

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 086**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/22 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010** **E 16176458 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 3128014**

54 Título: **Medios y métodos de esterilización de composiciones biofuncionales**

30 Prioridad:

31.03.2009 EP 09004735

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

30.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALTRICHTER, JENS;
BREUER, ANJA;
SCHAATH, NICOLE y
QUATHAMER, JULIA**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 770 086 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

Medios y métodos de esterilización de composiciones biofuncionales

5 Campo de la invención

La presente invención, entre otras, se refiere a un envase estéril, tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende al menos un portador que es un estabilizador; y al menos una biomolécula unida de manera reversible al portador, en el que dicho portador cubre parcial o completamente las biomoléculas unidas y en el que dicho al menos un portador comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes. La invención también se refiere a métodos para producir envases esterilizados según la invención y a usos de los mismos.

En esta memoria descriptiva, se citan varios documentos incluyendo solicitudes de patente y manuales del fabricante.

Estado de la técnica

Una preocupación principal en la fabricación de productos terapéuticos y profilácticos es asegurar que no puedan transmitirse contaminantes microbianos al receptor o usuario de tales productos. Sin embargo, estos productos farmacéuticos se obtienen generalmente a partir de materiales biológicos que pueden contener patógenos como, por ejemplo, virus, o su procedimiento de fabricación utiliza reactivos o medios de cultivo que se sospecha que están contaminados con patