanol). En algunas realizaciones, la relación (v/v) del disolvente orgánico sustancialmente inmiscible en agua y el disolvente orgánico soluble en agua (por ejemplo, la relación de cloroformo/etanol o cloroformo/butanol) es aproximadamente cualquiera de 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o 9:1, o con una relación de aproximadamente cualquiera de 3:7, 5:7, 4:6, 6:4, 5:5, 6:5, 8:5, 9:5, 9,5:5, 5:3, 7:3, 6:4 o 9,5:0,5.

En algunas realizaciones, el método comprende, además, separar la fase orgánica de la mezcla (tal como separación por evaporación a presión reducida). En algunas realizaciones, el método comprende, además, separar la fase acuosa de la mezcla. En algunas realizaciones, el método comprende, además, la filtración en condiciones estériles de las nanopartículas formadas por el método descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, se proporciona un método de separar una proteína priónica de una composición de la que se sospecha que contiene una proteína priónica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto la composición de nanopartículas con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, b) separar el ligando y las proteínas unidas al mismo de la composición de nanopartículas, en donde el agente farmacológicamente activo es como se proporciona en esta memoria. En algunas realizaciones, se proporciona un método para separar una proteína priónica de una composición de albúmina sospechosa de contener una proteína priónica anormal, que comprende: a) poner en contacto la composición que comprende albúmina con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, b) separar el ligando y proteínas unidos al mismo desde la composición de albúmina, en donde dicha composición de albúmina se utiliza para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para separar una proteína priónica de una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) determinar la presencia o ausencia de una proteína priónica en la composición, b) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, y c) separar de la composición el ligando y las proteínas unidas al mismo, en donde el agente farmacológicamente activo es como se reivindica.

En algunas realizaciones, una o más etapas de los métodos descritos en esta memoria se llevan a cabo en modo discontinuo. En algunas realizaciones, una o más etapas de los métodos descritos en esta memoria se llevan a cabo en modo continuo.

Separación de priones antes de la formación de nanopartículas

La proteína priónica se puede separar de una composición de albúmina inicial antes de que se preparen las composiciones de nanopartículas que contienen albúmina. Generalmente, el método comprende poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, y separar el ligando y la proteína unidos a la misma de la composición de albúmina. Este proceso puede repetirse una o más veces, con el mismo o diferente ligando. También se pueden utilizar dos o más ligandos simultáneamente durante el proceso de separación de priones.

En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es un producto derivado de la sangre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es sangre entera, concentrado de glóbulos rojos, plasma, suero, fracción rica en plaquetas y pobre en plaquetas, concentrado de plaquetas, glóbulos blancos, precipitado de plasma sanguíneo, precipitado de fraccionamiento de plasma sanguíneo y sobrenadante, o fraccionamiento plasmático intermedio. En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial se obtiene de seres humanos. En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial proviene de un animal, tal como bovino, ovino y roedor (tal como ratón, hámster y visón). En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial se obtiene de una población de individuos (tales como seres humanos), al menos algunos de los cuales han sido infectados con priones. En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial se obtiene de una población de individuos (tales como seres humanos), al menos algunos de los cuales se sospecha que han sido infectados con priones.

En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es una composición de albúmina preparada a partir de un fluido corporal (tal como sangre) por cualquiera de los diversos métodos comunes en la técnica, que incluyen intercambio iónico, afinidad, permeación de gel y/o cromatografía hidrofóbica y/o precipitación diferencial. En algunas realizaciones, la composición inicial es una composición de albúmina purificada a partir de la sangre (tal como sangre humana). En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial es una composición de albúmina purificada a partir de suero (tal como suero humano). En algunas realizaciones, la composición de albúmina inicial tiene una infectividad priónica de aproximadamente 100 UI-ic/ml, 90 UI-ic/ml, 50 UI-ic/ml o 10 UI-ic/ml. En algunas realizaciones, la concentración de albúmina en la composición de albúmina inicial es aproximadamente 1% (p/v), incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30%.

Durante el proceso de separación de priones, el ligando se pone en contacto con la composición de albúmina inicial y se le permite unirse a las proteínas priónicas en la composición de albúmina inicial. Condiciones adecuadas para la unión pueden determinarse y optimizarse para facilitar la unión del ligando a una proteína priónica basándose en la naturaleza del ligando y su especificidad de unión a la proteína priónica. La unión en algunas realizaciones se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 39 °C, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. La unión se puede llevar a cabo a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,5, aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,4 o aproximadamente 7. Opcionalmente, se pueden utilizar agentes de bloqueo para reducir la unión no específica al ligando.

Después de la etapa de contacto, el ligando y las proteínas unidas al mismo se separan del resto de la composición. El término "separación", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la separación del ligando y la proteína unida al mismo de la composición que contiene albúmina. La separación se puede llevar a cabo de diversas maneras,

dependiendo de la naturaleza del ligando y el material de soporte (si lo hay) utilizado para facilitar la separación. Por ejemplo, el ligando y las proteínas unidas al mismo pueden separarse por cromatografía, tal como, pero no limitado a cromatografía de capa fina, en columna y discontinua; en soporte sólido y separación de membrana; separación en reactor; separación magnética, inmunoseparación; separación coloidal; sedimentación; precipitación; o centrifugación.

- 5 En algunas realizaciones, el ligando puede estar unido a un material de soporte tal como una perla o una membrana, que a su vez se permite que entre en contacto con la composición de albúmina inicial. Se permite que el soporte inmovilizado con ligando entre en contacto con la composición de albúmina inicial bajo una condición suficiente para provocar la formación de un complejo prion-ligando. La fase sólida se separa luego de la composición, separando con ello la proteína priónica unida al ligando de la muestra. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, los ligandos se inmovilizan en una columna, tal como una columna de cromatografía, luego se hace pasar una muestra (tal como la composición de albúmina inicial) a través de la columna debido a la fuerza de gravedad o bajo presión, tal como en una columna de cromatografía líquida de alta presión. Las proteínas priónicas en la muestra se unirán al ligando inmovilizado en la columna, y la muestra que pasa puede ser recogida. Este proceso puede repetirse varias veces para lograr el resultado deseado, utilizando los mismos o diferentes ligandos.
- 10
- 15 El caudal de una muestra (tal como la composición de albúmina inicial) en una columna se puede ajustar para maximizar la unión del ligando y las proteínas priónicas en una muestra. En algunas realizaciones, la unión se lleva a cabo a un caudal de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 5,0 ml por minuto, de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 2,5 ml por minuto, de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 0,25 ml por minuto, de aproximadamente 0,25 ml por minuto a aproximadamente 0,5 ml por minuto, de aproximadamente 0,5 ml por minuto a aproximadamente 1,0 ml por minuto, de aproximadamente 1,0 ml por minuto a aproximadamente 1,5 ml por minuto, de aproximadamente 1,5 ml por minuto a aproximadamente 2,0 ml por minuto, de aproximadamente 2,0 ml por minuto a aproximadamente 2,5 ml por minuto, de aproximadamente 2,5 ml por minuto a aproximadamente 3,0 ml por minuto, de aproximadamente 3,0 ml por minuto a aproximadamente 3,5 ml por minuto, de aproximadamente 3,5 ml por minuto a aproximadamente 4,0 ml por minuto, de aproximadamente 4,0 ml por minuto a aproximadamente 4,5 ml por minuto o de aproximadamente 4,5 ml por minuto a aproximadamente 5,0 ml por minuto, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 0,1 ml por minuto, 0,25 ml por minuto, 0,5 ml por minuto, 1,0 ml por minuto, 1,5 ml por minuto, 1,7 ml por minuto, 1,8 ml por minuto, 1,9 ml por minuto, 2,0 ml por minuto, 2,1 ml por minuto, 2,3 ml por minuto, 2,5 ml por minuto, 2,7 ml por minuto, 3,0 ml por minuto, 3,5 ml por minuto, 4,0 ml por minuto, 4,5 ml por minuto o 5,0 ml por minuto. En algunas realizaciones, el caudal es de al menos aproximadamente 10 ml por minuto, tal como al menos aproximadamente cualquiera de 20 ml por minuto, 30 ml por minuto, 40 ml por minuto, 50 ml por minuto.
- 20
- 25
- 30

El volumen de flujo total o el tiempo de flujo total durante un proceso de unión también se puede ajustar para maximizar la unión del ligando y las proteínas priónicas en una muestra (tal como la composición de albúmina inicial). En algunas realizaciones, el volumen de flujo total es de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 1000 veces el volumen de la columna, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10 veces el volumen de la columna, aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces el volumen de la columna, aproximadamente 20 veces a aproximadamente 30 veces el volumen de la columna, aproximadamente 30 veces a aproximadamente 40 veces el volumen de la columna, aproximadamente 40 veces a aproximadamente 50 veces el volumen de la columna, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 1000 veces el volumen de la columna, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 500 veces el volumen de la columna, aproximadamente 100 veces a aproximadamente 600 veces el volumen de la columna o aproximadamente 200 veces a aproximadamente 800 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones, el volumen de flujo total es aproximadamente 100 veces el volumen de la columna. En otras realizaciones, el volumen de flujo total es aproximadamente 500 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 30 horas, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 25 horas, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 20 horas o aproximadamente 3 horas a aproximadamente 17 horas. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es cualquiera de aproximadamente 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas o 20 horas. En algunas realizaciones, el tiempo total de flujo es más de aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es inferior a aproximadamente 8, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5 horas.

35

40

45

- 50 Alternativamente, el ligando puede ponerse primero en contacto con la composición de albúmina inicial, bajo una condición suficiente para provocar la formación de un complejo prion-ligando. El complejo prion-ligando se separa posteriormente utilizando una columna, tal como una cromatografía basada en afinidad. Para facilitar la separación, el ligando puede conjugarse con un participante en la unión, de modo que el complejo ligando/prion pueda separarse mediante el participante en la unión, por ejemplo, utilizando una columna de afinidad que contiene una molécula que reconoce al participante en la unión.
- 55

Además de la cromatografía discontinua o en columna, también se prevé una diversidad de otras configuraciones, modificaciones y variaciones del uso de los ligandos para unir proteínas priónicas. Variaciones y modificaciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a: procedimientos discontinuos, procedimientos continuos, procedimientos de cromatografía en lecho móvil; procedimientos a baja, media o alta presión; o procedimientos a pequeña, mediana o gran escala. En algunas realizaciones, los ligandos están en una membrana, perla de fibras, impregnados en una malla no tejida o fibras de revestimiento contenidas dentro de una carcasa de filtro.

60

En algunas realizaciones, la etapa de separación no da como resultado significativamente una pérdida de rendimiento y/o un cambio en la propiedad y/o estabilidad de la albúmina. En algunas realizaciones, la recuperación de la albúmina en su estado biológico original se mantiene sustancialmente al menos a un nivel superior al 50%, incluido, por ejemplo, 80% o 90%, o más. En algunas realizaciones, la tasa de recuperación de albúmina del proceso de separación de priones es mayor que cualquiera de aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99%. En algunas realizaciones, la concentración de albúmina en la composición de albúmina inicial se ajusta o controla antes de la etapa de separación de priones con el fin de minimizar la unión no específica y la pérdida de albúmina durante el proceso. Por ejemplo, la concentración de albúmina puede estar en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%, etc., incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% de albúmina.

La composición de albúmina resultante se puede analizar para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. El ligando con proteínas priónicas unidas también puede analizarse (directamente o después de la elución) para determinar la tasa de eliminación.

La separación de proteínas priónicas se puede evaluar en base a la reducción de la proteína priónica o la reducción de la infectividad. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50%, incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de las proteínas priónicas se separan de la composición de albúmina inicial. En algunas realizaciones, la infectividad de la composición de albúmina post-separación es al menos aproximadamente 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 80x, 100x, 200x, 500x, 1000x, 10^4 x, 10^5 x, 10^6 x, 10^7 x, 10^8 x, 10^9 x menor que la de la composición de albúmina inicial.

En algunas realizaciones, la infectividad en serie se utiliza para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. Se realizan diluciones en serie de una muestra y se examinan las diluciones en busca de actividad infecciosa, por ejemplo en un animal de ensayo. La dilución a la que la mitad de los animales se infectan es el título infeccioso. Por ejemplo, si se requiere una dilución de 5 veces, la muestra puede definirse como que tiene 5 logs de infectividad. Al comparar la log de infectividad de la composición de albúmina inicial y la de la composición de albúmina post-separación, se puede determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. En algunas realizaciones, el método de separación de priones da como resultado una reducción de uno cualquiera de 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 o 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 logs de infectividad.

En algunas realizaciones, la tasa de eliminación del proceso de separación de priones se determina en base a pruebas de adición con materiales infecciosos siguiendo las etapas descritas en esta memoria para el método de separación de priones. Agentes de adición adecuados incluyen, pero no se limitan a, homogeneizados del cerebro, microsomas, dominios similares a caveolas, PrPsc purificado y fibrillas de priones. En algunas realizaciones, el agente de adición está solubilizado con detergente (tal como solubilizado con sarkosyl). En algunas realizaciones, la relación de adición en la composición está en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,25%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,005%, de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,075%, de aproximadamente 0,075% a aproximadamente 0,01%, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 0,75%, de aproximadamente 0,75% a aproximadamente 1%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 3% o de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 0,001%, 0,005%, 0,075%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 3% o 5%.

En algunas realizaciones, los factores de reducción (RF, por sus siglas en inglés) se utilizan para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. Los RF se pueden calcular utilizando la fórmula:

$$RF = (V_1 \times T_1) / (V_2 \times T_2)$$

o

$$\text{Log}_{10}[RF] = [\text{Log}_{10}(V_1) + \text{Log}_{10}(T_1)] - [\text{Log}_{10}(V_2) + \text{Log}_{10}(T_2)].$$

En donde V_1 y T_1 son el volumen y el título de la composición de albúmina inicial, respectivamente, y V_2 y T_2 son el volumen y el título de la composición de albúmina post-separación. Los factores de reducción pueden redondearse a 1 decimal después del cálculo final. En algunas realizaciones, un factor de reducción de al menos aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 u 8,0 log_{10} de infectividad de las proteínas priónicas se separa de la composición de albúmina inicial. Por ejemplo, la proteína priónica puede separarse mediante un factor de reducción mayor que o igual a 2,5 log_{10} en una fracción solubilizada de sarkosyl al 0,5% añadida a una composición de albúmina al 20%. Como otro ejemplo, la proteína priónica puede también separarse mediante un factor de reducción mayor que o igual a 2,0 log_{10} en una fracción solubilizada de sarkosyl al 0,5% añadida a una composición de albúmina al 25%.

La separación de priones se puede evaluar mediante análisis de transferencia Western estándar. Por ejemplo, los ligandos post-unión pueden tratarse primero con Proteinasa K, que digiere todo PrPc pero no PrPsc. La digestión se procesa entonces en gel SDS y se transfiere a una lámina de nitrocelulosa o membrana de PVDF. Las bandas separadas de PrPsc se visualizan luego utilizando 3F4 o 6H4. 3F4 reacciona con los residuos de aminoácidos 109-112 PrP de seres humanos, hámsteres y felinos. En una realización as modo de ejemplo, la incubación se llevó a cabo a una concentración de 0,6 ug/ml durante un mínimo de una hora, después de lo cual se eliminó por lavado el exceso de anticuerpo y las membranas se incubaron con un conjugado de peroxidasa de rábano picante anti-ratón de conejo (dilución 1:1000) durante un mínimo de una hora. Después de un lavado extenso con TTBS, las membranas se desarrollaron utilizando quimioluminiscencia potenciada. En algunas realizaciones, la separación de proteínas priónicas se evalúa de acuerdo con la Guía para la Investigación de Procesos de Fabricación de Medicamentos Derivados de Plasma con respecto al Riesgo de vCJD (CPMP5136/03).

Ligandos capaces de unirse a una proteína priónica y material de soporte

"Ligando" utilizado en esta memoria se refiere a una molécula a la que se une una proteína o péptido priónico. Un "ligando capaz de unirse a una proteína priónica" se refiere a un ligando que se une específicamente a una proteína priónica en condiciones adecuadas. En algunas realizaciones, el ligando se une específicamente a una proteína priónica humana. En algunas realizaciones, el ligando se une específicamente a una proteína priónica de hámster. En algunas realizaciones, el ligando se une específicamente a una proteína priónica de ratón. En algunas realizaciones, el ligando se une a proteínas priónicas de múltiples especies. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando se une a la proteína priónica humana, la proteína priónica de hámster y la proteína priónica de ratón.

En algunas realizaciones, el ligando se une a la proteína priónica (tal como una proteína priónica humana, proteína priónica de hámster y/o proteína priónica de ratón) con una alta afinidad de unión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando tiene una asociación K de unión de más de aproximadamente cualquiera de 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} .

Se ha identificado un cierto número de ligandos que se unen a la proteína priónica y, por lo tanto, pueden utilizarse en métodos de la presente invención. Véanse, p. ej., los documentos WO04/090102, WO04/050851, WO06/010915 y WO06/044459. Estos incluyen, por ejemplo, péptidos, compuestos químicos y anticuerpos que reconocen específicamente una proteína priónica. El ligando puede utilizarse para separar todas las formas de proteínas priónicas de una composición o puede elegirse selectivamente para detectar o separar una sola forma de proteína priónica.

En algunas realizaciones, el ligando para separar el prion es un péptido, tal como los péptidos descritos en la solicitud PCT publicada N° WO04/05051. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando es un péptido que tiene un aminoácido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-232 tal como se muestra en la Tabla 1. En algunas realizaciones, el ligando es un tripéptido, tal como péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:48, 102, 105, 108, 109, 110, 111, 143, 148, 193, 194, 195, 202, 203, 204 o 210. En algunas realizaciones, el ligando es un péptido con seis aminoácidos, tales como 6-meros que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 152, 153, 180, 181, 182, 183, 185, 186, 187, 188, 189 o 190. En algunos realizaciones, el ligando tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:150 o 151.

• Tabla 1-Secuencias de aminoácidos que se unen a secuencias de priones

KIHKFLA (SEQ ID NO: 1)	FLLIDTA (SEQ ID NO: 41)	YEDQWQA (SEQ ID NO: 81)	DNPIDA (SEQ ID NO: 121)
GTHDFQA (SEQ ID NO: 2)	GFLFKFA (SEQ ID NO: 42)	EWADDNA (SEQ ID NO: 82)	FNEHEA (SEQ ID NO: 122)
KFGSTHA (SEQ ID NO: 3)	PWTIYIA (SEQ ID NO: 43)	YEIDYGA (SEQ ID NO: 83)	WGADGA (SEQ ID NO: 123)
FVNEIEA (SEQ ID NO: 4)	WH (SEQ ID NO: 44)	EFGYFDA (SEQ ID NO: 84)	VIYSHA (SEQ ID NO: 124)
GLHFKSA (SEQ ID NO: 5)	WW (SEQ ID NO: 45)	WGDEQDA (SEQ ID NO: 85)	HILEEA (SEQ ID NO: 125)
GRVLHHA (SEQ ID NO: 6)	LW (SEQ ID NO: 46)	HEEDWAA (SEQ ID NO: 86)	PHENFA (SEQ ID NO: 126)
QKNSEWA (SEQ ID NO: 7)	WNA (SEQ ID NO: 47)	FEDFELA (SEQ ID NO: 87)	EDNGGA (SEQ ID NO: 127)
HAYFTHA (SEQ ID NO: 8)	EFW (SEQ ID NO: 48)	TWGIDEA (SEQ ID NO: 88)	DSEGPA (SEQ ID NO: 128)
WPKGAVA (SEQ ID NO: 9)	LPW (SEQ ID NO: 49)	WDPTDYA (SEQ ID NO: 89)	FQEFTA (SEQ ID NO: 129)
RPWKKAA (SEQ ID NO: 10)	YEY (SEQ ID NO: 50)	NDKIHTA (SEQ ID NO: 90)	EGDEIA (SEQ ID NO: 130)
PKHIWPA (SEQ ID NO: 11)	WPA (SEQ ID NO: 51)	FEDFFSA (SEQ ID NO: 91)	IYAETA (SEQ ID NO: 131)
HKLWGVA (SEQ ID NO: 12)	FNQ (SEQ ID NO: 52)	YEWAEQA (SEQ ID NO: 92)	RVRETA (SEQ ID NO: 132)

ES 2 764 100 T3

GGYKPYA (SEQ ID NO: 13)	YHE (SEQ ID NO: 53)	THVYFLA (SEQ ID NO: 93)	EEPQWA (SEQ ID NO: 133)
ENVSQNA (SEQ ID NO: 14)	LFA (SEQ ID NO: 54)	(S/T/W)XDPSDA (SEQ ID NO: 94)	EGEIPA (SEQ ID NO: 134)
HTYYNGA (SEQ ID NO: 15)	NHY (SEQ ID NO: 55)	YRTPNEA (SEQ ID NO: 95)	(T/L)FNIHA (SEQ ID NO: 135)
KKKSDHA (SEQ ID NO: 16)	TLG (SEQ ID NO: 56)	(GIL)RSETA (SEQ ID NO: 96)	YDW (SEQ ID NO: 136)
HHLKGTA (SEQ ID NO: 17)	WVD (SEQ ID NO: 57)	IHN (SEQ ID NO: 97)	NYT (SEQ ID NO: 137)
KKHGVWA (SEQ ID NO: 18)	YWDQA (SEQ ID NO: 58)	WEY (SEQ ID NO: 98)	SYT (SEQ ID NO: 138)
DGTQAHA (SEQ ID NO: 19)	YVHEA (SEQ ID NO: 59)	DYW (SEQ ID NO: 99)	WAD (SEQ ID NO: 139)
APHRNNA (SEQ ID NO: 20)	WFDEA (SEQ ID NO: 60)	WDW (SEQ ID NO: 100)	QWG (SEQ ID NO: 140)
HHGHNIA (SEQ ID NO: 21)	LQWYDA (SEQ ID NO: 61)	WQD (SEQ ID NO: 101)	WGD (SEQ ID NO: 141)
HTWHGQA (SEQ ID NO: 22)	YTHSEA (SEQ ID NO: 62)	YFE (SEQ ID NO: 102)	EYF (SEQ ID NO: 142)
HVFVTWA (SEQ ID NO: 23)	WIDYEA (SEQ ID NO: 63)	NYE (SEQ ID NO: 103)	WEH (SEQ ID NO: 143)
THHFYIA (SEQ ID NO: 24)	VWIDAA (SEQ ID NO: 64)	SYA (SEQ ID NO: 104)	LYD (SEQ ID NO: 144)
KLGWG(A/G)A (SEQ ID NO: 25)	WDEAEEA (SEQ ID NO: 65)	WDL (SEQ ID NO: 105)	DYY (SEQ ID NO: 145)
GSKKKEA (SEQ ID NO: 26)	YDSYDDA (SEQ ID NO: 66)	WLE (SEQ ID NO: 106)	FYE (SEQ ID NO: 146)
PLLVVWA (SEQ ID NO: 27)	NDFIDFA (SEQ ID NO: 67)	VQR (SEQ ID NO: 107)	EYY (SEQ ID NO: 147)
WLLVGGA (SEQ ID NO: 28)	YEPWGSA (SEQ ID NO: 68)	YID (SEQ ID NO: 108)	YDY (SEQ ID NO: 148)
(W/G)QVLVYA (SEQ ID NO: 29)	EYGDWWA (SEQ ID NO: 69)	RWD (SEQ ID NO: 109)	WDH (SEQ ID NO: 149)
RRHQRQA (SEQ ID NO: 30)	WDYDQEA (SEQ ID NO: 70)	DVR (SEQ ID NO: 110)	RES(na)NVA (SEQ ID NO: 150)
LPWTFGA (SEQ ID NO: 31)	DWGDPPFA (SEQ ID NO: 71)	WSD (SEQ ID NO: 111)	ES(na)PRQA (SEQ ID NO: 151)
IFIITA (SEQ ID NO: 32)	DWPEVWA (SEQ ID NO: 72)	HWD (SEQ ID NO: 112)	VARENIA (SEQ ID NO: 152)
P(X)IEPHA (SEQ ID NO: 33)	FHDFSEA (SEQ ID NO: 73)	WQD (SEQ ID NO: 113)	RWEREDA (SEQ ID NO: 153)
EWGIWA (SEQ ID NO: 34)	DTFWDYA (SEQ ID NO: 74)	WDD (SEQ ID NO: 114)	EWWETV (SEQ ID NO: 154)
GWYIYFA (SEQ ID NO: 35)	WNDLDNA (SEQ ID NO: 75)	WED (SEQ ID NO: 115)	SVYQLDA (SEQ ID NO: 155)
TLILFHA (SEQ ID NO: 36)	ASALVYA (SEQ ID NO: 76)	ITN (SEQ ID NO: 116)	(na)HEFYGA (SEQ ID NO: 156)
FLLSNHA (SEQ ID NO: 37)	LINAGGA (SEQ ID NO: 77)	YED (SEQ ID NO: 117)	HE(na)(na)LVA (SEQ ID NO: 157)
WQIRFFA (SEQ ID NO: 38)	WESYVTA (SEQ ID NO: 78)	VADEEA (SEQ ID NO: 118)	A(na)VPV(na)A (SEQ ID NO: 158)
VLLVFEA (SEQ ID NO: 39)	WSDEGYA (SEQ ID NO: 79)	YYVDAA (SEQ ID NO: 119)	YFDYWLA (SEQ ID NO: 159)
GWVLEIA (SEQ ID NO: 40)	YRWTGPA (SEQ ID NO: 80)	QDFNLA (SEQ ID NO: 120)	FE(na)HRQA (SEQ ID NO: 160)

WRHEPAA (SEQ ID NO: 161)	WTD (SEQ ID NO: 204)	
SS(na)KKDA (SEQ ID NO: 162)	FPK (SEQ ID NO: 205)	
R(na)DKEAA (SEQ ID NO: 163)	HWK (SEQ ID NO: 206)	
Tabla 1 (continuación)		
(na)HEIFPA (SEQ ID NO: 164)	WEE (SEQ ID NO: 207)	
aKWYHHRA (SEQ ID NO: 165)	LLR (SEQ ID NO: 208)	
HWWPHNA (SEQ ID NO: 166)	SYF (SEQ ID NO: 209)	
HWQVFYA (SEQ ID NO: 167)	EYY (SEQ ID NO: 210)	
FHE(na)EIA (SEQ ID NO: 168)	DRDLTFA (SEQ ID NO: 211)	
HADF(na)QA (SEQ ID NO: 169)	HNWWIIA (SEQ ID NO: 212)	
ALHFETA (SEQ ID NO: 170)	EVKIGNA (SEQ ID NO: 213)	
DDPTGFA (SEQ ID NO: 171)	SIV (SEQ ID NO: 214)	
VAPGLGA (SEQ ID NO: 172)	AYP (SEQ ID NO: 215)	
IFRLIEA (SEQ ID NO: 173)	EVADEEA (SEQ ID NO: 216)	
GLERPEA (SEQ ID NO: 174)	EYYVDAA (SEQ ID NO: 217)	
IVVRLWA (SEQ ID NO: 175)	YDNPIDA (SEQ ID NO: 218)	
WHNPHYA (SEQ ID NO: 176)	YFNEHEA (SEQ ID NO: 219)	
LIYKSDA (SEQ ID NO: 177)	EWGADGA (SEQ ID NO: 220)	
EKPIFNA (SEQ ID NO: 178)	DVIYSHA (SEQ ID NO: 221)	
HWSEPA (SEQ ID NO: 179)	WHILEEA (SEQ ID NO: 222)	
GHNWKEA (SEQ ID NO: 180)	NPHENFA (SEQ ID NO: 223)	
YWHHDDA (SEQ ID NO: 181)	HEDNGGA (SEQ ID NO: 224)	
GYPKENA (SEQ ID NO: 182)	SDSEGPA (SEQ ID NO: 225)	
PVYWLYA (SEQ ID NO: 183)	EFQEFTA (SEQ ID NO: 226)	
FGEHTPA (SEQ ID NO: 184)	QEGDEIA (SEQ ID NO: 227)	
FQGTREA (SEQ ID NO: 185)	DIYAETA (SEQ ID NO: 228)	
TGTNRYA (SEQ ID NO: 186)	DRVRETA (SEQ ID NO: 229)	
KWATRYA (SEQ ID NO: 187)	FEPPQWA (SEQ ID NO: 230)	
NSTKFDA (SEQ ID NO: 188)	FEGEEFA (SEQ ID NO: 231)	

	231)
LIYKEEA (SEQ ID NO: 189)	(T/L)FNIHA (SEQ ID NO: 232)
EHATYRA (SEQ ID NO: 190)	
HND (SEQ ID NO: 191)	
HER (SEQ ID NO: 192)	
HGD (SEQ ID NO: 193)	
HSD (SEQ ID NO: 194)	
HFD (SEQ ID NO: 195)	
WND (SEQ ID NO: 196)	
YEH (SEQ ID NO: 197)	
HWD (SEQ ID NO: 198)	
YHD (SEQ ID NO: 199)	
YDW (SEQ ID NO: 200)	
WDY (SEQ ID NO: 201)	
HYD (SEQ ID NO: 202)	
HWD (SEQ ID NO: 203)	

En algunas realizaciones, el ligando es un péptido de la secuencia de aminoácidos de DVR, SYA, AMN31, D4 o YVHEA. En algunas realizaciones, el ligando es un péptido que se une a una proteína priónica con una afinidad que es similar o superior a la de DVR, SYA, AMN31, D4 o YVHEA. En algunas realizaciones, el ligando es DVR. En otras realizaciones, el ligando es AMN31. En algunas realizaciones, los ligandos peptídicos se proporcionan en forma de resinas (tal como unidos a resinas).

En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo que reconoce una proteína priónica. Anticuerpos que reconocen las proteínas priónicas son conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales 3F4, 6H4 o 16A18. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo específico de glicoformo, tal como ICSM-4 e ICSM-10. Anticuerpos adecuados útiles para los métodos descritos en esta memoria incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos Fv.

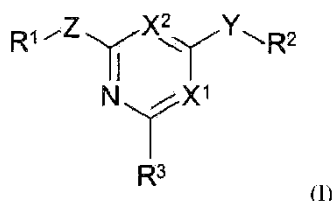
En algunas realizaciones, el ligando se une a una secuencia específica de una proteína priónica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando (tal como un ligando peptídico o un ligando de anticuerpo) se une a una cualquiera de las secuencias de proteínas priónicas de las SEQ ID NOS: 133-146 enumeradas en la Tabla 2.

Tabla 2-Secuencias de aminoácidos de priones

RYPxQ, x es G, P, o N (SEQ ID NO: 233)
xxYYux, x es G, P, o N, u es R o Q (SEQ ID NO: 234)
RYPGQ (SEQ ID NO: 235)
DRYYRD (SEQ ID NO: 236)
QAYYQR (SEQ ID NO: 237)
QVYYRP (SEQ ID NO: 238)
PHGGGWGQ (SEQ ID NO: 239)
PHGGSWGQ (SEQ ID NO: 240)

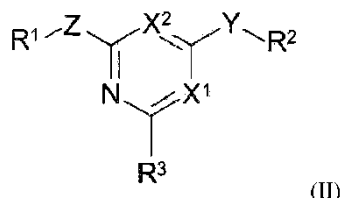
PHGGGWSQ (SEQ ID NO: 241)
PHGGGWSQ (SEQ ID NO: 242)
PHGGGSNWGQ (SEQ ID NO: 243)
PHNPGY (SEQ ID NO: 244)
PHNPSY (SEQ ID NO: 245)
PHNPGY (SEQ ID NO: 246)

En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto químico. Compuestos capaces de unirse a una proteína priónica se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de solicitud PCT N° WO06/010915. En algunas realizaciones, el ligando es una triazina sustituida. En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto que tiene la fórmula (I):



5 en donde R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno son grupos alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido; R³ es hidrógeno o un sustituyente del grupo arilo o R³ es un soporte sólido opcionalmente unido mediante un espaciador; Z representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁴; Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁵; en que
 10 R⁴ y R⁵, que pueden ser iguales o diferentes, representan hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo opcionalmente sustituido, bencilo opcionalmente sustituido o β-feniletilo opcionalmente sustituido; y uno de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno y el otro de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno o CR⁶, en que R⁶ representa hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo; para la unión por afinidad de una proteína priónica.

15 En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto que tiene la fórmula (II),



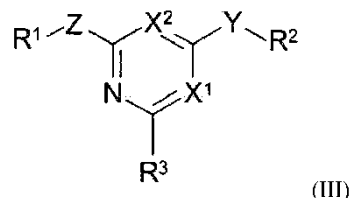
20 en donde R¹ representa un grupo -(CH₂)_m-Q¹, en donde m es de 0 a 7, y Q¹ representa -CR¹¹R¹²R¹³ o -NR¹¹R¹², en que R¹¹, R¹² y R¹³ independientemente representan hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, o dos de R¹¹, R¹² y R¹³, junto con el átomo de carbono o nitrógeno al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido o un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; R² representa un grupo -(CH₂)_n-Q², en donde n es de 0 a 7, y Q² representa -CR²¹R²²R²³ o -NR²¹R²², en que R²¹, R²² y R²³ independientemente representan hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, o dos de R²¹, R²² y R²³, junto con el átomo de carbono o nitrógeno al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido o un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, y R³ es hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo o R³ es un soporte sólido opcionalmente unido mediante un espaciador; Z representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁴; Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁵; en que R⁴ y R⁵, que pueden ser iguales o diferentes, representan hidrógeno, alquilo
 25 opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo opcionalmente sustituido, bencilo opcionalmente sustituido o β-feniletilo opcionalmente sustituido; y uno de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno y el otro de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno o CR⁶, en que R⁶ representa hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo; para la unión por afinidad de una proteína priónica.

30 En algunas realizaciones, a) X¹ y X² son ambos nitrógeno; b) tanto Z como Y representan NR⁴, en particular en que R⁴ es hidrógeno; c) m es de 0 a 4, más preferiblemente de 0 a 3, y lo más preferiblemente de 1 a 3; d) Q¹ es -NR¹¹R¹²; y R¹¹ y R¹² forman preferiblemente, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo heterocicloalquilo; e) n es de 0 a 4, más preferiblemente de 0 a 2, y lo más preferiblemente es 0; y f) R²¹ y R²² forman, junto con el átomo de carbono o el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo.

En algunas realizaciones, Q^2 representa un grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo hidrofóbico, especialmente con sistemas de anillos que comprenden al menos seis átomos.

En algunas realizaciones, Q^1 representa un grupo heterocicloalquilo, especialmente piperidilo, particularmente 1-piperidilo, o piperazinilo, particularmente 1-piperazinilo.

- 5 En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto que tiene la fórmula (III),



10 en donde R^1 representa una cadena de alquileo $-(CH_2)_p-CH_3$, en donde p es de 0 a 6, sustituido con uno o más grupos carboxilo y opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes del grupo alquilo; R^2 representa un grupo $-(CH_2)_q-Ar$, en donde q es de 0 a 7, y Ar representa un grupo arilo opcionalmente sustituido; y R^3 es hidrógeno o un sustituyente del grupo arilo o R^3 es un soporte sólido opcionalmente unido mediante un espaciador; Z representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR^4 ; Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR^5 ; en que R^4 y R^5 , que pueden ser iguales o diferentes, representan hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo opcionalmente sustituido, bencilo opcionalmente sustituido o β -feniletilo opcionalmente sustituido; y uno de X^1 y X^2 representa un átomo de nitrógeno y el otro de X^1 y X^2 representa un átomo de nitrógeno o CR^6 , en que R^6 representa hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo; para la unión por afinidad de una proteína priónica.

15 En algunas realizaciones, a) X^1 y X^2 son ambos nitrógeno; b) tanto Z como Y representan NR^4 , en particular en que R^4 es hidrógeno; c) p es de 0 a 4, más preferiblemente de 0 a 3; d) R^1 está sustituido con uno o dos grupos carboxilo, al menos uno de esos grupos carboxilo es portado por el átomo de carbono terminal de la cadena de alquileo $-(CH_2)_p-CH_3$; e) q es de 0 a 4, más preferiblemente de 0 a 3, y lo más preferiblemente es 1 o 2; y f) Ar es un grupo aromático carbocíclico o heterocíclico monocíclico, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste en fenilo, fenoxi, tolilo, clorobencilo, metoxibencilo, fluorobencilo, piridilo e indoilo.

En algunas realizaciones, R^1 es carboximetilo, 4-carboxibutilo o 1-(1,3-dicarboxi)propilo.

En algunas realizaciones, Ar es fenilo, 4-hidroxifenilo o piridilo, particularmente 2-piridilo.

25 En algunas realizaciones, R^3 es hidrógeno o un sustituyente del grupo arilo o R^3 es un soporte sólido opcionalmente unido mediante un espaciador; X^1 y X^2 son ambos N; Y y Z representan ambos NH; m representa 2; Q^1 representa piperidilo o piperazinilo; n representa 0 o 2; y Q^2 representa 1-piperidilo o adamantilo.

30 En algunas realizaciones, R^3 es hidrógeno o un sustituyente del grupo arilo o R^3 es un soporte sólido opcionalmente unido mediante un espaciador; X^1 y X^2 son ambos N; Y y Z representan ambos NH; R^1 representa carboximetilo, 4-carboxibutilo y 1-(1,3-dicarboxi)propilo; q representa 2; y Ar representa fenilo, 2-piridilo o 4-hidroxifenilo.

En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto o componente inorgánico, tal como, pero no limitado a aluminio (tal como óxido de aluminio) o sílice (tal como sílice fundida). En algunas realizaciones, el compuesto inorgánico es Al_2O_3 o SiO_2 .

35 En algunas realizaciones, el ligando comprende uno o más grupos funcionales. La expresión "grupo funcional" se utiliza en esta memoria para designar grupos químicos, o sub-estructuras que imparten comportamientos químicos, físicos o físico-químicos característicos a una molécula o un material. Grupos funcionales descritos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a hidrofílicos, tales como cargados positivamente, negativamente o no cargados o neutros, o hidrofóbicos. También se prevén grupos funcionales anfifílicos o multifuncionales y caen dentro del alcance de la presente invención. Grupos funcionales incluyen grupos funcionales orgánicos e inorgánicos. Grupos funcionales preferidos contienen grupos amina, fenilo o sulfito. Un grupo amina preferido es un ion amonio primario, secundario, terciario o cuaternario, tal como dimetilaminoetilo (DMAE) o trimetilaminoetilo (TMAE).

45 Otros grupos funcionales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: $-CH_2-CHOH-CH_2NH_2$; $-C_6H_5$; $-(CH_2)_3-Cl$; $-CH_2-CH_2-NH(C_2H_5)_2$; $-SO_2-CH_2-CF_3$; $-CH_2-CH_2-H(CH_3)_2$; $-CH_2-CH_2-(CH_3)_3$; $-SO_3^-$. Grupos funcionales adicionalmente útiles incluyen grupos funcionales y grupos tresilo. Ha de entenderse que los grupos funcionales pueden estar inherentemente presentes en un ligando, o se pueden añadir al ligando por modificación química.

En algunas realizaciones, el ligando contiene un grupo amino. Estos incluyen por ejemplo, resina amino, tal como Toyopearl™ Amino-650M, Toyopearl™ Amino-AMN31, TSK-GEL™-Amino 750C, o equivalentes funcionales de los mismos. En algunas realizaciones, el ligando comprende un grupo fenilo. Estos incluyen, por ejemplo, TSK-GEL™ Phenyl-5PW o un equivalente funcional del mismo.

En algunas realizaciones, el ligando es un material polimérico, tal como resinas cromatográficas (por ejemplo, resinas amino), que se unen con selectividad y especificidad a las proteínas priónicas. Un ejemplo de resina cromatográfica son las Resinas de Reducción Priónicas PRDT (ProMetic Biosciences, Ltd, 211 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 0WA, Reino Unido). En algunas realizaciones, el material polimérico contiene uno o más grupos funcionales, tales como los grupos funcionales arriba descritos. En algunas realizaciones, el ligando es un material polimérico que tiene una cadena principal de metacrilato, tal como, pero no limitada a una resina TSK, TOYOPEARL o FACTOGEL comercialmente disponible (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA).

Otros ligandos que pueden utilizarse en métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, ligandos que interactúan con la placa amiloide, p. ej., Congo: E; Led (Ingrosso, L., et al., Congo Rojo: Prolonga el Periodo de Incubación en Hámsteres infectados con Tembladera. *Virology* 69:506-508 (1995)); 1,4-yodo,4-desoxi doxorubicina (Tagliavini, F., et al., Effectiveness of Anthracycline Against Experimental Prion Diseases in Syrian Hamsters. *Science* 276:1119-1122 (1997)); anfotericina 13, porfirinas y ftalocianinas (Priola, S.A., et al., Porphyrin and Phthalocyanine Antiscrapie Compounds, *Science* 287:1503-1506 (2000)); metales (Stocker et al., *Biochemistry*, 37, 7185-7193 (1998)); péptidos que interactúan con PrP para formar complejos (véase la Patente de EE.UU. 5.750.361 expedida a Prusiner et al. y Solo, C. et al., Reversion of Prion Protein Conformational Changes in Synthetic p-sheet Breaker Peptides, *Lances*, 355:192-197 (2000)); heparina y otros polianiones polisulfatados (Caughey, B., et al., Binding of the Protease-sensitive Form of Prion Protein PrP to Sulphated Glycosaminoglycan and Congo Red, *J. Virology* 68:2135-2141(1994)); anticuerpos (Kascsak, R.J., et al., Immunodiagnosis of Prion Disease, *Immunological Invest.* 26:259-268 (1997)); y otras proteínas, p. ej., plasminógeno (Fischer, M.B. et al., Binding of Disease-associated Prion Protein to: Plasminogen., *Nature* 408:479-483 (2000)).

Los ligandos pueden estar unidos a cualesquiera materiales de soporte. "Material de soporte" utilizado en esta memoria se refiere a cualquier compuesto o material que pueda proporcionar un medio físico o químico para separar el ligando y las proteínas unidas al mismo del resto de la composición. El material de soporte puede ser en partículas o no en partículas, soluble o insoluble, poroso o no poroso.

Ejemplos de materiales de soporte incluyen, pero no se limitan a polímeros que se producen de forma natural, p. ej., un polisacárido tal como agarosa, alginato, carragenano, quitina, celulosa, dextrano o almidón; polímeros sintéticos, tales como poli(acrilamida), poliestireno, poli(acroleína), poli(alcohol vinílico), polimetilacrilato, perfluorocarbono; compuestos inorgánicos, tales como sílice, vidrio, kieselguhr, alúmina, óxido de hierro u otros óxidos metálicos, o copolímeros que consisten en cualquier combinación de dos o más polímeros que se producen de forma natural, polímeros sintéticos o compuestos inorgánicos. También se contemplan materiales de soporte solubles que comprenden polímeros, tales como dextrano, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) o almidón hidrolizado que proporcionan conjugados de ligando y matriz de afinidad para su uso en la partición líquida.

En algunas realizaciones, el material de soporte es un soporte sólido, tal como una columna, una perla, una membrana, un cartucho, un filtro, una varilla de medición, una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, polvo sólido, un módulo moldeado por colada o extrusión, un malla, un material compuesto de partículas magnéticas o cualesquiera otros materiales sólidos. Los materiales sólidos pueden recubrirse con una sustancia, tal como polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, poli(acrilato), poli(tereftalato de etileno), rayón, nailon, poli(butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poli(aldehído), celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa y similares. Alternativamente, se utilizan sustancias que forman geles, tales como proteínas (p. ej., gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poli(acrilamidas). También se pueden utilizar polímeros, tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos, sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares. Los ligandos están unidos o dispersados a lo largo de los materiales de soporte.

En algunas realizaciones, el material de soporte es agarosa activada, sílice, celulosa, vidrio, metacrilato, metacrilato de hidroxietilo, poli(acrilamida), estirendivinilbenceno, Hyper D o perfluorocarbonos. En algunas realizaciones, el material de soporte es un material de metacrilato, del tipo vendido bajo el nombre comercial Toyopearl (disponible de Tosoh Bioscience LLC, 156 Keystone Drive, Montgomeryville, PA 18936, EE.UU.). El documento WO 97/10887 describe métodos para unir ligandos de afinidad a matrices de soporte, p. ej., el uso de métodos de activación, y métodos para unir el ligando de afinidad a una matriz a través de un espaciador, p. ej., mediante reacciones de condensación, para formar conjugados de ligando-matriz de afinidad.

En algunas realizaciones, los ligandos y/o materiales de soporte son reutilizables. En algunas realizaciones, los ligandos y/o materiales de soporte son para un solo uso.

La capacidad de unión a priones de un ligando puede evaluarse determinando el título infeccioso en un ligando. Por ejemplo, una serie de diluciones de un material de referencia se prepara y testa en el ensayo de transferencia Western estándar. Los títulos observados del material de referencia se comparan con los títulos correspondientes observados en un bioensayo. Los títulos de la transferencia Western se pueden convertir en títulos infecciosos utilizando la fórmula: $\text{Título}_{[\text{Bioensayo}]} = \text{Título}_{[\text{Transferencia Western}]} + (\text{intercepción de un análisis de regresión lineal})/(\text{pendiente de un análisis de regresión lineal})$. Una vez que se calcula el título infeccioso por ml, se puede determinar la proteína priónica total unida a la columna. La capacidad de la unión de priones de un ligando se determina utilizando la cantidad de proteína priónica observada directamente unida al ligando. En algunas realizaciones, la capacidad de la unión de priones de un ligando es al menos aproximadamente 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6,

7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,5 o 10,0 $\log_{10}$ DI₅₀ por ml de ligando. En algunas realizaciones, la capacidad de la unión de priones de un ligando es al menos aproximadamente 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 DI₅₀ por ml de ligando.

Método de preparar nanopartículas

- 5 Métodos de preparar composiciones que contienen albúminas y agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua son conocidos en la técnica. Por ejemplo, nanopartículas que contienen agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua y albúminas se pueden preparar bajo condiciones de fuerzas de alto cizallamiento (p. ej., tratamiento con ultrasonidos, homogeneización a alta presión, o similares). Estos métodos se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N°s 5.916.596; 6.506.405; 6.749.868 y 6.537.579 y también en las Pub. de Pat. de EE.UU. N°s 2005/0004002 y 2007/0082838, y la Publicación PCT WO99/00113.

En una realización a modo de ejemplo, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (p. ej., paclitaxel) se disuelve en un disolvente orgánico. Disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, cetonas, ésteres, éteres, disolventes clorados y otros disolventes conocidos en la técnica. Por ejemplo, el disolvente orgánico puede ser cloruro de metileno. En algunas realizaciones, el disolvente orgánico puede ser una mezcla de un disolvente inmiscible en agua (tal como cloroformo) y un disolvente miscible en agua (tal como un disolvente de alcohol miscible en agua, tal como cloroformo/metanol, cloroformo/etanol, cloroformo/propanol o cloroformo/t-butanol (por ejemplo, con una relación (v/v) de aproximadamente cualquiera de 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o 9:1 o con una relación (v/v) de aproximadamente cualquiera de 3:7, 5:7, 4:6, 5:5, 6:5, 8:5, 9:5, 9,5:5, 5:3, 7:3, 6:4 o 9,5:0,5). La solución se añade a una albúmina (p. ej., albúmina sérica humana). La mezcla se somete a homogeneización a alta presión (p. ej., utilizando dispositivos de homogeneización estándar). La emulsión puede ciclarse a través del homogeneizador de alta presión durante aproximadamente 2 a aproximadamente 100 ciclos, tal como aproximadamente 5 a aproximadamente 50 ciclos o aproximadamente 8 a aproximadamente 20 ciclos (p. ej., aproximadamente cualquiera de 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 ciclos). El disolvente orgánico se puede separar por evaporación utilizando un equipo adecuado conocido para este propósito, que incluye, pero no se limita a evaporadores rotativos, evaporadores de película fina, evaporadores de película descendente, evaporadores de película limpia, secadores por pulverización y similares. El disolvente puede separarse, por ejemplo, a presión reducida (tal como a aproximadamente as cualquiera de 5 mm de Hg, 10 mm de Hg, 15 mm de Hg, 20 mm de Hg, 25 mm de Hg, 30 mm de Hg, 40 mm de Hg, 50 mm de Hg, 100 mm de Hg, 200 mm de Hg o 300 mm de Hg). La cantidad de tiempo utilizada para separar el disolvente a presión reducida puede ajustarse en base al volumen de la formulación. Por ejemplo, para una formulación producida a una escala de 300 mL, el disolvente se puede separar a aproximadamente 1 a aproximadamente 300 mm de Hg (p. ej., aproximadamente cualquiera de 5-100 mm de Hg, 10-50 mm de Hg, 20-40 mm de Hg o 25 mm de Hg) durante aproximadamente 1 a aproximadamente 120 minutos, incluidos aproximadamente 5 a aproximadamente 60 minutos (p. ej., aproximadamente cualquiera de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 25 o 30 minutos).

Si se desea, la solución de albúmina (tal como la solución de albúmina separada con priones) se puede añadir a la dispersión para ajustar la relación de albúmina a fármaco (p. ej., paclitaxel) o para ajustar la concentración del taxano (p. ej., paclitaxel) en la dispersión. Por ejemplo, se puede añadir una solución de albúmina (p. ej., al 25% p/v) para ajustar la albúmina a una relación de agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (p. ej., paclitaxel) a aproximadamente cualquiera de 18:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7,5:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17 o 1:18. Por ejemplo, se añade una solución de albúmina (p. ej., al 25% p/v) u otra solución para ajustar la concentración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (p. ej., paclitaxel) en la dispersión a aproximadamente cualquiera de 0,5 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml o 50 mg/ml. La dispersión puede filtrarse individualmente o en serie a través de uno o más filtros, tales como filtros de 1,2 μ m, 0,8 μ m, 0,45 μ m y 0,22 μ m; combinaciones de dos o más de los mismos, o la combinación con cualquier otro filtro conocido en la técnica.

Si se desea, también se puede incluir en la composición una segunda terapia (p. ej., uno o más compuestos útiles para tratar el cáncer), un agente antimicrobiano (tal como citrato o edetato), azúcar (tal como sacarosa) y/o agente estabilizante. Este agente adicional puede mezclarse con el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (p. ej., paclitaxel) y/o la albúmina durante la preparación de la composición, o puede añadirse después de preparar la composición de nanopartículas. En algunas realizaciones, el agente se mezcla con la composición de nanopartículas antes de la liofilización. En algunas realizaciones, el agente se añade a la composición liofilizada. En algunas realizaciones, cuando la adición del agente cambia el pH de la composición, el pH en la composición se ajusta generalmente (pero no necesariamente) a un pH deseado. Valores de pH a modo de ejemplo de las composiciones incluyen, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 8,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición se ajusta a no menos de aproximadamente 6, que incluye, por ejemplo, no menos de cualquiera de aproximadamente 6,5, 7 u 8 (p. ej., aproximadamente 8).

Tal como se comenta más adelante con más detalle, el proceso de separación de priones puede llevarse a cabo simultáneamente con el proceso de fabricación. Por ejemplo, el proceso de separación de priones puede llevarse a cabo después de que se forme la mezcla de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua y antes de someter la mezcla a la condición de alto cizallamiento. En algunas realizaciones, el proceso de

separación de priones puede llevarse a cabo después de que la mezcla haya sido sometida a la condición de alto cizallamiento y antes de la separación del disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el proceso de separación de priones se lleva a cabo después de la separación del disolvente orgánico. En algunas realizaciones, se añade albúmina adicional a la suspensión post-evaporación antes del proceso de separación de priones. En algunas realizaciones, el proceso de separación de priones se lleva a cabo en condiciones estériles. En algunas realizaciones, el proceso de separación de priones se lleva a cabo utilizando un cartucho que filtra en condiciones estériles simultáneamente la composición.

Método de separar priones de composiciones de nanopartículas o composiciones intermedias

La presente invención, en un aspecto, proporciona métodos que comprenden separar proteínas priónicas de una composición de nanopartículas, tales como composiciones de nanopartículas formadas por métodos arriba descritos. En otro aspecto, se proporcionan métodos para separar proteínas priónicas de composiciones intermedias generadas durante el proceso de fabricación de nanopartículas (a las que se alude en lo sucesivo en esta memoria como "la composición intermedia").

En general, los métodos comprenden poner en contacto una composición que comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, y separar el ligando y la proteína unidos a la misma de la composición de nanopartículas. Este proceso puede repetirse una o más veces, con el mismo o diferente ligando. También se pueden utilizar dos o más ligandos simultáneamente durante el proceso de separación de priones.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas o la composición intermedia tiene una infectividad priónica de aproximadamente 100 UI-ic/ml, 90 UI-ic/ml, 50 UI-ic/ml o 10 UI-ic/ml.

- Durante el proceso de separación de priones, el ligando se pone en contacto con la composición de nanopartículas o composición intermedia y se le permite unirse a las proteínas priónicas en la composición de nanopartículas o la composición intermedia. Condiciones adecuadas para la unión pueden determinarse y optimizarse para facilitar la unión del ligando a una proteína priónica basándose en la naturaleza del ligando y su especificidad de unión a la proteína priónica. En algunas realizaciones, la unión se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 39 °C, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. La unión se puede llevar a cabo a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,5, aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,4 o aproximadamente 7. Opcionalmente, se pueden utilizar agentes de bloqueo para reducir la unión no específica al ligando.

Después de la etapa de contacto, el ligando y las proteínas unidas al mismo se separan del resto de la composición. La separación se puede llevar a cabo de diversas maneras, dependiendo de la naturaleza del ligando y el material de soporte (si lo hay) utilizado para facilitar la separación. Por ejemplo, el ligando y las proteínas unidas al mismo pueden separarse por cromatografía, tal como, pero no limitado a cromatografía de capa fina, en columna y discontinua; en soporte sólido y separación de membrana; separación en reactor; separación magnética, inmunoseparación; y separación coloidal.

En algunas realizaciones, el ligando puede estar inmovilizado sobre un soporte tal como una perla o una membrana, que a su vez se permite que entre en contacto con la composición de nanopartículas o la composición intermedia. Se permite que el soporte inmovilizado con ligando entre en contacto con la composición de nanopartículas o la composición intermedia bajo una condición suficiente para provocar la formación de un complejo prion-ligando. La fase sólida se separa luego de la composición, separando con ello la proteína priónica unida al ligando de la muestra. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, los ligandos se inmovilizan en una columna, tal como una columna de cromatografía, luego se hace pasar una muestra (tal como la composición de nanopartículas) a través de la columna debido a la fuerza de gravedad o bajo presión, tal como en una columna de cromatografía líquida de alta presión. Las proteínas priónicas en la muestra se unirán al ligando inmovilizado en la columna, y la muestra que pasa puede ser recogida. Este proceso puede repetirse varias veces para lograr el resultado deseado.

El caudal de una muestra (tal como la composición de nanopartículas) en una columna se puede ajustar para maximizar la unión del ligando y las proteínas priónicas en una muestra. En algunas realizaciones, la unión se lleva a cabo a un caudal de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 5,0 ml por minuto, de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 2,5 ml por minuto, de aproximadamente 0,1 ml por minuto a aproximadamente 0,25 ml por minuto, de aproximadamente 0,25 por minuto a aproximadamente 0,5 ml por minuto, de aproximadamente 0,5 ml por minuto a aproximadamente 1,0 ml por minuto, de aproximadamente 1,0 ml por minuto a aproximadamente 1,5 ml por minuto, de aproximadamente 1,5 ml por minuto a aproximadamente 2,0 ml por minuto, de aproximadamente 2,0 ml por minuto a aproximadamente 2,5 ml por minuto, de aproximadamente 2,5 ml por minuto a aproximadamente 3,0 ml por minuto, de aproximadamente 3,0 ml por minuto a aproximadamente 3,5 ml por minuto, de aproximadamente 3,5 ml por minuto a aproximadamente 4,0 ml por minuto, de aproximadamente 4,0 ml por minuto a aproximadamente 4,5 ml por minuto o de aproximadamente 4,5 ml por minuto a aproximadamente 5,0 ml por minuto, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 0,1 ml por minuto, 0,25 ml por minuto, 0,5 ml por minuto, 1,0 ml por minuto, 1,5 ml por minuto, 1,7 ml por minuto, 1,8 ml por minuto, 1,9 ml por minuto, 2,0 ml por minuto, 2,1 ml por minuto, 2,3 ml por minuto,

2,5 ml por minuto, 2,7 ml por minuto, 3,0 ml por minuto, 3,5 ml por minuto, 4,0 ml por minuto, 4,5 ml por minuto o 5,0 ml por minuto. En algunas realizaciones, el caudal es de al menos aproximadamente 10 ml por minuto, tal como al menos aproximadamente cualquiera de 20 ml por minuto, 30 ml por minuto, 40 ml por minuto, 50 ml por minuto.

- El volumen de flujo total o el tiempo de flujo total durante un proceso de unión también se puede ajustar para maximizar la unión del ligando y las proteínas priónicas en una muestra (tal como la composición de nanopartículas o la composición intermedia). En algunas realizaciones, el volumen de flujo total es de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 1000 veces el volumen de la columna, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 500 veces el volumen de la columna, aproximadamente 100 veces a aproximadamente 600 veces el volumen de la columna, o aproximadamente 200 veces a aproximadamente 800 veces el volumen de la columna.
- En algunas realizaciones, el volumen de flujo total es aproximadamente 100 veces el volumen de la columna. En otras realizaciones, el volumen de flujo total es aproximadamente 500 veces el volumen de la columna. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 30 horas, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 25 horas, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 20 horas o aproximadamente 3 horas a aproximadamente 17 horas. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es cualquiera de aproximadamente 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas o 20 horas. En algunas realizaciones, el tiempo total de flujo es más de aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, el tiempo de flujo total es inferior a aproximadamente 8, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5 horas.

- Alternativamente, el ligando puede ponerse primero en contacto con la composición de nanopartículas o la composición intermedia, bajo una condición suficiente para provocar la formación de un complejo prion-ligando. El complejo prion-ligando se separa posteriormente utilizando una columna, tal como una cromatografía basada en afinidad. Para facilitar la separación, el ligando puede conjugarse con un participante en la unión, de modo que el complejo ligando/prion pueda separarse utilizando una columna de afinidad que contiene una molécula que reconoce al participante en la unión.

- Además de la cromatografía discontinua o en columna, también se prevé una diversidad de configuraciones, modificaciones y variaciones del uso de los ligandos para unir proteínas priónicas. Variaciones y modificaciones de este tipo incluyen, pero no se limitan a: procedimientos discontinuos, procedimientos continuos, procedimientos de cromatografía en lecho móvil; procedimientos a baja, media o alta presión; o procedimientos a pequeña, mediana o gran escala. En algunas realizaciones, los ligandos están en una membrana, perla de fibras, impregnados en una malla no tejida o fibras de revestimiento contenidas dentro de una carcasa de filtro.

- En algunas realizaciones, la etapa de separación no da como resultado significativamente una pérdida de rendimiento y/o un cambio en la propiedad y/o estabilidad de la albúmina. Para fines prácticos, la recuperación de la albúmina en su estado biológico original debería mantenerse sustancialmente al menos a un nivel superior al 50%, incluido, por ejemplo, 80% o 90%, o más. En algunas realizaciones, la tasa de recuperación de albúmina del proceso de priones es mayor que cualquiera de aproximadamente 80%, 90%, 95% o 99%. En algunas realizaciones, la concentración de albúmina en la composición de nanopartículas se ajusta o controla antes de la etapa de separación de priones con el fin de minimizar la unión no específica y la pérdida de albúmina durante el proceso. Por ejemplo, la concentración de albúmina puede estar en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%, etc., incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% de albúmina.

- En algunas realizaciones, la etapa de separación no da como resultado significativamente una pérdida de rendimiento y/o un cambio en la propiedad y/o estabilidad de las nanopartículas en la composición.

En algunas realizaciones, la etapa de separación no da como resultado significativamente una pérdida de rendimiento y/o un cambio en la propiedad o carga del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición.

- En algunas realizaciones, la etapa de separación no da como resultado significativamente un cambio en la relación de albúmina al agente farmacológico sustancialmente insoluble en agua en la composición.

La composición separada de priones se puede analizar para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. El ligando con proteínas priónicas unidas también puede analizarse (directamente o después de la elución) para determinar la tasa de eliminación.

- La separación de la proteína priónica se puede determinar en base a la reducción en el nivel de proteína priónica y/o una reducción en la infectividad. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50%, que incluye, por ejemplo, al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de las proteínas priónicas se separan de la composición de nanopartículas. En algunas realizaciones, la infectividad de la composición de albúmina post-

separación es al menos aproximadamente 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 80x, 100x, 200x, 500x, 1000x, 10⁴x, 10⁵x, 10⁶x menor que la de la composición de nanopartículas.

En algunas realizaciones, la infectividad en serie se utiliza para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. Se realizan diluciones en serie de una muestra y se examinan las diluciones en busca de actividad infecciosa, por ejemplo en un animal de ensayo. La dilución a la que la mitad de los animales se infectan es el título infeccioso. Por ejemplo, si se requiere una dilución de 5 veces, la muestra puede definirse como que tiene 5 logs de infectividad. Al comparar el log de infectividad de la composición de nanopartículas y la de la composición de nanopartículas post-separación, se puede determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. En algunas realizaciones, el método de separación de priones da como resultado una reducción de uno cualquiera de 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 o 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 logs de infectividad.

En algunas realizaciones, la tasa de eliminación del proceso de separación de priones se determina en base a pruebas de adición con materiales infecciosos siguiendo las etapas descritas en esta memoria para el método de separación de priones. Agentes de adición adecuados incluyen, pero no se limitan a, homogeneizados del cerebro, microsomas, dominios similares a caveolas, PrPsc purificado y fibrillas de priones. En algunas realizaciones, el agente de adición está solubilizado con detergente (tal como solubilizado con sarkosyl). En algunas realizaciones, la relación de adición en la composición está en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,25%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1%, de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,005%, de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,075%, de aproximadamente 0,075% a aproximadamente 0,01%, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 0,75%, de aproximadamente 0,75% a aproximadamente 1%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 3% o de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 0,001%, 0,005%, 0,075%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 3% o 5%.

En algunas realizaciones, los factores de reducción (RF) se utilizan para determinar la tasa de eliminación del proceso de separación de priones. Los RF se pueden calcular utilizando la fórmula:

$$RF = (V_1 \times T_1) / (V_2 \times T_2)$$

o

$$\text{Log}_{10}[RF] = [\text{Log}_{10}(V_1) + \text{Log}_{10}(T_1)] - [\text{Log}_{10}(V_2) + \text{Log}_{10}(T_2)].$$

En donde V₁ y T₁ son el volumen y el título de la composición de albúmina inicial, respectivamente, y V₂ y T₂ son el volumen y el título de la composición de albúmina post-separación. Los factores de reducción pueden redondearse a 1 decimal después del cálculo final. En algunas realizaciones, un factor de reducción de al menos aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 u 8,0 log₁₀ de infectividad de las proteínas priónicas se separa de la composición de albúmina inicial. Por ejemplo, la proteína priónica puede separarse mediante un factor de reducción mayor que o igual a 2,5 log₁₀ en una fracción solubilizada de sarkosyl al 0,5% añadida a una composición de albúmina al 20%. Como otro ejemplo, la proteína priónica puede también separarse mediante un factor de reducción mayor que o igual a 2,0 log₁₀ en una fracción solubilizada de sarkosyl al 0,5% añadida a una composición de albúmina al 25%.

La separación de priones se puede evaluar mediante análisis de transferencia Western estándar. Por ejemplo, los ligandos post-únion pueden tratarse primero con Proteinasa K, que digiere todo PrPc pero no PrPsc. La digestión se procesa entonces en gel SDS y se transfiere a una lámina de nitrocelulosa o membrana de PVDF. Las bandas separadas de PrPsc se visualizan luego utilizando 3F4 o 6H4. 3F4 reacciona con los residuos 109-112 PrP de seres humanos, hámsteres y felinos. En una realización as modo de ejemplo, la incubación se llevó a cabo a una concentración de 0,6 ug/ml durante un mínimo de una hora, después de lo cual se eliminó por lavado el exceso de anticuerpo y las membranas se incubaron con un conjugado de peroxidasa de rábano picante anti-ratón de conejo (dilución 1:1000) durante un mínimo de una hora. Después de un lavado extenso con TTBS, las membranas se desarrollaron utilizando quimioluminiscencia potenciada. En algunas realizaciones, la separación de proteínas priónicas se evalúa de acuerdo con la Guía para la Investigación de Procesos de Fabricación de Medicamentos Derivados de Plasma con respecto al Riesgo de vCJD (CPMP5136/03).

También se contemplan en esta memoria composiciones hechas durante el proceso de separación de priones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, se proporciona una mezcla que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, y un ligando capaz de unirse a una proteína priónica unida a un material de soporte, tal como uno o más materiales de soporte descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, se proporciona una columna cargada con una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la columna comprende un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden

albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, y una resina que comprende un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, y una resina DVR. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, y una resina PRDT.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una mezcla de una solución acuosa de albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una mezcla de una solución acuosa de albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico, y un ligando capaz de unirse a una proteína priónica unida a un material de soporte, tal como uno o más materiales de soporte descritos en esta memoria. En algunas realizaciones, se proporciona una columna cargada con una composición que comprende una mezcla de una solución acuosa de albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico, en donde la columna comprende un ligando capaz de unirse a una proteína priónica.

También se describen composiciones hechas por métodos descritos en esta memoria. La composición en algunos ejemplos es bioequivalente a una composición no sujeta al proceso de separación de priones.

Composiciones de nanopartículas

Las composiciones de nanopartículas descritas en esta memoria comprenden nanopartículas que comprenden (en diversas realizaciones que consisten esencialmente en) albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (tal como paclitaxel). Las nanopartículas de fármacos poco solubles en agua (tales como taxano) se han descrito, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N°s 5.916.596; 6.506.405; 6.749.868 y 6.537.579 y también en las Pub. de Pat. de EE.UU. N°s 2005/0004002 y 2007/0082838, y la Solicitud de Patente PCT WO08/137148.

En algunas realizaciones, la composición comprende nanopartículas con un diámetro promedio o medio de no más de aproximadamente 1000 nanómetros (nm), tal como no más de aproximadamente cualquiera de 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 nm. En algunas realizaciones, los diámetros promedio o medio de las nanopartículas no son mayores que aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, los diámetros promedio o medio de las nanopartículas no son mayores que aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones, los diámetros promedio o medio de las nanopartículas no son mayores que aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, los diámetros promedio o medio de las nanopartículas son de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nm. En algunas realizaciones, el diámetro promedio o medio de las nanopartículas es de aproximadamente 40 a aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas son filtrables en condiciones estériles.

En algunas realizaciones, las nanopartículas en la composición descrita en esta memoria tienen un diámetro promedio no mayor que aproximadamente 200 nm, que incluye, por ejemplo, no mayor que aproximadamente uno cualquiera de 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70 o 60 nm. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente uno cualquiera del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de todas las nanopartículas en la composición tienen un diámetro no mayor que aproximadamente 200 nm, incluyendo, por ejemplo, no mayor que aproximadamente uno cualquiera de 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70 o 60 nm. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50% (por ejemplo, al menos uno cualquiera del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%) de todas las nanopartículas en la composición caen dentro del intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 nm, incluyendo, por ejemplo, uno cualquiera de aproximadamente 30 a aproximadamente 180 nm, y uno cualquiera de aproximadamente 40 a aproximadamente 150, aproximadamente 50 a aproximadamente 120 y aproximadamente 60 a aproximadamente 100 nm.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 5% (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente uno cualquiera de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%) de la albúmina en la porción de nanopartículas de la composición está reticulado (por ejemplo, reticulado a través de uno o más enlaces disulfuro).

En algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (tal como paclitaxel) recubierto con una albúmina (p. ej., albúmina de suero humano). En algunas realizaciones, la composición comprende un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua no en forma de nanopartículas, en donde al menos aproximadamente uno cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición está en forma de nanopartículas. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en las nanopartículas constituye más de aproximadamente uno cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las nanopartículas en peso. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen una matriz no polimérica. En algunas realizaciones, las nanopartículas comprenden un núcleo de agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua que está sustancialmente exento de materiales poliméricos (tal como una matriz polimérica).

En algunas realizaciones, la composición comprende albúmina en porciones tanto de nanopartículas como de no nanopartículas de la composición, en donde al menos aproximadamente una cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de la albúmina en la composición está en la porción no nanopartícula de la composición.

- En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está sustancialmente exenta (tal como exenta) de tensioactivos (tal como Cremophor®, Tween 80, o cualesquiera otros disolventes orgánicos utilizados para la administración de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua). En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas contiene menos de aproximadamente uno cualquiera de 20%, 15%, 10%, 7,5%, 5%, 2,5%, 1% o menos de disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición de nanopartículas es de aproximadamente 18:1 o menos, tal como aproximadamente 15:1 o menos, por ejemplo aproximadamente 10:1 o menos. En algunas realizaciones, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición cae dentro del intervalo de uno cualquiera de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 18:1, aproximadamente 2:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 3:1 a aproximadamente 13:1, aproximadamente 4:1 a aproximadamente 12:1, aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1. En algunas realizaciones, la relación ponderal de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la porción de nanopartículas de la composición es aproximadamente uno cualquiera de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15 o menos. En algunas realizaciones, la relación ponderal de la albúmina (tal como albúmina de suero humano) y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición es una cualquiera de las siguientes: aproximadamente 1:1 a aproximadamente 18:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 12:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 9:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 8:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 7:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 6:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 3:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1, o aproximadamente 1:1.
- En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas comprende una o más de las características anteriores.

- Las nanopartículas descritas en esta memoria pueden estar presentes en una formulación seca (tal como una composición liofilizada) o suspendidas en un medio biocompatible. Medios biocompatibles adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, medios acuosos tamponados, solución salina, solución salina tamponada, soluciones de aminoácidos opcionalmente tamponadas, soluciones de proteínas opcionalmente tamponadas, soluciones de azúcares opcionalmente tamponadas, soluciones de vitaminas opcionalmente tamponadas, soluciones de tampones opcionalmente tamponadas de polímeros sintéticos, emulsiones que contienen lípidos y similares.

- En algunas realizaciones, el soporte farmacéuticamente aceptable comprende albúmina sérica humana. La albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) es una proteína globular altamente soluble de Mr 65K y consiste en 585 aminoácidos. HSA es la proteína más abundante en el plasma y representa el 70-80% de la presión osmótica coloidal del plasma humano. La secuencia de aminoácidos de HSA contiene un total de 17 puentes disulfuro, un tiol libre (Cys 34) y un solo triptófano (Trp 214). El uso intravenoso de la solución de HSA ha sido indicado para la prevención y el tratamiento del choque hipovolumétrico y en unión con la transfusión de intercambio en el tratamiento de la hiperbilirrubinemia neonatal. Se contemplan otras albúminas, tal como la albúmina de suero bovino. El uso de albúminas no humanas de este tipo podría ser apropiado, por ejemplo, en el contexto del uso de estas composiciones en mamíferos no humanos, tal como el veterinario (incluyendo mascotas domésticas y el contexto agrícola).

- La albúmina sérica humana (HSA) tiene múltiples sitios de unión hidrofóbicos (un total de ocho para ácidos grasos, un ligando endógeno de HSA) y se une a un conjunto diverso de agentes farmacológicamente activos sustancialmente insolubles en agua, especialmente compuestos hidrofóbicos neutros y con carga negativa. Se han propuesto dos sitios de unión de alta afinidad en los subdominios IIA y IIIA de HSA, que son bolsas hidrofóbicas altamente alargadas con residuos de lisina y arginina cargados cerca de la superficie que funcionan como puntos de unión para las características del ligando polar.

- La albúmina en la composición sirve generalmente como soporte para el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua, es decir, la albúmina en la composición hace que el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua se suspenda más fácilmente en un medio acuoso o ayuda a mantener la suspensión en comparación con las composiciones que no comprenden una albúmina. Esto puede evitar el uso de disolventes (o tensioactivos) tóxicos para solubilizar el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, y con ello puede reducir uno o más efectos secundarios de la administración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en un individuo (tal como un ser humano). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición descrita en esta memoria está sustancialmente exenta (tal como exenta) de tensioactivos, tales como Cremophor (incluyendo Cremophor EL® (BASF)). En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas está sustancialmente exenta (tal como exenta) de tensioactivos. Una composición está "sustancialmente exenta de Cremophor" o "sustancialmente exenta de tensioactivo" si la cantidad de Cremophor o tensioactivo en la composición no es suficiente para provocar uno o más efectos secundarios en un individuo cuando la composición de nanopartículas se administra al individuo.

La cantidad de albúmina en la composición descrita en esta memoria variará dependiendo de otros componentes en la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende una albúmina en una cantidad que es suficiente para estabilizar el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en una suspensión acuosa, por ejemplo, en forma de una suspensión coloidal estable (tal como una suspensión estable de nanopartículas). En algunas realizaciones, la albúmina está en una cantidad que reduce la tasa de sedimentación del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en un medio acuoso. Para composiciones que contienen partículas, la cantidad de la albúmina también depende del tamaño y la densidad de las nanopartículas del agente farmacológicamente activo. sustancialmente insoluble en agua.

Un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua está "estabilizado" en una suspensión acuosa si permanece suspendido en un medio acuoso (tal como sin precipitación o sedimentación visible) durante un período de tiempo prolongado, tal como por lo menos durante aproximadamente cualquiera de 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48, 60 o 72 horas. La suspensión es generalmente, pero no necesariamente, adecuada para la administración a un individuo (tal como un ser humano). La estabilidad de la suspensión se evalúa generalmente (pero no necesariamente) a una temperatura de almacenamiento (como la temperatura ambiente (tal como 20-25 °C) o en condiciones refrigeradas (tal como 4 °C)). Por ejemplo, una suspensión es estable a una temperatura de almacenamiento si no exhibe floculación o aglomeración de partículas visibles a simple vista o cuando se observa bajo el microscopio óptico a 1000 aumentos, aproximadamente quince minutos después de la preparación de la suspensión. La estabilidad también se puede evaluar en condiciones de ensayo aceleradas, tal como a una temperatura superior a aproximadamente 40 °C.

En algunas realizaciones, la albúmina está presente en una cantidad que es suficiente para estabilizar el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en una suspensión acuosa a una determinada concentración. Por ejemplo, la concentración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml, que incluye, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 5 mg /ml. En algunas realizaciones, la concentración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es al menos aproximadamente cualquiera de 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml y 50 mg/ml. En algunas realizaciones, la albúmina está presente en una cantidad que evita el uso de tensioactivos (tal como Cremophor), de modo que la composición está exenta o sustancialmente exenta de tensioactivo (tal como Cremophor).

En algunas realizaciones, la composición, en forma líquida, comprende de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50% (p/v) (p. ej., aproximadamente 0,5% (p/v), aproximadamente 5% (p/v), aproximadamente 10% (p/v), aproximadamente 15% (p/v), aproximadamente 20% (p/v), aproximadamente 25% (p/v), aproximadamente 30% (p/v), aproximadamente 40% (p/v) o aproximadamente 50% (p/v)) de albúmina. En algunas realizaciones, la composición, en forma líquida, comprende aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5% (p/v) de albúmina.

En algunas realizaciones, la relación ponderal de albúmina, p. ej., albúmina, al agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua en la composición de nanopartículas es tal que una cantidad suficiente de agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua se une a o es transportada por la célula. Si bien la relación ponderal de albúmina a agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua tendrá que optimizarse para diferentes combinaciones de albúmina y agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, generalmente la relación ponderal de albúmina, p. ej., albúmina, a agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua (p/p) es aproximadamente 0,01:1 a aproximadamente 100:1, aproximadamente 0,02:1 a aproximadamente 50:1, aproximadamente 0,05:1 a aproximadamente 20:1, aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 20:1, aproximadamente 1:1 a aproximadamente 18:1, aproximadamente 2:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 3:1 a aproximadamente 12:1, aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1 o aproximadamente 9:1. En algunas realizaciones, la relación ponderal de albúmina a agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua es aproximadamente cualquiera de 18:1 o menos, 15:1 o menos, 14:1 o menos, 13:1 o menos, 12:1 o menos, 11:1 o menos, 10:1 o menos, 9:1 o menos, 8:1 o menos, 7:1 o menos, 6:1 o menos, 5:1 o menos, 4:1 o menos y 3:1 o menos.

En algunas realizaciones, la albúmina permite que la composición se administre a un individuo (tal como un ser humano) sin efectos secundarios significativos. En algunas realizaciones, la albúmina está en una cantidad que es efectiva para reducir uno o más efectos secundarios de la administración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua a un ser humano. La expresión "reducir uno o más efectos secundarios de la administración del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua" se refiere a la reducción, el alivio, la eliminación o evitación de uno o más efectos indeseables provocados por el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, así como los efectos secundarios provocados por los vehículos de suministro (tales como disolventes que hacen que los agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua sean adecuados para inyección) utilizados para suministrar el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua. Efectos secundarios de este tipo incluyen, por ejemplo, mielosupresión, neurotoxicidad, hipersensibilidad, inflamación, irritación venosa, flebitis, dolor, irritación de la piel, neuropatía periférica, fiebre neutropénica, reacción anafiláctica, trombosis venosa, extravasación y combinaciones de los mismos. Sin

embargo, estos efectos secundarios son meramente a modo de ejemplo y se pueden reducir otros efectos secundarios, o una combinación de efectos secundarios, asociados con agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua.

En algunas realizaciones, la composición comprende Abraxane® (o Nab-paclitaxel). En algunas realizaciones, la composición es Abraxane® (o Nab-paclitaxel). Abraxane® es una formulación de paclitaxel estabilizada por la albúmina humana USP, que puede dispersarse en una solución fisiológica directamente inyectable. Cuando se dispersa en un medio acuoso adecuado, tal como una inyección de cloruro de sodio al 0,9% o una inyección de dextrosa al 5%, Abraxane™ forma una suspensión coloidal estable de paclitaxel. El tamaño medio de partícula de las nanopartículas en la suspensión coloidal es de aproximadamente 130 nanómetros. Dado que HSA es libremente soluble en agua, Abraxane™ puede reconstituirse en un amplio intervalo de concentraciones que oscilan desde diluido (0,1 mg/ml de paclitaxel) hasta concentrado (20 mg/ml de paclitaxel), que incluye, por ejemplo, aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml.

Agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua

Las composiciones descritas en esta memoria comprenden agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua, según se reivindican y proporcionan más adelante. Por ejemplo, la solubilidad en agua del agente poco soluble en agua a aproximadamente 20-25 °C puede ser inferior a aproximadamente 10 mg/ml, que incluye, por ejemplo, inferior a aproximadamente cualquiera de 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 o 0,01 mg/ml. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un sólido. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua es un líquido.

Agentes farmacéuticos descritos en esta memoria son agentes anti-cáncer o antineoplásicos, agentes antimicrotúbulos, agentes inmunosupresores, anestésicos, hormonas, agentes para uso en trastornos cardiovasculares, antiarrítmicos, antibióticos, antifúngicos, antihipertensivos, antiasmáticos, agentes antiinflamatorios, agentes anti-artríticos, agentes vasoactivos, analgésicos/antipiréticos, antidepresivos, antidiabéticos, agentes antifúngicos, antiinflamatorios, agentes ansiolíticos, agentes inmunosupresores, agentes antimigrañosos, sedantes, agentes antianginosos, agentes antipsicóticos, agentes antimaníacos, agentes antiartríticos, agentes antigota, anticoagulantes, anticoagulantes, agentes trombolíticos, agentes antifibrinolíticos, agentes hemorreológicos, agentes antiplaquetarios, anticonvulsivos, agentes antiparkinson, antihistamínicos/antipruríticos, agentes útiles para la regulación del calcio, agentes antivirales, antimicrobianos, antiinfecciosos, broncodilatadores, hormonas, agentes hipoglucémicos, agentes hipolipidémicos, agentes antiulcerosos/antirreflujo, antinauseantes/antieméticos y vitaminas solubles en aceite (p. ej., vitaminas A, D, E, K y similares).

En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es uno cualquiera de los siguientes: un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de la serie/treonina quinasa, un inhibidor de hedgehog, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor en el ensamblaje de microtúbulos, un inhibidor de la vía AKT quinasa, un inhibidor del proteasoma, un antimetabolito y un agente basado en platino.

En algunos ejemplos, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un agente antineoplásico. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un agente quimioterapéutico.

Los agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua proporcionados en esta memoria son taxanos (tales como paclitaxel, docetaxel, ortataxel y otros taxanos), epotilonas, camptotecinas, colchicinas, geladanamicinas, amiodarona, hormonas tiroideas, anfotericina, corticosteroides, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina (sirolimus) y derivados, tacrolimus, ácidos micofenólicos, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina o agentes de radiocontraste de diagnóstico. Otros agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N°s 5.916.596, 6.096.331, 6.749.868 y 6.537.539. Ejemplos adicionales de agentes farmacológicamente activos, sustancialmente insolubles en agua incluyen los compuestos que son poco solubles en agua y que se enumeran en "Therapeutic Category and Biological Activity Index" de The Merck Index (12ª Edición, 1996).

En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es cualquiera de (y en algunas realizaciones seleccionado del grupo que consiste en) paclitaxel, docetaxel, CY196, ortataxel u otro taxano, 17-alil amino geldanamicina (17-AAG), geldanamicina 18-derivatizada, camptotecina, propofol, amiodarona, ciclosporina, epotilona, radicicol, combretastatina, rapamicina, anfotericina, liotironina, epotilona, colchicina, tiocolchicina y sus dímeros, hormona tiroidea, corticosteroides, melatonina, tacrolimus, ácidos micofenólicos o epotilonas. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es cualquiera de (y en algunas realizaciones seleccionado del grupo que consiste en) paclitaxel, docetaxel, CY196, ortataxel u otros taxanos, geldanamicina, 17-alil amino geldanamicina, tiocolchicina y sus dímeros, rapamicina, ciclosporina o epotilona. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es rapamicina. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es 17-AAG. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un dímero de tiocolchicina (tal como IDN5404). En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un taxano. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo,

sustancialmente insoluble en agua es paclitaxel. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es docetaxel. En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es CY196.

5 En algunas realizaciones, el agente farmacológicamente activo sustancialmente insoluble en agua es un taxano, que incluye, pero no se limita a paclitaxel, docetaxel e IDN5109 (ortataxel). En algunas realizaciones, la composición comprende un taxano no cristalino y/o amorfo (tal como paclitaxel o un derivado del mismo). En algunas realizaciones, la composición se prepara utilizando un taxano anhidro (tal como docetaxel anhidro o un derivado del mismo). Se ha demostrado que docetaxel anhidro produce una formulación más estable que la que se puede hacer con un docetaxel hidratado tal como docetaxel trihidrato o hemihidrato.

10 Otros componentes en las composiciones de nanopartículas

Las nanopartículas descritas en esta memoria pueden estar presentes en una composición que incluye otros agentes, excipientes o estabilizadores. Por ejemplo, para aumentar la estabilidad al aumentar el potencial zeta negativo de las nanopartículas, se pueden añadir determinados componentes cargados negativamente. Componentes cargados negativamente de este tipo incluyen, pero no se limitan a, sales biliares de ácidos biliares que consisten en ácido glicocólico, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido tauroquenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido deshidrocólico y otros; fosfolípidos, incluyendo fosfolípidos basados en lecitina (yema de huevo), que incluyen las siguientes fosfatidilcolinas: palmitoileoilfosfatidilcolina, palmitoillinoileoilfosfatidilcolina, estearoillinoileoilfosfatidilcolina, estearoileoilfosfatidilcolina, estearoilaraquidilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina. Otros fosfolípidos que incluyen L- α -dimiristilfosfatidilcolina (DMPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), diestearilfosfatidilcolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y otros compuestos relacionados. Tensioactivos o emulsionantes cargados negativamente también son adecuados como aditivos, p. ej., colessterol sulfato de sodio y similares.

En algunas realizaciones, la composición es adecuada para la administración a un ser humano. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para la administración a un mamífero tal como, en el contexto veterinario, mascotas domésticas y animales utilizados en agricultura. Existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de la composición de nanopartículas (véanse, p. ej., las Pat. de EE.UU. N°s 5.916.596 y 6.096.331). Las siguientes formulaciones y métodos son meramente a modo de ejemplo y de ninguna manera son limitantes. Formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja, (b) cápsulas, bolsitas o tabletas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, tal como sólidos o gránulos, (c) suspensiones en un líquido apropiado y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de tabletas pueden incluir uno o más de lactosa, manitol, almidón de maíz, fécula de patata, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones, geles y similares que contienen, además del ingrediente activo, excipientes como se conocen en la técnica.

Ejemplos de soportes, excipientes y diluyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, metil- y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes.

Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea compatible con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita previamente. Se prefieren formulaciones inyectables.

En algunas realizaciones, la composición se formula para tener un intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,0, que incluye, por ejemplo, intervalos de pH de cualquiera de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 y de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la composición se formula a no menos de aproximadamente 6, que incluye, por ejemplo, no menos de cualquiera de aproximadamente 6,5, 7 u 8 (tal como aproximadamente 8). La composición también se puede hacer que sea isotónica con la sangre mediante la adición de un modificador de tonicidad adecuado, tal como glicerol.

Método de utilizar composiciones de nanopartículas exentas de priones

También se describen métodos de utilizar las composiciones exentas de priones descritas en esta memoria. Por ejemplo, en esta memoria se describe un método para administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. Por ejemplo, también se describe en esta memoria un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer), que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica.

Por ejemplo, también se describe en esta memoria un método para administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el proceso de separación de priones comprende, además, separar dicho ligando y proteínas unidas al mismo de dicha composición de albúmina. Por ejemplo, también se describe en esta memoria un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer) en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la albúmina en la composición se obtuvo por un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica.

En algunos ejemplos, el individuo tiene vCJD. En algunos ejemplos, el individuo ya ha sido infectado con una proteína priónica. En algunos ejemplos, se sospecha que el individuo tiene vCJD o está infectado con una proteína priónica. En algunos ejemplos, el individuo es un portador asintomático de una proteína priónica. En algunos ejemplos, el individuo ha recibido una transfusión de sangre al menos una vez. En algunos ejemplos, el individuo tiene al menos 60 años, tal como al menos aproximadamente 65, 70 o 75 años. En algunas realizaciones, el individuo está comprometido con la inmunidad. En algunos ejemplos, el individuo es un paciente de cáncer.

La expresión "cantidad efectiva", utilizada en esta memoria, se refiere a una cantidad de un compuesto o composición suficiente para tratar un trastorno, afección o enfermedad especificado, tal como mejorar, paliar, disminuir y/o retrasar uno o más de sus síntomas. En referencia a cánceres u otra proliferación celular no deseada, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se reduzca y/o disminuya la tasa de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor). En algunas realizaciones, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para prevenir la aparición y/o recurrencia. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones.

Cánceres a tratar mediante las composiciones descritas en esta memoria (tal como una composición que comprende un agente antineoplásico tal como taxano, rapamicina y 17-AAG) incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante las composiciones descritas en esta memoria incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma del pulmón escamoso, incluido el NSCLC escamoso), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluido el cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático (tal como el cáncer pancreático avanzado), glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado (tal como el carcinoma hepatocelular), cáncer de vejiga, heptoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata (tal como cáncer de próstata avanzado), cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer rectal, sarcoma de tejido blando, sarcoma de Kaposi, linfoma de células B (incluyendo linfoma no Hodgkin folicular de bajo grado (NHL, por sus siglas en inglés), NHL linfocítico pequeño (SL, por sus siglas en inglés), NHL folicular de grado intermedio, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), mieloma, leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD, por sus siglas en inglés), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores del cerebro) y síndrome de Meigs. En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar el cáncer metastásico (es decir, el cáncer que ha hecho metástasis del tumor primario). En algunos ejemplos, se proporciona un método para reducir la proliferación celular y/o la migración celular. En algunos ejemplos, se proporciona un método para tratar la hiperplasia.

Por ejemplo, en esta memoria se describen métodos para tratar el cáncer en fase(s) avanzada(s). Por ejemplo, en esta memoria también se describen métodos para tratar el cáncer de mama (que puede ser HER2 positivo o HER2 negativo), que incluyen, por ejemplo, cáncer de mama avanzado, cáncer de mama en estadio IV, cáncer de mama localmente avanzado y cáncer de mama metastásico. En algunos ejemplos, el cáncer es cáncer de pulmón, que incluye, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, tal como NSCLC avanzado), cáncer de

- pulmón de células pequeñas (SCLC, tal como SCLC avanzado) y neoplasia de tumor sólido avanzado en el pulmón. En algunos ejemplos, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias gástricas, melanoma (incluido melanoma metastásico), cáncer colorrectal, cáncer pancreático y tumores sólidos (tales como tumores sólidos avanzados). En algunas realizaciones, el cáncer es cualquiera de (y en algunas realizaciones seleccionado del grupo que consiste en) cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas y mieloma múltiple. En algunos ejemplos, el cáncer es un tumor sólido.
- 10 El individuo adecuado para recibir estas composiciones depende de la naturaleza del agente farmacéutico poco soluble en agua, así como de la enfermedad/afección/trastorno a tratar y/o prevenir. Por consiguiente, el término individuo incluye cualquiera de los vertebrados, mamíferos y seres humanos. En algunos ejemplos, el individuo es un mamífero, que incluye, pero no se limita a, ser humano, bovino, equino, felino, canino, roedor o primate. En algunos ejemplos, el individuo es un ser humano.
- 15 La dosis de la composición de la invención administrada a un individuo (tal como un ser humano) variará con la composición particular, el método de administración y la enfermedad particular que esté siendo tratada. La dosis debe ser suficiente para lograr una respuesta deseable, tal como una respuesta terapéutica o profiláctica contra una enfermedad particular. Por ejemplo, la dosis de paclitaxel en la composición puede estar en el intervalo de 100-400 mg/m² cuando se administra en un programa de 3 semanas, o 50-250 mg/m² cuando se administra en un programa
- 20 semanal. Además, si se administra en un régimen metronómico (p. ej., diariamente o algunas veces por semana), la dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente 5-75 mg/m².
- 25 Las composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse a un individuo (tal como un ser humano) a través de diversas rutas, que incluyen, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intrapulmonar, intraportal, intrahepática, oral, por inhalación, intravesicular, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intraocular, intratecal, transmucosal y transdérmico. Por ejemplo, la composición de la invención puede administrarse por inhalación para tratar afecciones del tracto respiratorio. La composición puede utilizarse para tratar afecciones respiratorias tales como fibrosis pulmonar, bronqueolitis obliterante, cáncer de pulmón, carcinoma broncoalveolar y similares.
- En algunos ejemplos, la administración de la composición se realiza junto con un filtro de separación de priones.
- 30 En esta memoria se describen también métodos para reducir los efectos secundarios asociados con la administración de la composición de nanopartículas. Por ejemplo, en esta memoria se describen métodos para reducir diversos efectos secundarios asociados con la administración del agente farmacéutico poco soluble en agua, que incluyen, pero no se limitan a, mielosupresión, neurotoxicidad, hipersensibilidad, inflamación, irritación venosa, flebitis, dolor, irritación de la piel, neuropatía periférica, fiebre neutropénica, reacción anafiláctica, toxicidad hematológica y toxicidad cerebral o neurológica, y sus combinaciones. En esta memoria se describe también un método para reducir las
- 35 reacciones de hipersensibilidad asociadas con la administración del agente farmacéutico poco soluble en agua, que incluye, por ejemplo, erupciones cutáneas severas, urticaria, enrojecimiento, disnea, taquicardia y otros.
- Kits y sistemas
- 40 En esta memoria se describen también kits para uso en los presentes métodos. Los kits incluyen uno o más recipientes que comprenden las composiciones de nanopartículas exentas de priones y, en algunas realizaciones, comprenden, además, instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. El kit puede comprender, además, una descripción de selección de un individuo adecuado o tratamiento. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero las instrucciones legibles por máquina (p. ej., instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico) también son aceptables.
- 45 Los kits están en un envase adecuado. Envases adecuados incluyen, pero no se limitan a viales, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., Mylar sellado o bolsas de plástico) y similares. Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tales como tampones e información interpretativa.
- 50 Las instrucciones relacionadas con el uso de las composiciones de nanopartículas generalmente incluyen información sobre la dosificación, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (p. ej., envases multidosis) o dosis subunitarias. Por ejemplo, se pueden proporcionar kits que contengan dosis suficientes del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua (tal como un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua) tal como se describe en esta memoria para proporcionar un tratamiento eficaz de un individuo durante un período prolongado, tal como cualquiera de una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5
- 55 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses o más. Los kits también pueden incluir múltiples dosis unitarias del agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua y composiciones farmacéuticas e instrucciones para el uso y el envasado en cantidades suficientes para el almacenamiento y uso en farmacias, por ejemplo farmacias de hospitales y farmacias de preparaciones.

Por ejemplo, también se describe en esta memoria un kit para separar una proteína priónica de una composición de nanopartículas que comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el kit comprende, además, un material de soporte. En algunos ejemplos, el kit comprende, además, una instrucción para utilizar el ligando para separar el prion de la composición de nanopartículas.

También se describen sistemas para llevar a cabo los métodos descritos en esta memoria. Por ejemplo, se describe un sistema para fabricar una composición de nanopartículas exenta de priones que comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho sistema 1) un aparato para hacer la composición de nanopartículas; y 2) un aparato para separar las proteínas priónicas de la albúmina utilizada para preparar la composición de nanopartículas. En algunos ejemplos, el aparato para separar proteínas priónicas de dicha albúmina utilizada para preparar la composición de nanopartículas está integrado en el aparato para preparar la composición de nanopartículas. En algunos ejemplos, el aparato para preparar la composición de nanopartículas se separa del aparato para separar las proteínas priónicas de dicha albúmina utilizada para preparar la composición de nanopartículas.

También se describe en esta memoria un sistema para fabricar una composición de nanopartículas exenta de priones que comprende albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho sistema 1) un aparato para hacer la composición de nanopartículas; y 2) un aparato para separar proteínas priónicas (por ejemplo, de una composición intermedia generada durante la fabricación de las nanopartículas o de las composiciones de nanopartículas generadas). En algunos ejemplos, el aparato para separar proteínas priónicas está integrado en el aparato para preparar la composición de nanopartículas. En algunos ejemplos, el aparato para preparar la composición de nanopartículas está separado del aparato para separar las proteínas priónicas.

Realizaciones preferidas de esta invención se describen en esta memoria, incluyendo el mejor modo conocido por los autores de la invención para llevar a cabo la invención.

Realizaciones a modo de ejemplo de la presente solicitud

Se describe en esta memoria una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en donde la composición está sustancialmente exenta de una proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 100 fg/ml. En algunos ejemplos, la composición es una cualquiera de las composiciones arriba descritas, en donde la composición tiene una infectividad priónica de menos de aproximadamente 10 UI-ic/ml. En algunos ejemplos, la composición es una cualquiera de las composiciones arriba descritas, en donde la composición no muestra la presencia de una proteína priónica basada en un ensayo de amplificación cíclica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA) o basado en un ensayo de IPCR. En algunos ejemplos, la composición es una cualquiera de las composiciones arriba descritas, que comprende, además, una cantidad traza de un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, la composición es una cualquiera de las composiciones arriba descritas, que comprende, además, una cantidad traza de un material de soporte.

También se describe en esta memoria un método para administrar una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, en el que la albúmina en la composición se obtuvo mediante un método que comprende un proceso de separación de priones, comprendiendo dicho proceso de separación de priones poner en contacto una composición de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, el proceso de separación de priones comprende, además, separar dicho ligando y proteínas unidas al mismo de dicha composición de albúmina. En algunos ejemplos, el ligando es un péptido. En algunos ejemplos, el ligando es un compuesto basado en triazina.

También se describe en esta memoria un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, comprendiendo dicho método: a) separar una proteína priónica de una composición de albúmina inicial; b) someter una mezcla que comprende una solución que comprende la albúmina separada de priones y una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado en un disolvente orgánico a una condición de alto cizallamiento. En algunos ejemplos, la etapa a) comprende: 1) poner en contacto la solución de albúmina inicial con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica. En algunos ejemplos, la etapa a) comprende, además: 2) separar de la solución de albúmina el ligando y las proteínas unidas al mismo. En algunos ejemplos, el método es cualquiera de los métodos arriba descritos, que comprende, además, separar dicho disolvente orgánico de la mezcla. En algunos ejemplos, dicha separación del disolvente orgánico es por evaporación. En algunos ejemplos, el método es uno cualquiera de los métodos arriba descritos, en el que dicho ligando es un péptido. En algunos ejemplos, el método es uno cualquiera de los métodos arriba descritos, en el que el ligando es un compuesto basado en triazina. En algunos ejemplos, el método es uno cualquiera de los métodos arriba descritos, en el que la composición de albúmina inicial es un producto derivado de la sangre.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo,

sustancialmente insoluble en agua y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento, y b) separar una proteína priónica de dicha mezcla, en donde dicha separación comprende: 1) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y 2) separar de dicha mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo; y en donde el agente farmacológicamente activo es como se proporciona en esta memoria. En algunas realizaciones, el ligando es un péptido. En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto basado en trazina.

En otro aspecto, se proporciona un método de separar una proteína priónica de una composición de la que se sospecha que contiene una proteína priónica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende: a) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, b) separar el ligando y las proteínas unidas al mismo de la composición, en donde el agente farmacológicamente activo es como se proporciona en esta memoria. En algunas realizaciones, el ligando es un péptido. En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto basado en trazina. También se describen composiciones obtenidas según el método.

En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en donde el agente farmacológicamente activo es como se proporciona en esta memoria. En algunas realizaciones, el ligando es un péptido. En algunas realizaciones, el ligando es un compuesto basado en trazina.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Desarrollo de un Adsorbente de Afinidad para la Separación de la Proteína Priónica de las Preparaciones de Albúmina

Este estudio rastreó un panel de cuatro resinas de ligandos de unión a priones, enfrentando el panel de cuatro resinas a dos preparaciones de albúmina diferentes disponibles comercialmente (que contienen albúmina al 20% p/v o al 25% p/v), enriquecidas con homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera a dos diferentes concentraciones (0,01% o 0,005%). El panel de cuatro resinas fue identificado previamente por PRDT (Pathogen Removal and Diagnostic Technologies Inc; ProMetic Biosciences Ltd., Cambridge, Reino Unido) como buenos aglutinantes de priones en presencia de albúmina al 25%. La selección de una resina óptima puede optimizar la incorporación de una etapa de reducción de priones en la producción de nanopartículas de albúmina.

Metodología

Seis kits de aislamiento de proteínas para la identificación de sorbentes (PIKSI™, ProMetic Biosciences Ltd) se empaquetaron con doce columnas (a aproximadamente 0,5 mL) de cada una de las cuatro resinas PRDT y la resina de control (Toyopearl Amino AMN31). Cada una de las resinas fue enfrentada a soluciones que contenían albúmina al 20% y 25% enriquecida con 0,01% o 0,005% de homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera (SBH, por sus siglas en inglés) en un formato de serie de tres columnas en un esfuerzo por evaluar la capacidad de unión de cada una de las resinas a las proteínas priónicas. La comparación del comportamiento de las resinas se basó en la unión a la proteína priónica según se determina por transferencia Western y densitometría. El perfil de unión a proteínas totales se determinó mediante geles SDS-PAGE. Las proteínas unidas se separaron de las resinas tanto para la unión a la proteína priónica como para la detección de la unión a la proteína total. La unión a la albúmina se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 para medir la absorbancia a 280 nm. Las señales observadas en las transferencias Western y los geles SDS-PAGE corresponden a la fracción unida de proteína priónica y proteína total, respectivamente.

Las preparaciones comerciales de albúmina utilizadas en esta invención eran Albúmina (Humana) U.S.P. Human Albumin Grifols® al 20%, Lote N° IBAB8MJ001 y Albúmina (Humana), USP, solución Baxter al 25%, Lote N° LA06D04AA.

Resultados

Transferencia Western y SDS-PAGE

Los resultados obtenidos demuestran que las cuatro resinas unidas a PrPsc se añadieron soluciones de albúmina humana al 20% o al 25%. La intensidad de la señal PrPsc en la transferencia Western (Figuras 1-3) sugiere que la unión de priones fue más fuerte para DVR, seguido de las resinas YVHEA, SYA y D4. La resina de control, AMN31, tenía una fuerte señal esperada. El nivel de señal obtenido mediante el uso de resina DVR sugiere que altas concentraciones de albúmina no interfirieron en la unión del prion.

No se observó señal detectable en la segunda y tercera columnas al utilizar DVR (Figura 1) en diversas condiciones testadas, incluso cuando se testaron tiempos de exposición más largos, lo que indica que toda la PrPsc detectable fue capturada por la primera columna de DVR.

La intensidad de la señal fue más débil para las otras resinas en la primera columna, con la detección de proteína priónica en la segunda columna de la serie (Figuras 2 y 3), lo que sugiere una posible interferencia de la albúmina a la unión a la proteína priónica. Los tres ligandos no mostraron señal de priones en la tercera columna, lo que indica que las resinas son capaces de separar selectivamente los priones de las soluciones de albúmina enriquecidas con SBH. La concentración de PrPsc en el cerebro de un hámster fue de aproximadamente 50 µg/g, equivalente a aproximadamente 5 ng/mL de PrPsc en SBH al 0,01%, añadida a una solución de albúmina de 250 mg/mL, generando un exceso de albúmina de 50.000.000 de veces.

El patrón de proteína total observado en los geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie (Figuras 1 a 3) demuestra que la DVR tenía un nivel mucho más bajo de unión a proteínas totales que las resinas de unión a priones restantes, lo que se considera una ventaja, a pesar del hecho de que la mayoría de las bandas observadas en el gel de proteína total provienen de la adición de homogeneizado cerebral. Como era de esperar, la única banda de proteína visible en el gel DVR tiene un peso molecular aparente similar a la albúmina (66,5 KDa).

Densitometría

La separación de priones también se evaluó indirectamente calculando la relación de la señal densitométrica de PrPsc unida a la resina frente a la señal presente en las soluciones de albúmina enriquecidas con SBH. La capacidad de la resina DVR de unirse al prion fue equiparable a la resina de control positivo, adsorbiendo aproximadamente todos los PrPsc disponibles en la primera columna. Utilizando dosis infecciosas como medida para la unión del prion, la columna DVR de 0,5 mL fue capaz de separar priones en las soluciones de 10 mL de albúmina enriquecida con SBH, que es equivalente a aproximadamente 10^6 DI₅₀, considerando que SBH al 0,1% contiene aproximadamente 10^6 DI₅₀/mL. De manera similar a lo que se observó en las transferencias Western, DVR tuvo el mejor comportamiento en la unión de priones que YVHEA, D4 y SYA. Las tres resinas requirieron que la segunda columna de cada una de las serie se uniera adicionalmente a cualquier proteína priónica detectable presente en las soluciones de albúmina enriquecidas con SBH.

Unión a Albúmina

La concentración de albúmina se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 a una absorbancia de 280 nm para la cuantificación de proteínas. Se midió la concentración de albúmina en cada flujo después de pasar las soluciones de albúmina enriquecidas con SBH a través de cada una de las cuatro resinas (DVR, YVHEA, SYA y D4) y la resina de control (AMN31). La concentración de proteína de las soluciones comerciales de albúmina al 20% y 25% en ausencia o presencia de adiciones de SBH al 0,01% o 0,005% se midió antes de fluir a través de las columnas de resina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Medición de la concentración de albúmina de soluciones comerciales de albúmina (al 20% p/v o 25% p/v) enriquecidas con o sin homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera al 0,01% y 0,005%.

	Concentración Medida (%)	Concentración Medida (%)	Promedio (%)
albumina al 20%	24,8	248,0	24,6
albumina al 20%+ adición al 0,01%	24,7	247,1	
albumina al 20%+ adición al 0,005%	24,3	243,3	
albumina al 25%	26,8	268,1	27,6
albumina al 25%+ adición al 0,01%	28,3	282,5	
albumina al 25%+ adición al 0,005%	27,8	278,3	

Las concentraciones de las soluciones comerciales de albúmina se midieron por encima del valor comercialmente marcado, especialmente para la preparación que contiene la solución de albúmina al 20% p/v. Sin embargo, dado que el estudio trató con valores comparativos, esto no fue una preocupación. Se obtuvo el promedio de tres valores, y la cantidad del pico se consideró despreciable en comparación con la cantidad de albúmina presente en las soluciones para determinar la concentración de proteína. La concentración de albúmina se obtuvo después de hacer fluir soluciones de albúmina enriquecidas con SBH a través de las resinas tal como se muestra en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Medición de la concentración de albúmina después de fluir soluciones comerciales de albúmina (al 20% p/v) enriquecidas con o sin homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera al 0,01% y 0,005% a través de diferentes columnas de resina. ND = no detectado.

		Concentración (mg/mL)	Pérdida de Albúmina (%)
DVR	adición al 0,01%	260,4	ND
	adición al 0,005%	260,4	ND
YVHEA	adición al 0,01%	264,3	ND
	adición al 0,005%	259,5	ND
SYA	adición al 0,01%	245,5	0,2
	adición al 0,005%	241,7	1,7
D4	adición al 0,01%	263,0	ND
	adición al 0,005%	265,8	ND
AMN31	adición al 0,01%	249,8	ND
	adición al 0,005%	246,9	ND

- 5 Tabla 5. Medición de la concentración de albúmina después de fluir soluciones comerciales de albúmina (al 25% p/v) enriquecidas con o sin homogeneizado de cerebro de hámster con tembladera al 0,01% y 0,005% a través de diferentes columnas de resina a través de cuatro columnas de resina diferentes. ND = no detectado.

		Concentración (mg/mL)	Pérdida de Albúmina (%)
DVR	adición al 0,01%	268,8	2,6
	adición al 0,005%	284,2	ND
YVHEA	adición al 0,01%	285,7	ND
	adición al 0,005%	294,2	ND
SYA	adición al 0,01%	280,5	ND
	adición al 0,005%	262,9	4,7
D4	adición al 0,01%	284,0	ND
	adición al 0,005%	261,1	5,4
AMN31	adición al 0,01%	272,4	1,3
	adición al 0,005%	282,4	ND

- 10 Ninguna de las resinas testadas mostró una pérdida significativa de albúmina. De hecho, no se detectó pérdida alguna para la mayoría de las afecciones. Los valores encontrados indican una variación de aproximadamente $\pm 5\%$. Los datos sugieren que la pérdida de albúmina es un factor poco probable para elegir una de las resinas a esta escala, dentro del intervalo de condiciones testadas.

Conclusiones

- 15 En base a los resultados obtenidos, DVR es la mejor resina entre las cuatro resinas testadas para separar priones de las soluciones comerciales de albúmina. La resina fue capaz de separar alrededor de 10^6 DI₅₀ en una columna de 0,5 mL. Este valor es similar a los obtenidos en ensayos anteriores para otros enfrentamientos. Se detectó poca pérdida

de albúmina en la relación de enfrentamiento testada con albúmina al 20 o 25%/resina de 20. La unión de la albúmina debería ser menor en las condiciones del proceso, ya que es probable que esta relación aumente.

Ejemplo 2: Estudio de Viabilidad de Separación de Priones de Suspensiones Formuladas que Contienen Paclitaxel y de Solución de Albúmina Humana

- 5 La aplicación de la tecnología de separación de priones en la composición de nanopartículas se evaluó utilizando suspensiones formuladas que contienen paclitaxel (p. ej., Abraxane™) y utilizando una solución de albúmina humana que contiene diversos porcentajes de albúmina (% p/v).

Condiciones Experimentales

Sistemas de Estudio

- 10 Se evaluaron suspensiones formuladas para Abraxane™ y la formulación de azúcar-paclitaxel. La suspensión formulada (FS, por sus siglas en inglés) para Abraxane™ se formuló con una suspensión post-evaporada (PE) obtenida de la producción y solución de albúmina humana (al 25%, Baxter, Deerfield, IL), que contiene aproximadamente 7 mg/mL de paclitaxel y 56 mg/mL de albúmina humana. La suspensión formulada (FS) para la formulación de azúcar-paclitaxel se formuló con una suspensión post-evaporada (PE) obtenida de la producción y solución de albúmina humana (al 25%, Baxter), sacarosa, cloruro sódico y edetato disódico dihidrato, que contiene aproximadamente 7 mg/mL de paclitaxel y 56 mg/mL de albúmina humana; 32 mg/ml de sacarosa, 8,4 mg/ml de NaCl y 0,07 mg/ml de EDTA (ácido etilenidiaminotetraacético).

- 15 También se evaluaron soluciones de albúmina humana al 25%, 20% y 5%. Solución de albúmina humana al 25% o 250 mg/ml se obtuvo de Baxter; solución de albúmina humana al 20% o 200 mg/ml (p. ej., Grifols®) se obtuvo de Grifols Biologicals, Inc. (Los Angeles, CA). La solución de albúmina humana al 5% se preparó por dilución de albúmina humana al 25% (Baxter) con agua estéril para inyección.

Columnas de Separación de Priones

- 25 Las columnas de separación de priones (1 ml) utilizadas en este estudio eran columnas del kit PIKSI® (Kit de aislamiento de proteínas para identificación de sorbentes) comercialmente disponibles que contienen resina Toyopearl Amino 650CU (muestra AMN31) suministrada por ProMetic Biosciences, Ltd (Cambridge, Reino Unido).

Condiciones de Flujo

Para el estudio sobre la suspensión de la formulación, el volumen de flujo total fue de aproximadamente 500 mL, que era 500 veces el volumen de la columna (1 ml). El caudal fue de aproximadamente 0,5 ml/min. El tiempo total de flujo fue de más de 16 horas. Se tomaron muestras cada dos horas. No se observó obstrucción de la columna.

- 30 Para el estudio sobre la suspensión de la formulación, el volumen de flujo total fue de al menos 100 mL, que era 100 veces el volumen de la columna (1 ml). El caudal fue de aproximadamente 0,5 ml/min. El tiempo total de flujo fue de más de 3 horas. Se tomaron muestras cada hora. No se observó obstrucción de la columna.

Resultados y Discusión

- 35 Los resultados del estudio de viabilidad de separación de priones sobre la suspensión formulada se resumen en la Tabla 6 y la Tabla 7. Los resultados de los ensayos físicos y químicos para la suspensión formulada para Abraxane™ no muestran diferencias significativas entre la suspensión pre- y post-columna, en términos de tamaño de partícula, pH, ensayo de paclitaxel e impurezas, ensayo de albúmina humana y composición de albúmina humana. De igual manera, los resultados de los ensayos físicos y químicos para la suspensión formulada para la formulación de azúcar-paclitaxel no muestran diferencias significativas entre la suspensión pre- y post-columna, en términos de tamaño de partícula, pH, ensayo de paclitaxel e impurezas, ensayo de albúmina humana y composición de albúmina humana, sacarosa y EDTA.

Tabla 6-Estudio de Viabilidad de Separación de Priones de la Suspensión Formulada Abraxane™

Propiedades Físicas y Químicas		Muestra D.I.							
		Pre – Columna	Post-Columna						
			nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	nº 6	nº 7
Tamaño de Partícula (nm)	Media	131	132	132	133	133	133	131	130
	<5%	82	86	85	86	85	87	84	82
	<95%	193	190	191	192	192	191	191	190
	<99,9%	254	250	251	252	253	250	251	250
pH		7,0	7,0	7,1	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Paclitaxel (mg/mL)		6,9	6,9	6,9	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Composición de Albúmina Humana (%)	Polímero	3,99	3,86	3,93	3,95	3,95	3,92	3,88	3,76
	Oligómero	1,32	1,36	1,32	1,34	1,31	1,32	1,34	1,39
	Dímero	5,95	5,96	6,00	5,98	6,00	5,99	5,98	5,96
	Monómero	88,29	88,37	88,24	88,27	88,27	88,28	88,29	88,38
Albúmina Humana Total (mg/mL)		55	56	56	56	56	56	56	56
Impurezas (%)	7-Epi	0,08	0,08	NA	NA	0,09	NA	NA	0,09
	Total	0,25	0,25	NA	NA	0,26	NA	NA	0,26
* NA: Datos no disponibles,									

Tabla 7-Estudio de Viabilidad de Separación de Priones de Suspensión Formulada con Azúcar-EDTA-Paclitaxel

Propiedades Físicas y Químicas		Muestra D.I.							
		Pre-Columna	Post -Columna						
			nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	nº 6	nº 7
Tamaño de partícula (nm)	Media	129	130	133	131	132	132	130	132
	<5%	80	81	85	82	84	85	81	85
	<95%	191	192	193	193	192	191	192	191
	<99,9%	252	253	253	254	253	251	253	250
pH		6,8	6,8	6,8	6,9	6,8	6,8	6,9	6,9
Paclitaxel (mg/mL)		6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,6	6,6	6,5
Composición de Albúmina Humana (%)	Polímero	3,90	3,90	3,91	3,89	3,91	3,93	3,94	3,93
	Oligómero	1,92	1,89	1,92	1,90	1,91	1,89	1,44	1,41
	Dímero	6,14	6,11	6,11	6,10	6,10	6,09	6,09	6,10
	Monómero	88,02	88,10	88,07	88,09	88,06	88,09	88,03	88,04
Albúmina Humana Total (mg/mL)		55	55	54	54	55	55	54	54
Impurezas (%)	7-Epi	0,08	0,08	NA	NA	0,08	NA	NA	0,09
	Total	0,25	0,25	NA	NA	0,25	NA	NA	0,26
Sacarosa (mg/mL)		31,8	31,8	NA	NA	31,6	NA	NA	31,9
EDTA (mg/mL)		0,071	0,071	NA	NA	0,070	NA	NA	0,070
* NA: Datos no disponibles									

Los resultados del estudio de viabilidad de eliminación de priones en las soluciones de albúmina se resumen en la Tabla 8. No existen diferencias significativas entre la solución pre-columna y post-columna, en términos de ensayo de albúmina humana y composición de albúmina humana.

Tabla 8-Estudio de Viabilidad de Separación de Priones de Solución de Albúmina Humana

Muestra D.I		HA (%)				HA Total (mg/mL)		
		Polímero	Oligómero	Dímero	Monómero			
Lote 28203-37A								
Albúmina Humana al 25% (Baxter)	Pre-columna	3,66	0,28	2,38	93,69	248		
	Post-columna nº 1	3,60	0,25	2,41	93,74	248		
	Post- columna nº 2	3,63	0,28	2,38	93,71	250		
	Post- columna nº 3	3,64	0,24	2,41	93,71	247		
	Post columna nº 4	3,64	0,26	2,40	93,70	248		
Lote 28203-37B								
Albúmina Humana al 20% (Grifols)	Pre- columna	4,85		0,51	3,25	91,39	199	
	Post -columna nº 1	4,78		0,49	3,25	91,48	199	
	Post – columna nº 2	4,78		0,51	3,25	91,45	200	
	Post-columna nº 3	4,86		0,51	3,25	91,38	200	
Lote 28203-37C								
Albúmina Humana al 5% (Baxter)	Pre- columna			3,66	0,27	2,32	93,75	52
	Post -columna nº 1			3,33	0,25	2,31	94,10	51
	Post -columna nº 2			3,48	0,27	2,30	93,94	51
	Post -columna nº 3			3,54	0,27	2,31	93,89	51
	Post -columna nº 4			3,50	0,27	2,31	93,92	52

Este estudio demuestra que el tratamiento de la columna de separación de priones no tiene un impacto adverso sobre las propiedades físicas y químicas de la solución de albúmina humana y las suspensiones formuladas tanto para Abraxane™ como para la formulación de azúcar-paclitaxel.

Ejemplo 3: Separación de TSE por Resinas de Reducción de Priones para Albúmina al 20%

En este estudio, se evaluó la separación potencial de TSE por parte de resinas de reducción de priones (columna PRDT; ProMetic Biosciences, Ltd) en albúmina al 20% (p/v) (Grifols®). El material de partida para la etapa del proceso de separación de TSE se añadió con un agente modelo de TSE. La etapa del proceso se realizó en los laboratorios de VirusSure (Virusure Forschung und Entwicklung GmbH, Viena, Austria). Se recogieron diversas fracciones durante la ejecución de la etapa del proceso, y la capacidad de separación de TSE del proceso se calculó en base a una determinación de los niveles de agente de TSE utilizando un ensayo de transferencia Western para la detección de PrPsc.

Este estudio siguió e hizo referencia a las siguientes directrices, incluidas 1) CPMP/BWP/268/95 (revisada en 1996), Nota para las Directrices sobre Estudios de Validación de Virus: El Diseño, la Contribución e Interpretación de Estudios que Validan la Inactivación y Separación de Virus; 2) CPMP/BWP/5136/03 Directriz sobre la Investigación de Procesos de Fabricación de Productos Medicinales Derivados de Plasma con Respecto al Riesgo de vCJD; 3) Principios OECD de Buena Práctica de Laboratorio, tal como se esboza en ENV/MC/CHEM(98)17, revisado en 1997; 4) 21 CFR parte 58, Buena Práctica de Laboratorio, US FDA; 5) Directiva EU 2004/9/EG, Inspección y Verificación de la Buena Práctica de Laboratorio (GLP); 6) Directiva EU 2004/10/EG, Aplicación de los Principios de la Buena Práctica de Laboratorio y para el Control de su Aplicación en Ensayos con Sustancias Químicas; 7) BGBl de Austria. II, 211. Decreto, Decreto de Inspección de Productos Químicos-GLP, Año 2000; y 8) BGBl de Austria. II, 450. Decreto, Buena Práctica de Laboratorio 2006, Año 2006.

Materiales y Métodos

Los siguientes artículos de ensayo, reactivos y materiales se utilizaron durante el curso de este estudio para la investigación de la separación de TSE por parte de las resinas de reducción de priones (columna PRDT) para albúmina al 20% (Grifols®).

- 5 Albúmina Grifols® (humana) (USP solución al 20% (Lote: IBAB7GX001/TA09/0122)) se utilizó para la tanda añadida y el ensayo de interferencia.

Para la ejecución del proceso se utilizó la Columna Desechable SepFast™ (ProMetic Biosciences Ltd.) que contiene 5 ml de resina de separación de priones en solución salina al 9%.

Se prepararon diversos tampones. Estos incluían lo siguiente:

- 10 1) se preparó NaCl al 0,9% (9 g/l) como tampón de equilibrio para las resinas de reducción de priones;
- 2) se preparó solución salina tamponada con Tris (TBS) como re-suspensión de las resinas después de la cromatografía;
- 3) se preparó NaCl 2 M (116,88 g/l) como tampón de regeneración de resina con reducción de priones;
- 15 4) se prepararon tampones de NaOH (0,1 M, 0,5 M y 1,0 M) para ajustes de pH de muestras de estudio enriquecidas y la inactivación de compuestos intermedios del proceso de material infeccioso; y
- 5) se prepararon tampones HCl (0,1 M y 1,0 M) para ajustes de pH de muestras de estudio enriquecidas y compuestos intermedios del proceso.

Tembladera 263

- 20 En este estudio se utilizó la cepa 263K de tembladera adaptada en hámster (tratada con sarkosyl al 0,5%). La cepa 263K de tembladera adaptada en hámster proporciona las ventajas de altos títulos en los cerebros de hámsteres. Títulos típicos para un homogeneizado de cerebro de 10% están en el intervalo de 10^8 - 10^{10} unidades DI_{50} por ml. La proteína PrPsc depositada por este agente es relativamente resistente a la digestión de Proteinasa K, lo que permite la posibilidad de distinguir entre la forma no asociada a la enfermedad de la proteína PrPc. La cepa 263K de siembra de tembladera adaptada en hámster se suministró como un homogeneizado al 10% por el laboratorio del Dr. Robert Rohwer (Baltimore Research and Education Foundation, Mail Stop 151-A, 10 North Greene Street, Baltimore, MD 21201, EE.UU.). Para este experimento se seleccionó una fracción tratada con sarkosyl al 0,5%. Esta fracción se preparó a partir de un homogeneizado del cerebro bruto (del cual ya se había separado la fracción microsómica/citosólica de 263K) mediante tratamiento con sarkosyl al 0,5%, seguido de centrifugación diferencial para separar agregados más grandes, dejando solo los fragmentos solubilizados de detergente en el sobrenadante.
- 25 La fracción tratada con sarkosyl al 0,5% se preparó para imitar la contaminación solubilizada de detergente (es decir, tal como se encuentra en procesos que contienen detergente disolvente), y este tipo de fracción ha sido ampliamente utilizada en estudios de eliminación de priones para el plasma humano y productos recombinantes.
- 30

Ensayo de Transferencia Western para la Detección de PrPsc

- 35 El ensayo de transferencia Western para la detección de PrPsc se utilizó para la determinación semi-cuantitativa de los niveles de TSE (PrPsc) en las diversas muestras. El intervalo dinámico del ensayo de transferencia Western está normalmente en la región de diluciones de 4-5 $\log_{10}$ antes de que se pierda la señal y, por lo tanto, el ensayo es menos sensible que el bioensayo de hámster. Sin embargo, el ensayo de transferencia Western es una herramienta útil para evaluar la separación de priones mediante procesos de fabricación biofarmacéuticos.

- 40 En el ensayo de transferencia Western, la muestra se sometió primero a digestión con Proteinasa K para separar la forma normal de la proteína, PrPc (todas las muestras de proceso se digirieron utilizando una concentración de Proteinasa K de 83 pg/ml). Después de bloquear la reacción proteolítica, la muestra se mezcló con tampón SDS y se hirvió para desnaturalizar el PrPsc de su forma agregada. Diluciones de 0,5 $\log_{10}$ de la muestra se preparan después y se cargan en un gel SDS-PAGE junto con un marcador de peso molecular. Después de la electroforesis, el gel se transfirió mediante Western sobre una membrana de PVDF, seguido de bloqueo y sondeo con anticuerpos que permitieron la detección de la proteína PrPsc unida con el anticuerpo 3F4. La cepa 263K de tembladera da como resultado un patrón de bandas característico en la región de 25-33 KDa, que ayuda a confirmar la presencia de la proteína PrPsc en las muestras. El punto final del título de la muestra se definió como la primera dilución en la que no se observó señal en la transferencia Western.
- 45

Cálculo de Factores de Reducción

- 50 Factores de reducción (RF) se calcularon como sigue:

$$RF = (V_1 \times T_1) / (V_2 \times T_2)$$

en que:

V_1 y T_1 son el volumen y el título del material de partida, respectivamente, y

V_2 y T_2 son el volumen y el título de la fracción del producto, respectivamente

En términos logarítmicos, esta ecuación se puede expresar como:

$$5 \quad \text{Log}_{10}[\text{RF}] = [\text{Log}_{10}(V_1) + \text{Log}_{10}(T_1)] - [\text{Log}_{10}(V_2) + \text{Log}_{10}(T_2)].$$

Los factores de reducción se redondearon a 1 decimal solo después del cálculo final.

Ensayo de Interferencia

10 El material de partida se testó sin diluir y seguido de una pre-dilución de $1,0 \log_{10}$ en TBSA. Después de enriquecer con 263 K a una concentración final equivalente a un título dentro de aproximadamente $2 \log_{10}$ del punto final del material de tembladera utilizado para enriquecer, las muestras de material de partida sin diluir y pre-diluidas se centrifugaron a $15.558 \times g$ durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, el sobrenadante se decantó cuidadosamente y los gránulos se resuspendieron con TBSA en $1/10$ del volumen de muestra centrifugada original (equivalente a una concentración no efectiva para $1,0 \log_{10}$ de muestra pre-diluida y equivalente a una concentración de 10 veces para la muestra sin diluir). Luego se realizó la digestión con Proteasa K y la transferencia Western siguiendo el protocolo estándar. Las muestras de regeneración y de columna se diluyeron a $0,5 \log_{10}$ o se testaron sin diluir, respectivamente, antes del análisis mediante transferencia Western (es decir, sin centrifugación).

Ajuste del pH

Antes de la división en partes alícuotas y el almacenamiento a $\leq -60^\circ\text{C}$, se verificó que las muestras estuvieran a un pH de 6-8 (no se requirió un ajuste de pH para ninguna de las muestras).

20 Equipo

Los siguientes elementos principales del equipo se utilizaron para la realización de este estudio. Armario de Seguridad de Riesgo Biológico Estéril Clase II, congeladores Sanyo & Angelantoni a $\leq -60^\circ\text{C}$, refrigeradores Angelantoni de $2-8^\circ\text{C}$ y congeladores a $\leq -15^\circ\text{C}$, balanza (analítica) e impresora Sartorius o Kern, termómetro electrónico Hanna, pHímetro Mettler Toledo, baños de agua Grant o Selecta, temporizador de laboratorio Oregon, microfuga Hettich, Cédula de Electroforesis de BioRad Criterion, Secante de BioRad Criterion, sistema de Cromatografía AKTA, Fuente de Alimentación Wealtec, Revelador de Película Agfa y Columna de Biotoomolomics con resina PRDT.

Flujo del Proceso

El esquema de flujo del proceso junto con las muestras recolectadas se representó en la Figura 4. Los volúmenes de las muestras respectivas se pueden encontrar en la Tabla 9 en la Sección de Resultados.

30 En la preparación del flujo del proceso, el armario de seguridad de Flujo Laminar (LF) se limpió y se encendió durante al menos 10 a 15 minutos para equilibrarse. El baño de agua se equilibró a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y el material de partida se equilibró hasta alcanzar una temperatura de $29,5^\circ\text{C}$. La adición solubilizada de Sarkosyl al 0,5% solubilizada de Sarkosyl al 0,5% se descongeló en el mismo baño de agua y, tan pronto como se descongeló, se colocó en hielo hasta su uso. La columna PRDT se equilibró a temperatura ambiente ($23,0 \pm 5,0^\circ\text{C}$) durante la noche.

35 El tubo de entrada de la columna (parte superior) se conectó a la salida del ÄKTA. El tubo de la salida de la columna (parte inferior) se alimentó a un recipiente de recogida apropiado (vaso de precipitados o tubo de centrifuga desechable de 50 ml). Todos los tubos ya estaban cebados con WFI (siglas inglesas de agua para inyección) de modo que no se introdujeran burbujas de aire en el sistema.

40 La columna se equilibró primero con 5 volúmenes de columna (CV) de WFI, y luego con 10 CV de Tampón de Equilibrio. El caudal objetivo fue de $2,0 \pm 0,1$ ml por minuto.

Preparación de Muestras y Cromatografía de Resina de Reducción de Priones

45 50,7 ml del material de partida equilibrado se enriquecieron con 0,51 ml de homogeneizado de 263K solubilizado con sarkosyl al 0,5%. Luego se verificó el pH y se encontró que estaba dentro del intervalo objetivo de 6,9-7,4. Posteriormente, se separó una parte alícuota de 0,5 ml (muestra SSM) y se dividió en partes alícuotas y se almacenó a $\leq -60^\circ\text{C}$.

La muestra enriquecida se aplicó luego a la columna PRDT equilibrada anterior a un caudal de $1,8 \pm 0,1$ ml por min y el flujo se recogió como las siguientes fracciones:

ID de la Muestra	Volumen	Descripción de la Muestra
E1	2,1 ml	Material eluido 1 (-0-2 ml)
E2	3,2 ml	Material eluido 2 (-2-5 ml)
E3	5,4 ml	Material eluido 3 (-5-10 ml)
E4	16,1 ml	Material eluido 4 (-10-25 ml)
E5	30,3 ml	Material eluido 5 (-25-44 ml)

- 5 La recogida de E1 comenzó una vez que la absorbancia había alcanzado el 80% de la deflexión a escala completa. Para cada operación, se recogió la fracción de flujo (el volumen de cada muestra de Material eluido recogida se determinó mediante pesaje). Después de cargar la solución de albúmina enriquecida, la columna se lavó con 10,0 ml de Tampón de Equilibrio. La recogida de la muestra E5 se detuvo una vez que la absorbancia había caído por debajo del 80% de la deflexión a escala completa. Después del lavado del Tampón de Equilibrio, la columna se regeneró utilizando > 20,0 ml de NaCl 2 M (muestra REG), y después de la regeneración la resina se retiró y se resuspendió en 5 ml de TBS (muestra COL).

Resultados

10 Muestras de Operaciones Enriquecidas

- La Tabla 9 que figura a continuación enumera las muestras que se recogieron de la operación enriquecida junto con el volumen de cada una de las muestras. En los casos en los que el tamaño de la muestra se determinó en peso, se supuso una densidad de 1,0 g/ml para permitir el cálculo del volumen de cada una de las muestras. Todas las muestras se almacenaron en partes alícuotas a -60°C hasta el análisis. Una reproducción escaneada del perfil de cromatografía de la operación enriquecida se muestra en la Figura 5.

Tabla 9: Sumario de la recopilación de volúmenes durante la operación del proceso

Descripción de la Muestra	Código de Muestra	Volumen real de muestra recogida en el punto de recogida (ml)
Material de Partida Añadida (Adición tratada con sarkosyl)	SP0913-SSM	51,2
Material eluido 1: 0-2 ml	SP0913-E1	2,1
Material eluido 2: 2-5 ml	SP0913-E2	3,2
Material eluido 3: 5-10 ml	SP0913-E3	5,4
Material eluido 4: 10-25 ml	SP0913-E4	16,1
Material eluido 5: 25-44 ml	SP0913-E5	30,3
Fracción de regeneración	SP0913-Reg	27,5
Muestra de resina	SP0913-Col	10,0

Resultados de Interferencia

- 20 Para superar la interferencia, todas las muestras, excepto las muestras de regeneración y de resina, se diluyeron en 1,0 log₁₀ con TBS que contenía BSA al 0,1%, seguido de una centrifugación y una concentración de 1/10. La muestra no diluida testada para detectar interferencia a una concentración de 10 x mostró una fuerte interferencia. Para las muestras de regeneración, se preparó una dilución de 0,5 log₁₀ antes del ensayo para reducir la concentración de NaCl. Para las muestras de resina, como la resina se resuspendió en tampón TBS, estas muestras se analizaron sin pre-dilución.
- 25 La dilución de la muestra requerida para superar la interferencia con albúmina se hizo utilizando 1,0 log₁₀ de predilución con centrifugación y resuspensión en 1/10^o del volumen original. Véase la Figura 6.

Datos de Titulación de Priones y Cálculo de Factores de Reducción

El cálculo de los factores de reducción de priones para las operaciones de proceso se muestra en la Tabla 10. La dilución de la muestra utilizada con el fin de superar la interferencia también se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Sumario de Datos de Titulación de la Muestra y Factores de Reducción de Priones

ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	Dilución Log para interferencia	Título punto final	Volumen de Muestra en recogida	Volumen Procesado Adicional	Factor de Corrección para Volumen procesado	Volumen de Muestras Antes del Ajuste del pH	Volumen de Muestras después del Ajuste del pH	Factor de Corrección del Ajuste del pH	Volumen Log	Carga Total
SP0913-SSM	Material de partida enriquecido	0,0	2,5	51,2 ml	50,7 ml	0,99			-	1,7	4,205
SP0913-E1	Material eluido Fracción 1	0,0	0,0	50,7 ml		-			-	1,7	≤ 1,705
SP0913-E2	Material eluido Fracción 2	0,0	1,0	50,7 ml		-			-	1,7	2,705
SP0913-E3	Material eluido Fracción 3	0,0	1,0	50,7 ml		-			-	1,7	2,705
SP0913-E4	Material eluido Fracción 4	0,0	1,5	50,7 ml		-			-	1,7	3,205
SP0913-E5	Material eluido Fracción 5	0,0	1,0	50,7 ml		-			-	1,7	2,705
SP0913-Reg	Fracción de Regeneración	0,5	0,0	27,5 ml		-			-	1,4	≤ 1,939
SP0913-Col	Resina de la Columna	0,0	3,0	10,0 ml		-			-	1,0	4,000
				Factor de Reducción 1:				Muestra nº	ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	RF
						Muestra 1	SP0913-SSM	Material de partida enriquecido		4,205	
						Muestra 2	SP0913-E1	Material eluido Fracción 1		1,705	≥ 2,50
						Comentarios:					RF para material eluido 1 con relación a material de partida enriquecido

Factor de Reducción 2:					Muestra nº	ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	Título Log	RF	
					Muestra 1	SP0913-SSM	Material de partida enriquecido	4,205	1,50	
					Muestra 6	SP0913-E5	Material eluido Fracción 5	2,705		
					Comentarios:					
					RF para el material eluido 5 con relación a material de partida enriquecido					

*Los factores de corrección se aplican en el cálculo final del volumen log. Los factores de corrección aplicables para cada una de las muestras son los factores de corrección de la muestra respectiva propiamente dicha junto con todos los factores de corrección para las muestras enumeradas debajo de esa muestra

**Se utilizó un volumen de 50 ml con el fin de calcular el factor de reducción para cada una de las muestras de material eluido, para garantizar una comparación directa con el volumen cargado en la columna.

Se calculó un factor de reducción de $\geq 2,5 \log_{10}$ con respecto al material de partida enriquecido para la muestra E1, que representaba los primeros 2,0 ml pasados sobre la columna PRDT. En las muestras E2 a E5, se observó un avance de PrPsc en la fracción de flujo (factor de reducción $1,5 \log_{10}$ para la muestra E5). No se detectó PrPsc en la muestra de regeneración y los equivalentes de PrPsc unidos a la resina PRDT se comentaron con más detalle en la sección de cálculo de la capacidad de unión a priones de la resina PRDT que figura a continuación.

Cálculo de la Capacidad de Unión a Priones de las Resinas de Reducción

Con el fin de estimar la capacidad de unión de las resinas de reducción de priones (resina PRDT) para la proteína priónica infecciosa, los títulos observados en el ensayo de transferencia Western se relacionaron con títulos infecciosos. El ensayo de transferencia Western utilizó un material de 263K de título conocido. Se preparó una serie de diluciones del material de referencia y se testó en el ensayo de transferencia Western. Después de representar los títulos obtenidos frente a los títulos respectivos observados en el bioensayo de hámster, se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la relación entre los dos sistemas de ensayo. La pendiente y la intersección para la línea de regresión se calcularon como 1,0667 y $-4,5867$, respectivamente. Los parámetros de regresión se utilizaron para convertir los títulos de transferencia Western en títulos infecciosos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Titulación}_{[\text{Bioensayo}]} = (\text{Titulación}_{[\text{Transferencia de Western}]} + 4,5867)/(1,0667)$$

Una vez que se calculó el título infeccioso por ml, se pudo determinar el prion total unido a la columna. La capacidad calculada de unión a proteínas priónicas de la resina de reducción de priones se muestra en la Tabla 11 que figura a continuación. La capacidad se determinó utilizando la cantidad de PrPsc observada directamente unida a la resina de reducción de priones (muestras Reg y Col).

Tabla 11: Capacidad de unión a priones de la Resina de Reducción de Priones (Resina PRDT)

ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	PrPsc Total ($\log_{10}^{\text{WB}} \text{N}^{\circ}$)	PrPsc infeccioso ($\log_{10} \text{DI}_{50}$ total) = PrPsc Total + 4,1	Capacidad de Unión por ml (DI_{50}/ml)*
Albúmina añadida con una adición solubilizada de sarkosyl				
SP0913-SSM	50 ml de albúmina enriquecida con 0,5 ml de una adición solubilizada de sarkosyl	42	8,3	-
5,0 ml de Resina PRDT; 50 ml de muestra SP0912-SSM cargada (Caudal diana: 1,8 ml/min)				
SP0912-Reg	Lavado con sal NaCl 2M (volumen de la muestra 25,1 ml)	$\leq 1,9$	$\leq 6,0$	$\leq 5,3 \log_{10}/\text{ml}$
SP0912-Col	Resina de la Columna (volumen de la muestra 8,7 ml)	4,0	8,1	$7,4 \log_{10}/\text{ml}$
Nº PrPsc total incluye correcciones para el volumen de muestra, así como la concentración/dilución antes del ensayo.				
Carga total basada en un volumen final de 50 ml cargado en la columna PRDT * Basado en un tamaño de columna de 5,0 ml				

La unión total de PrPsc a la matriz de PRDT después de un lavado con sal 2 M fue de $7,4 \log_{10} \text{DI}_{50}/\text{ml}$. No se detectó PrPsc en las fracciones de lavado con sal mediante transferencia Western. También se observó una separación significativa de PrPsc ($\geq 2,5 \log_{10}$).

Al realizar el ensayo de interferencia, el material de partida se testó sin diluir, con centrifugación y concentración de 10 veces. Esto se realizó para permitir una evaluación de la posibilidad de concentrar las muestras y así lograr mayores factores de reducción.

Ejemplo 4: Separación de TSE por parte de Resinas de Reducción de Priones para Albúmina al 25%

En este estudio, se evaluó la separación potencial de TSE por parte de las resinas de reducción de priones (columna PRDT) en albúmina al 25% (Baxter, Deerfield, IL). Los Materiales y los Métodos fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 3, con la excepción de que se utilizó solución de Albúmina (Humana) USP al 25% de Baxter (Lote:LA07D051AB/TA09/0123) como material de partida para la operación enriquecida y el ensayo de interferencia.

Flujo del Proceso

El proceso de reducción de escala se estableció y realizó en las instalaciones de ViruSure. El esquema de flujo del proceso junto con las muestras recogidas se representó en la Figura 7. Los volúmenes de las muestras respectivas se pueden encontrar en la Tabla 12 en la Sección de Resultados. Los parámetros y procedimientos utilizados en la preparación del flujo del proceso, incluida la conexión del AKTA y la columna, el equilibrio de la columna son los mismos que se describen en el Ejemplo 3.

Preparación de Muestras y Cromatografía de Resina de Reducción de Priones

50,1 ml del material de partida equilibrado se enriquecieron con 0,51 ml de homogeneizado 263K solubilizado con sarkosyl al 0,5%. Luego se verificó el pH y se encontró que estaba dentro del intervalo objetivo de 6,9-7,4 con HCl 0,1 M o NaOH 0,5 M. El pH del material de partida enriquecido (6,85) estaba fuera del intervalo objetivo de 6,9-7,4 (véase la sección de Desviaciones). Después de la adición de 65 µL de NaOH 0,1 M y 50 µL de NaOH 1 M, el valor del pH permaneció sin cambios, por lo que se tomó la decisión de cargar el material de partida a este pH. Posteriormente, se separó una parte alícuota de 0,5 ml (muestra SSM) y se dividió en partes alícuotas y se almacenó a $\leq -60^{\circ}\text{C}$.

La muestra enriquecida se aplicó luego a la columna PRDT equilibrada anterior a un caudal de $1,8 \pm 0,1$ ml por minuto, y el flujo continuo se recogió como las siguientes fracciones:

ID de la Muestra	Volumen	Descripción de la Muestra
E1	2,3 ml	Material eluido 1 (-0-2 ml)
E2	3,3 ml	Material eluido 2 (-2-5 ml)
E3	5,6 ml	Material eluido 3 (-5-10 ml)
E4	16,1 ml	Material eluido 4 (-10-25 ml)
E5	32,7 ml	Material eluido 5 (-25-44 ml)

La recogida de E1 comenzó una vez que la absorbancia había alcanzado el 80% de la deflexión a escala completa. Para cada operación, se recogió la fracción de flujo (el volumen de cada muestra de Material eluido recogida se determinó mediante pesaje). Después de cargar la solución de albúmina enriquecida, la columna se lavó con 10,0 ml de Tampón de Equilibrio. La recogida de la muestra E5 se detuvo una vez que la absorbancia había caído por debajo del 80% de la deflexión a escala completa. Después del lavado del Tampón de Equilibrio, la columna se regeneró utilizando $> 20,0$ ml de NaCl 2 M (muestra REG), y después de la regeneración, la resina se separó y se resuspendió en 5 ml de TBS (muestra COL).

Resultados

Muestras de Operaciones Enriquecidas

La Tabla 12 que figura a continuación enumera las muestras que se recogieron de la operación enriquecida junto con el volumen de cada una de las muestras. En los casos en los que el tamaño de la muestra se determinó en peso, se supuso una densidad de 1,0 g/ml para permitir el cálculo del volumen de cada una de las muestras. Todas las muestras se almacenaron en partes alícuotas a $\leq -60^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. Una reproducción escaneada del perfil de cromatografía de la operación enriquecida se muestra en la Figura 8.

Tabla 12: Sumario de la recogida de volúmenes durante la operación del proceso

Descripción de la Muestra	Código de la Muestra	Volumen real de la muestra recogida en el punto de recogida (ml)
Material de partida enriquecido (adición tratada con Sarkosyl)	SP0912-SSM	50,6
Material eluido 1: 0-2 ml	SP0912-E1	2,3
Material eluido 2: 2-5 ml	SP0912-E2	3,3
Material eluido 3: 5-10 ml	SP0912-E3	5,6
Material eluido 4: 10-25 ml	SP0912-E4	16,1

Descripción de la Muestra	Código de la Muestra	Volumen real de la muestra recogida en el punto de recogida (ml)
Material eluido 5: 25--44 ml	SP0912-E5	32,7
Fracción de Regeneración	SP0912-Reg	25,1
Muestra de Resina	SP0912-Col	8,7

Resultados de la Interferencia

Para superar la interferencia con albúmina, todas las muestras, excepto las muestras de regeneración y de resina, se diluyeron en $1,0 \log_{10}$ con TBS que contenía BSA al 0,1%, seguido de una centrifugación y una concentración de $1/10$. La muestra no diluida testada para detectar interferencia a una concentración de 10 veces mostró una fuerte interferencia. Para las muestras de regeneración, se preparó una dilución de $0,5 \log_{10}$ antes del ensayo para reducir la concentración de NaCl. Para las muestras de resina, como la resina se resuspendió en tampón TBS, estas muestras se testaron sin predilución.

La dilución de la muestra requerida para superar la interferencia se hizo utilizando una predilución de $1,0 \log_{10}$ con centrifugación y resuspensión en $1/10^{\circ}$ del volumen original. Véase la Figura 9.

Datos de Titulación de Priones y Cálculo de Factores de Reducción

El cálculo de los factores de reducción de priones para las operaciones de proceso se muestra en la Tabla 13. La dilución de la muestra utilizada con el fin de superar la interferencia también se muestra también en la Tabla 13.

Tabla 13: Sumario de Datos de Titulación de la Muestra y Factores de Reducción de Priones

ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	Log de dilución para Interferencia	Título punto final	Volumen de Muestra en recogida	Volumen Procesado Adicional	Factor de Corrección para Volumen procesado	Volumen de Muestras antes del ajuste de pH	Volumen de Muestras después del Ajuste del pH	Factor de Corrección del Ajuste del pH	Volumen Log	Carga total	
SP0912-SSM	Material de partida enriquecido	0,0	2,0	50,6 ml	50,2 ml	0,99	50,6 ml	50,7 ml	1,00	1,7	3,702	
SP0912-E1	Material eluido Fracción 1	0,0	0,0	50,2 ml		-			-	1,7	≤ 1,701	
SP0912-E2	Material eluido Fracción 2	0,0	0,5	50,2 ml		-			-	1,7	2,201	
SP0912-E3	Material eluido Fracción 3	0,0	1,0	50,2 ml		-			-	1,7	2,701	
SP0912-E4	Material eluido Fracción 4	0,0	1,0	50,2 ml		-			-	1,7	2,701	
SP0912-E5	Material eluido Fracción 5	0,0	1,0	50,2 ml		-			-	1,7	2,701	
SP0912-Reg	Fracción de Regeneración	0,5	0,0	25,1 ml		-			-	1,4	≤ 1,900	
SP0912-Col	Resina de la Columna	0,0	3,0	8,7 ml		-			-	0,9	3,940	
Factor de Reducción 1:												
						Muestra nº	ID de la Muestra	Descripción de la Muestra		Título Log	RF	
						Muestra 1	SP0912-SSM	Material de partida enriquecido		3,702		
						Muestra 2	SP0912-E1	Material eluido Fracción 1		1,701	≥ 2,00	
						Comentarios:					RF para el material eluido 1 con relación a material de partida enriquecido	

Factor de Reducción 2:									
					Muestra 1	SP0912-SSM	Material de partida enriquecido	3,702	
					Muestra 6	SP0912-E5	Material eluido Fracción 5	2,701	1,00
					Comentarios:				
RF para el material eluido 5 con relación a material de partida enriquecido									
*Los factores de corrección se aplican en el cálculo final del volumen log. Los factores de corrección aplicables para cada una de las muestras son los factores de corrección de la muestra respectiva propiamente dicha junto con todos los factores de corrección para las muestras enumeradas debajo de esa muestra									
**Se utilizó un volumen de 50 ml con el fin de calcular el factor de reducción para cada una de las muestras de material eluido, para garantizar una comparación directa con el volumen cargado en la columna.									

Se calculó un factor de reducción de $\geq 2,5 \log_{10}$ con respecto al material de partida enriquecido para la muestra E1, que representaba los primeros 2,0 ml pasados sobre la columna PRDT. En las muestras E2 a E5, se observó un avance de PrPsc en la fracción de flujo (factor de reducción $1,5 \log_{10}$ para la muestra E5). No se detectó PrPsc en la muestra de regeneración y los equivalentes de PrPsc unidos a la resina PRDT se discutieron con más detalle en la sección de cálculo de la capacidad de unión a priones de la resina PRDT que figura a continuación.

Cálculo de la Capacidad de Unión a Priones de las Resinas de Reducción de Priones

Con el fin de estimar la capacidad de unión de las resinas de reducción de priones (resina PRDT) para la proteína priónica infecciosa, los títulos observados en el ensayo de transferencia Western se relacionaron con títulos infecciosos. El ensayo de transferencia Western utilizó un material de 263K de título conocido. Se preparó una serie de diluciones del material de referencia y se testó en el ensayo de transferencia Western. Después de representar los títulos obtenidos frente a los títulos respectivos observados en el bioensayo de hámster, se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la relación entre los dos sistemas de ensayo. La pendiente y la intersección para la línea de regresión se calcularon como 1,0667 y -4,5867, respectivamente. Los parámetros de regresión se utilizaron para convertir los títulos de transferencia Western en títulos infecciosos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Titulación}_{[\text{Bioensayo}]} = (\text{Titulación}_{[\text{Transferencia de Western}]} + 4,5867)/(1,0667)$$

Una vez que se calculó el título infeccioso por ml, se determinó el prion total unido a la columna. La capacidad calculada de unión a proteínas priónicas de la resina PRDT se muestra en la Tabla 14 que figura a continuación. La capacidad se determinó utilizando la cantidad de PrPsc observada directamente unida a la resina PRDT (muestras Reg y Col).

Tabla 14: Capacidad de unión a priones de la Resina PRDT

ID de la Muestra	Descripción de la Muestra	PrP ^{sc} total ($\log_{10} \text{WB}$) ^o	PrPsc infeccioso ($\log_{10} \text{DI}_{50}$ total) = PrPsc Total + 4,1	Capacidad de Unión por ml (DI_{50}/ml) [*]
Albúmina enriquecida con una adición solubilizada de sarkosyl				
SP0912-SSM	50 ml de albúmina enriquecida con 0,5 ml de una adición solubilizada de sarkosyl	3,7 [♣]	7,8	-
5,0 ml de Resina PRDT; 50 ml de muestra SP0912-SSM cargada (Caudal diana: 1,8 ml/min)				
SP0912-Reg	Lavado con sal NaCl 2M (volumen de la muestra 25,1 ml)	$\leq 1,9$	$\leq 6,0$	$\leq 5,3 \log_{10}/\text{ml}$
SP0912-Col	Resina de la columna (volumen de la muestra 8,7 ml)	3,9	8,0	$7,3 \log_{10}/\text{ml}$
Nº PrPsc total incluye correcciones para el volumen de muestra, así como la concentración/dilución antes del ensayo				
♣Carga total basada en un volumen final de 50 ml cargado en la columna PRDT * Basado en un tamaño de columna de 5,0 ml				

La unión total de PrPsc a la matriz de PRDT después de un lavado con sal 2 M fue de $7,4 \log_{10} \text{DI}_{50}/\text{ml}$. No se detectó PrPsc en las fracciones de lavado con sal mediante transferencia Western. También se observó una separación significativa de PrPsc ($\geq 2,0 \log_{10}$).

El pH del material de partida enriquecido fue de 6,85. Después de la adición de 65 μl de NaOH 0,1 M y 50 μl de NaOH 1 M, el valor del pH permaneció sin cambios. El efecto probablemente resultó de la capacidad de amortiguación significativa de albúmina al 25%.

Al realizar el ensayo de interferencia, el material de partida se testó sin diluir, con centrifugación y concentración de 10 veces. Esto fue además del ensayo de interferencia descrito en el plan de estudio, y se realizó para permitir una evaluación de la posibilidad de concentrar las muestras y así lograr factores de reducción más altos.

Ejemplo 5. Análisis en proceso y de estabilidad para la albúmina humana tratada con separación de priones

En este experimento, se evaluó el efecto de la columna de separación de priones en la concentración y composición de la albúmina humana. En dos experimentos separados, se trató un litro de albúmina con la columna PRIOCLEAR™

B (50 ml) (ProMetic Biosciences). La muestra no tratada, la muestra recogida al comienzo de la operación y la muestra recogida al final de la operación se sometieron a análisis de concentración y composición. Los resultados se muestran en las Tablas 15 y 16.

Tabla 15. Resultado para la Albúmina Humana en el Experimento Uno

Descripción de la Muestra	Concentración de HA, mg/mL	Composición de HA (%)			
		Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero
HA, No tratada	252	93,73	2,71	3,56	ND
Columna de HA Post-separación de Priones, Muestra Recogida al Comienzo de la Operación	253	93,93	2,71	3,36	ND
Columna de HA Post-separación de Priones, Muestra Recogida al Final de la Operación (1L)	255	93,76	2,72	3,52	ND

5

Tabla 16. Resultado para la Albúmina Humana en el Experimento Dos

Descripción de la Muestra	Concentración de HA, mg/mL	Composición de HA (%)			
		Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero
HA, No tratada	206	92,15	3,08	4,34	0,44
Columna de HA Post-separación de Priones, Muestra Recogida al Comienzo de la Operación HA	181	92,26	3,05	4,27	0,42
Columna de HA Post-separación de Priones, Muestra Recogida al Final de la Operación (1L)	206	92,19	3,08	4,30	0,43

No se observaron diferencias significativas en la albúmina antes y después del proceso de separación de priones.

Además, los autores de la invención evaluaron la estabilidad en el proceso de la albúmina humana tratada para la separación de priones y suspensiones de Abraxane® fabricadas utilizando la albúmina humana tratada para la separación de priones. El resultado se muestra en las Tablas 17 y 18.

10

Tabla 17. Estabilidad En proceso de Soluciones de HA Tratadas del Experimento Uno y Suspensiones de Abraxane Fabricadas utilizando HA Tratada

Descripción de la Muestra	Condiciones de almacenamiento	Concentración de HA, mg/mL	Composición de HA (%)			
			Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero
Solución de HA concentrada	Tiempo 0	255	93,79	2,73	3,48	ND
	24 h a 5°C	257	93,76	2,74	3,50	ND
	48 h a 5°C	255	93,74	2,77	3,49	ND
	72 h a 5°C	255	93,76	2,73	3,50	ND
Solución de HA diluida	tiempo 0	51	93,79	2,73	3,47	ND
	24 h a 5°C	51	93,82	2,71	3,47	ND
	48 h a 5°C	51	93,83	2,70	3,47	ND
	72 h a 5°C	51	93,85	2,69	3,46	ND
Suspensión de Abraxane® antes	tiempo 0	57	88,39	7,14	3,26	1,22

Descripción de la Muestra	Condiciones de almacenamiento	Concentración de HA, mg/mL	Composición de HA (%)			
			Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero
de la Liofilización	24 h a 25°C	57	86,32	8,19	3,25	2,25
	36 h a 25°C	55	88,22	8,44	2,13	1,21

Tabla 18. Estabilidad En proceso de Soluciones de HA Tratadas del Experimento Dos y Suspensiones de Abraxane Fabricadas utilizando HA Tratada

Descripción de la Muestra	Condiciones de almacenamiento	Concentración de HA, mg/mL	Composición de HA (%)			
			Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero
Solución de HA concentrada	tiempo 0	206	92,22	3,09	4,25	0,44
	24 h a 5°C	202,7	92,28	3,03	4,26	0,43
	48 h a 5°C	204,1	92,32	2,99	4,25	0,44
	72 h a 5°C	200,3	92,14	3,06	4,35	0,44
Solución de HA diluida	tiempo 0	51,4	92,28	3,04	4,26	0,42
	24 h a 5°C	51,1	92,30	3,01	4,27	0,43
	48 h a 5°C	52,1	92,38	2,95	4,24	0,43
	72 h a 5°C	51,7	92,45	2,93	4,22	0,41
Suspensión de Abraxane® antes de la Liofilización	tiempo 0	57	85,78	8,30	3,97	1,94
	24 h a 25°C	57,1	85,28	8,67	3,95	2,10
	36 h a 25°C	57,4	87,72	7,62	3,43	1,23

- 5 Además, los autores de la invención compararon la estabilidad acelerada de la albúmina humana en productos terminados de Abraxane®, fabricados utilizando albúmina humana tratada para la separación de priones (lote de planta piloto que utiliza albúmina humana tratada para la separación de Priones) y productos terminados de Abraxane®, fabricados con albúmina humana no tratados para la separación de priones (Lote de Exhibición de Abraxane, lote de Validación de Abraxane y lote de planta piloto de Abraxane). El resultado se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Estabilidad Acelerada de HA en Productos Acabados de Abraxane Fabricados utilizando HA Tratada para la separación de priones. Comparación con Productos Terminados Fabricados utilizando HA Sin Tratar

Descripción de la Muestra	Experimentos	Condiciones de almacenamiento	Composición de HA							
			Monómero		Dímero		Polímero		Oligómero	
			%	Cambio Durante Almacenamiento	%	Cambio Durante Almacenamiento	%	Cambio Durante Almacenamiento	%	Cambio Durante Almacenamiento
Tanda Planta Piloto utilizando HA Tratada para Separación de Priones	Experimento 1	tiempo 0	84,66	N/A	9,33	N/A	2,76	N/A	3,25	N/A
		2W a 55°C	70,39	-14,27	17,16	7,83	8,77	6,01	3,67	0,42
		1M a 55°C	61,83	-22,83	19,34	10,01	14,55	11,79	4,27	1,02
		1M a 40°C	76,22	-8,44	14,58	5,25	5,71	2,95	3,49	0,24
Lote de Exhibición de Abraxane	Experimento 1	tiempo 0	86,70	N/A	9,40	N/A	2,1	N/A	2,50	N/A
		3M a 40°C	71,20	-15,50	17,20	7,80	8,9	6,80	2,70	0,20
		3M a 40°C	63,90	-22,80	19,30	9,90	13,9	11,80	3,00	0,50
Tanda Planta Piloto utilizando HA Tratada para Separación de Priones	Experimento 2	tiempo 0	84,44	N/A	9,03	N/A	2,32	N/A	4,17	N/A
		2 S a 55°C	72,43	-12,01	16,02	6,99	7,12	4,80	4,39	0,22
Lote de Validación del Proceso de Abraxane	Experimento 2	tiempo 0	86,70	N/A	7,00	N/A	1,5	N/A	4,80	N/A
		3M a 40°C	75,60	-11,10	14,30	7,30	5,4	3,90	4,70	-0,10
		6M a 40°C	68,80	-17,90	16,80	9,80	9,2	7,70	5,20	0,40
Tanda Planta Piloto de Abraxane	Experimentos 1 y 2	tiempo 0	89,45	N/A	5,73	N/A	1,33	N/A	3,5	N/A
		2 S a 55°C	75,19	-14,26	14,92	9,19	6,21	4,88	3,68	0,18

- 5 La comparación de los datos de estabilidad demuestra que el almacenamiento durante 2 semanas a 55°C es equivalente al almacenamiento durante 3 meses a 40°C. No se observaron diferencias significativas durante el proceso de fabricación y durante el ensayo en proceso entre tandas de plantas piloto fabricadas con albúmina humana tratada para la separación de priones y tandas de planta piloto fabricadas con albúmina humana no tratada. No hubo diferencias significativas entre las propiedades de los productos terminados fabricados utilizando albúmina humana tratada para la separación de priones y las propiedades del producto terminado fabricado con albúmina humana no tratada.

Ejemplo 6: Evaluación del efecto de la columna de separación de priones en la suspensión en proceso de Abraxane®

- 10 Este experimento evalúa el efecto de la separación de priones de la suspensión en proceso de Abraxane®, a saber, la suspensión de Abtaxane®. En este experimento se utilizaron columnas del kit PIKSI comercialmente disponibles (1 cc), que contienen resina Toyopearl Amino 650CU, ProMetic Biosciences.

En dos experimentos separados, se procesaron 0,5 L de Abraxane® en suspensión en proceso que contenía albúmina humana a través de la columna. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Efecto de la Columna de Separación de Priones en la Suspensión En Proceso de Abraxane

Muestra No,	Conc. HA, mg/mL	Composición de HA, %				Pacitaxel, mg/mL	Impurezas, %		Tamaño de partícula, nm				pH
		Monómero	Dímero	Polímero	Oligómero		7-Epipacitaxel	Total	Media	<5%	<95%	<99,9%	
1	55	88,29	5,95	3,99	1,32	6,9	0,08	0,25	131	82	193	254	7,0
2	56	88,37	5,96	3,86	1,36	6,9	0,08	0,25	132	86	190	250	7,0
3	56	88,38	5,96	3,76	1,39	6,8	0,09	0,26	130	82	190	250	7,0

Muestra 1: Suspensión En Proceso de Abraxane, No Tratada

Muestra 2: Suspensión En Proceso de Abraxane, Columna post-separación de Priones, Muestra recogida al Comienzo de la Operación

5 Muestra 3: Suspensión En Proceso de Abraxane, Columna post-separación de Priones, Muestra recogida al Final de la Operación (0,5 L).

Tal como se muestra en la Tabla 20, el ensayo físico y químico de la suspensión en proceso de Abraxane® tratada para la separación de priones no muestran diferencias significativas entre la suspensión no tratada y la tratada, en términos de tamaño de partícula, pH, ensayo de paclitaxel e impurezas, ensayo de albúmina humana (HA) y composición de HA.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de producir una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:
 - a) someter una mezcla que comprende una fase orgánica que comprende dicho agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua dispersado y una solución de albúmina a una condición de alto cizallamiento,
 - b) separar una proteína priónica de dicha mezcla, en donde dicha separación comprende:
 - 1) poner en contacto la mezcla con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica; y
 - 2) separar de dicha mezcla el ligando y las proteínas unidas al mismo; yen donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina o un agente de radiocontraste diagnóstico.
2. Un método de separar una proteína priónica de una composición de la que se sospecha que contiene una proteína priónica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende:
 - a) poner en contacto la composición con un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, y
 - b) separar de la composición el ligando y las proteínas unidas al mismo; yen donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina o un agente de radiocontraste diagnóstico.
3. Una composición que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y un agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, que comprende, además, un ligando capaz de unirse a una proteína priónica, en donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua, es un taxano, una epotilona, una camptotecina, una colchicina, una geladanamicina, una amiodarona, una hormona tiroidea, anfotericina, un corticosteroide, propofol, melatonina, ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, un ácido micofenólico, ifosfamida, vinorelbina, vancomicina, gemcitabina, SU5416, tiotepa, bleomicina, o un agente de radiocontraste diagnóstico.
4. El método de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3, en donde el agente farmacológicamente activo, sustancialmente insoluble en agua es un taxano, y en donde el taxano es paclitaxel, docetaxel u ortataxel.
5. El método o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ligando es un péptido.
 6. El método o la composición de la reivindicación 5, en donde el péptido es DVR, YVHEA, AMN31, SYA o D4.
 7. El método o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ligando es un compuesto basado en triazina.
 8. El método o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ligando es un anticuerpo que reconoce a una proteína priónica.
 9. El método o la composición de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es 3F4, 6H4, 16A18, ICSM-4 o ICSM-10.
 10. El método o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ligando es un material polimérico que se une a una proteína priónica.
 11. El método o la composición de la reivindicación 10, en donde el material polimérico comprende un grupo amino, un grupo fenilo o una cadena principal de metacrilato.

Figura 1

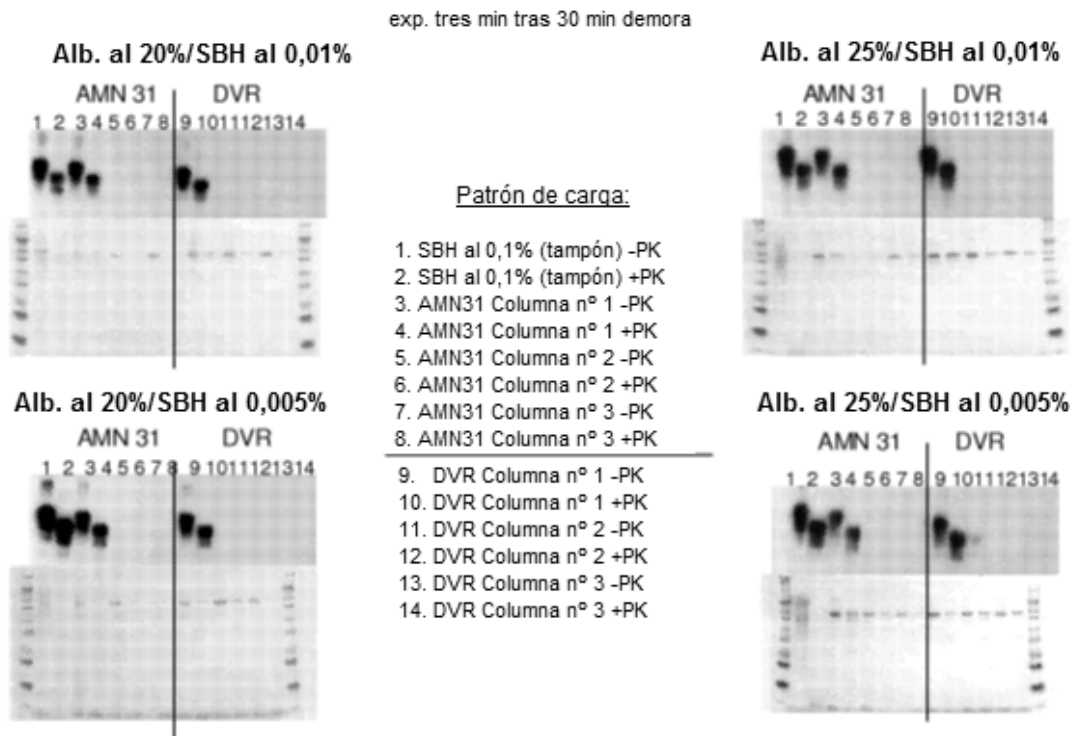


Figura 2

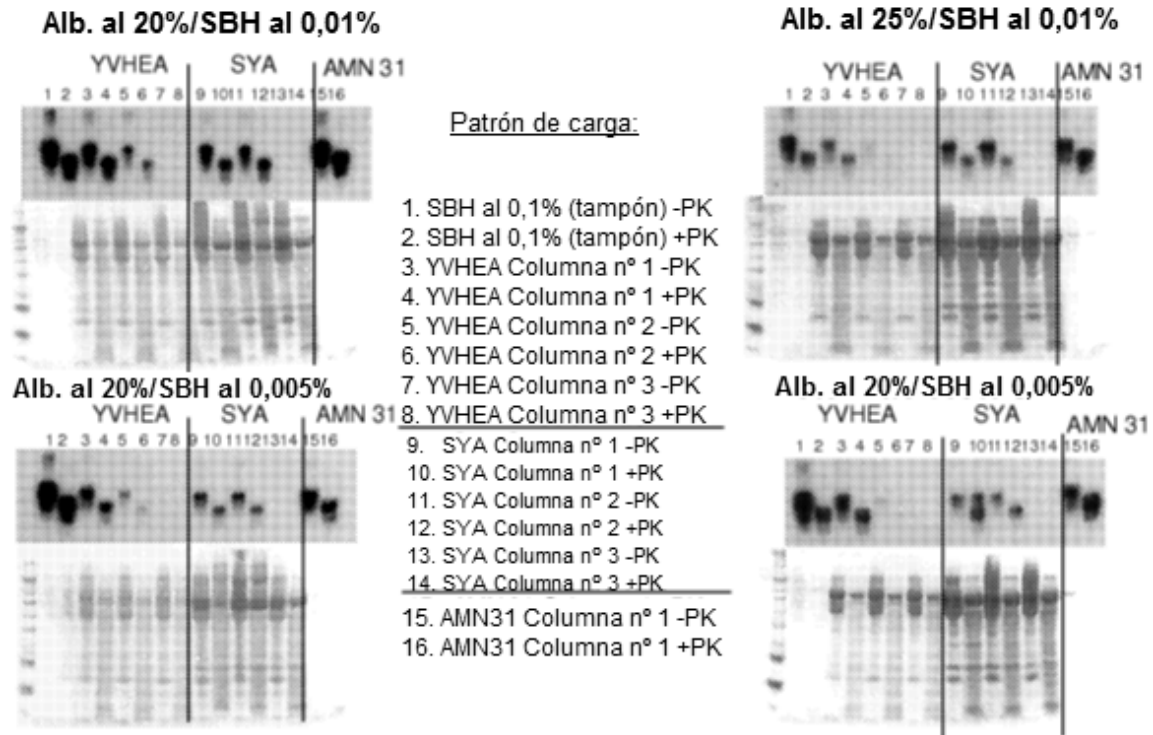


Figura 3

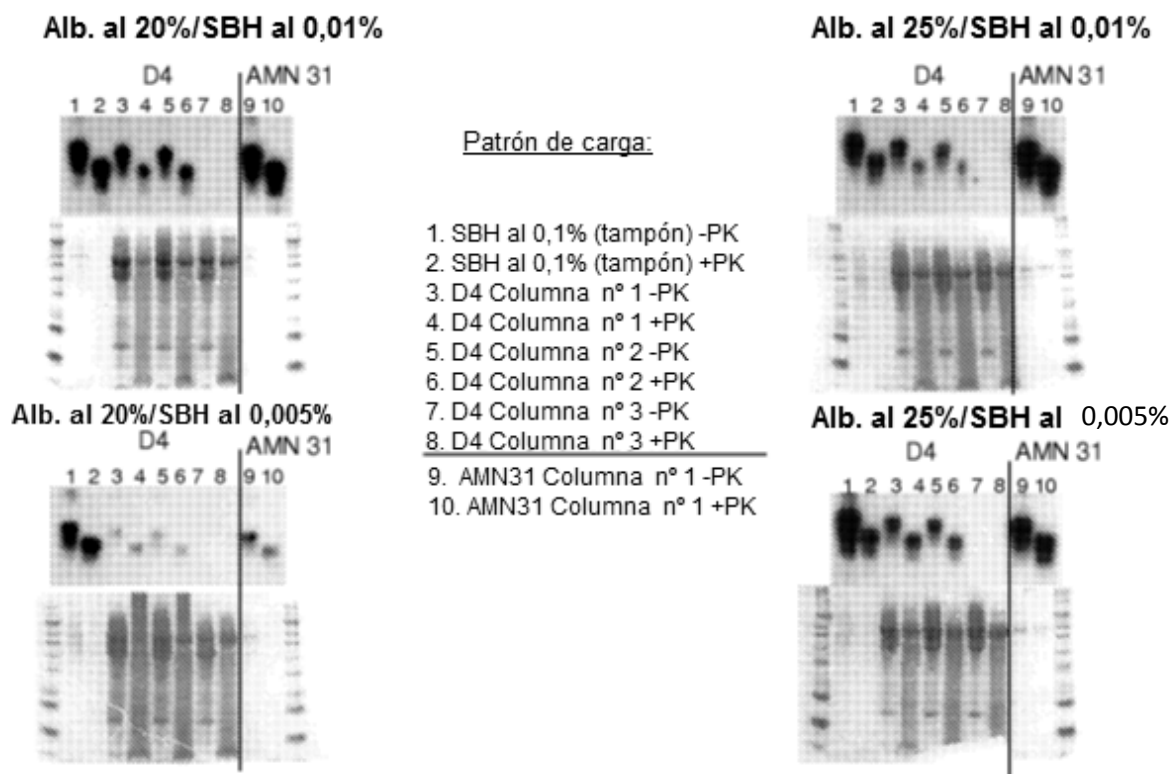


Figura 4

Separación de TSE por la Columna de Resina de Reducción de Priones (Columna PRDT) para Albúmina al 20%

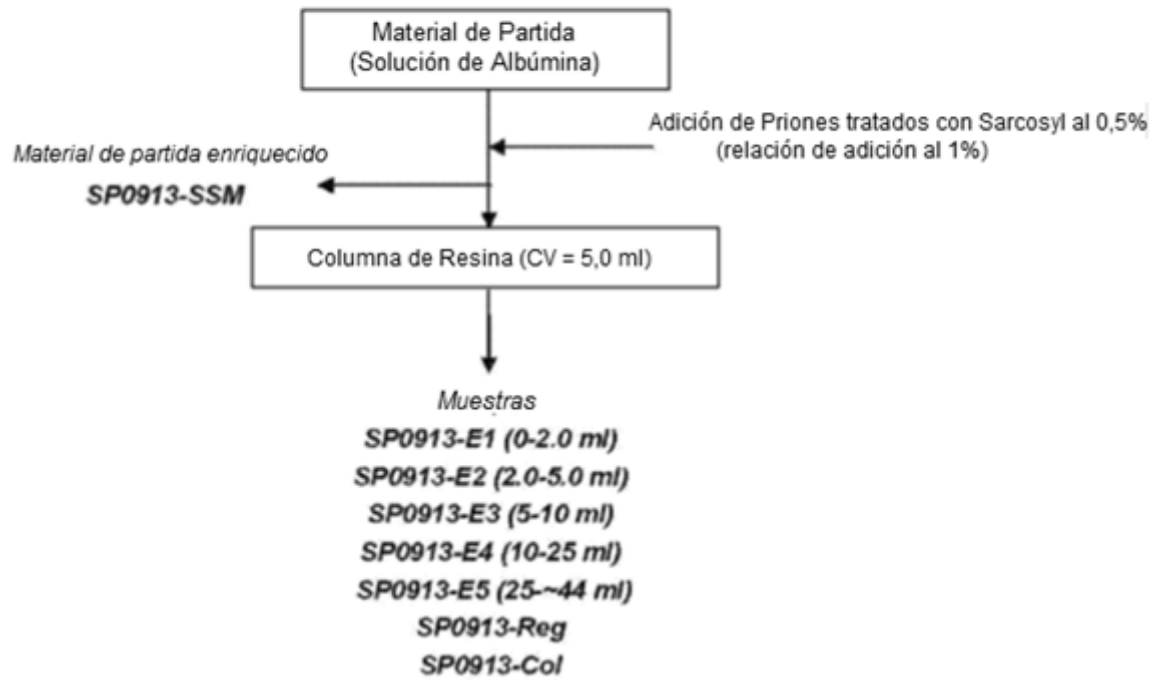
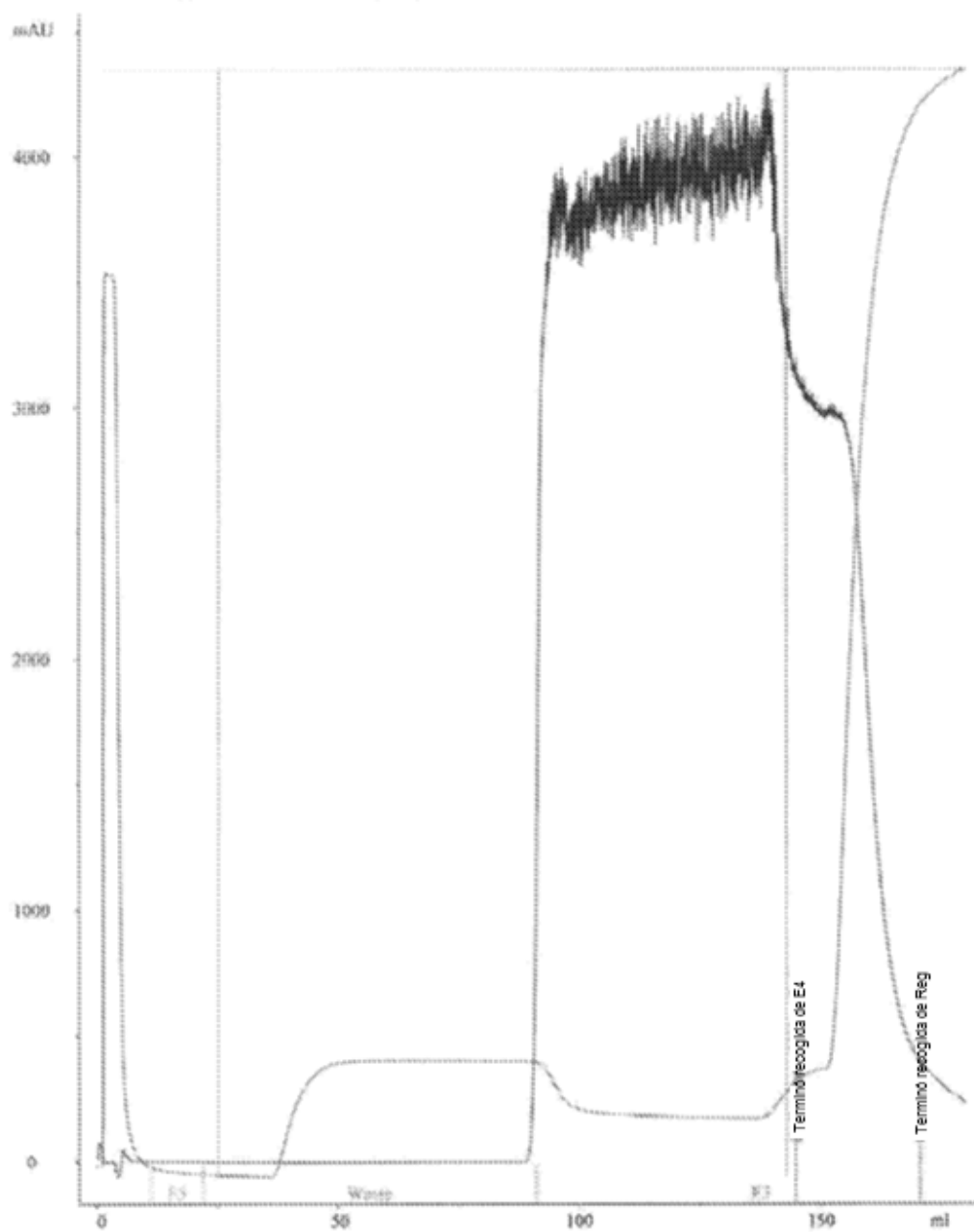


Figura 5

Perfil de Cromatografía para la Cromatografía de Resina PRDT



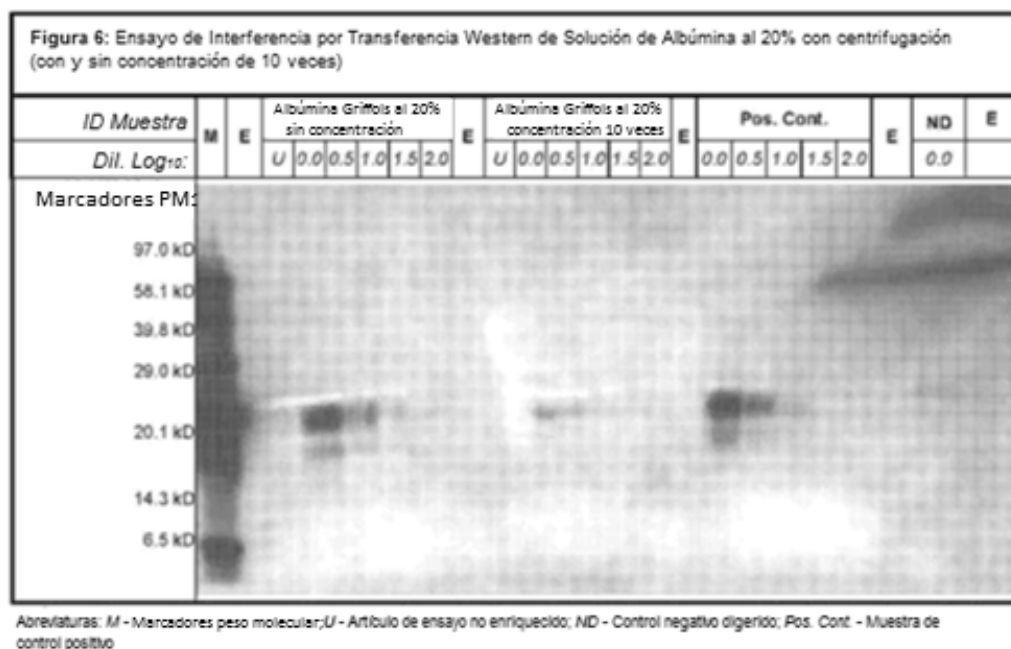


Figura 7

Separación de TSE por la Columna de Resina de Reducción de Priones (Columna PRDT) para Albúmina al 25%

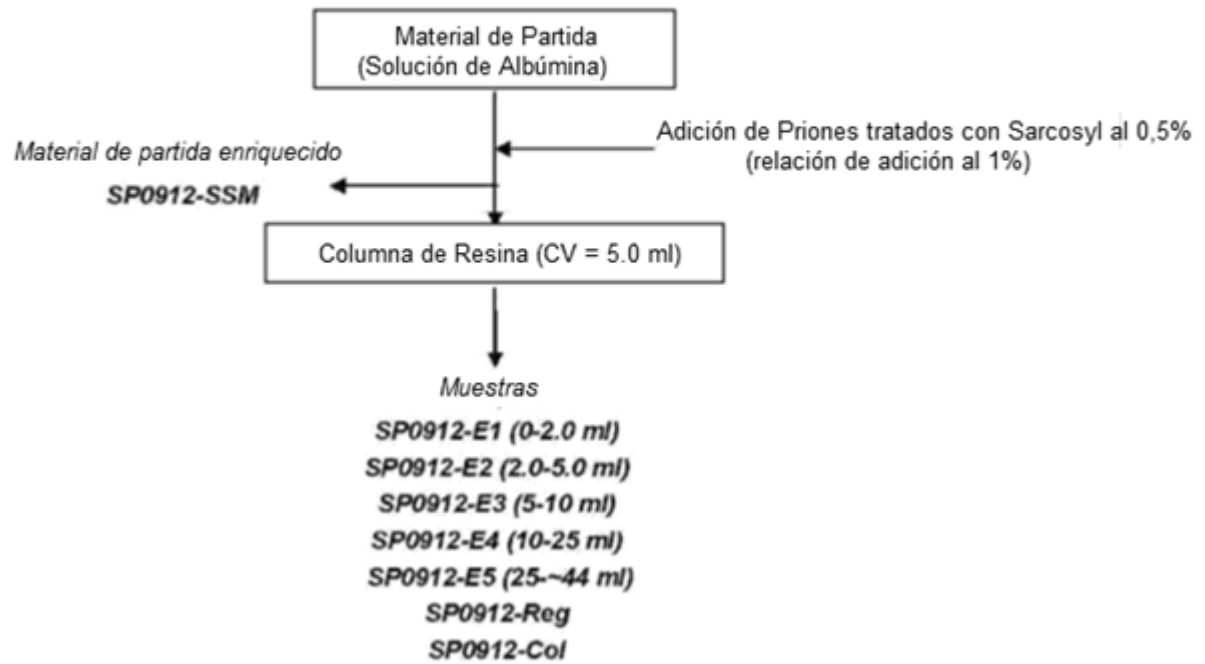
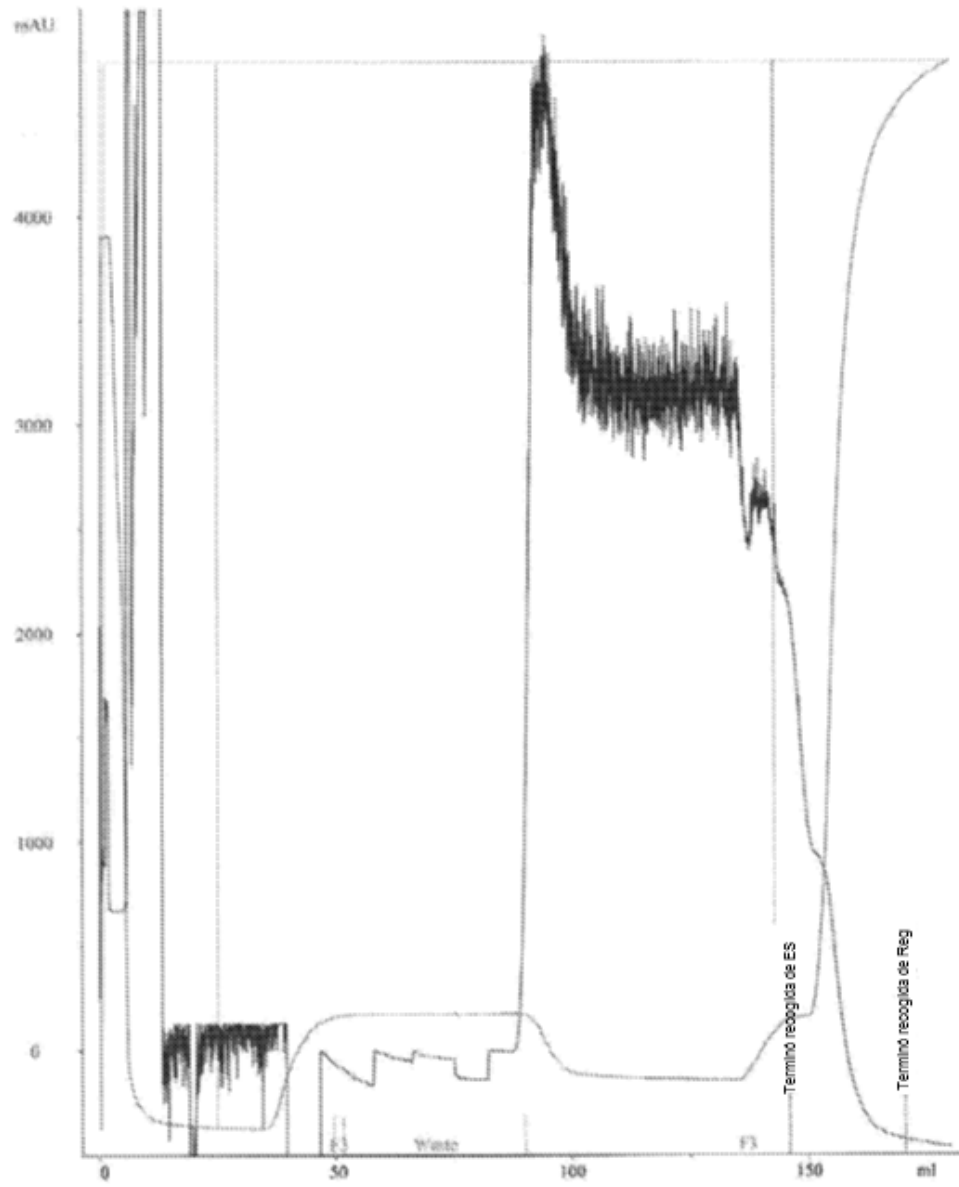
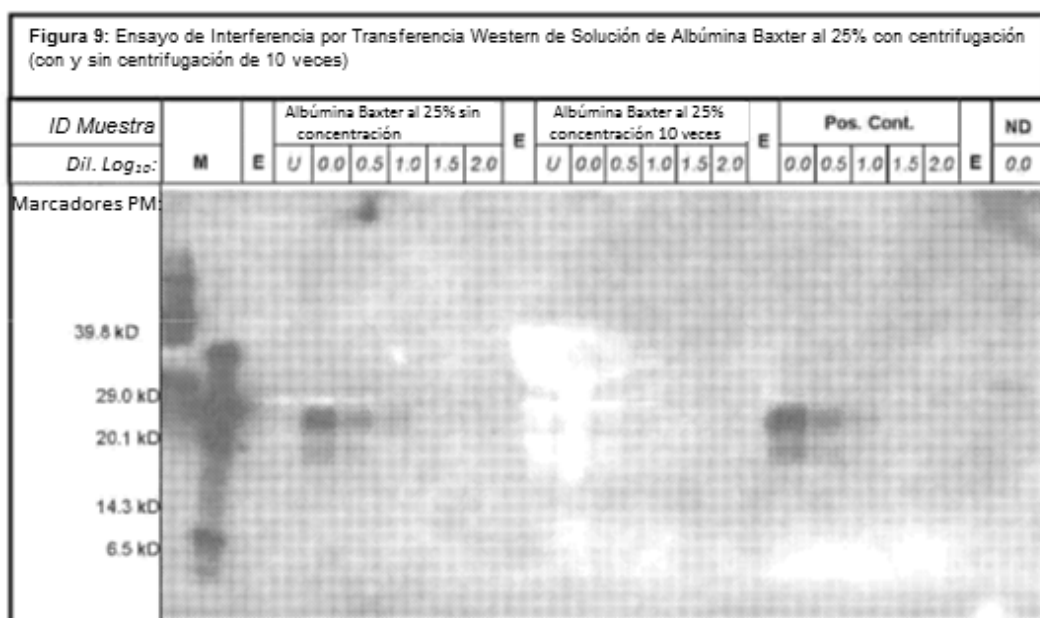


Figura 8

Perfil de Cromatografía para la Cromatografía de Resina PRDT





Abreviaturas: *M* - Marcadores peso molecular; *U* - Artículo de ensayo no enriquecido; *ND* - Control negativo digerido; *Pos. Cont.* - Muestra de control positivo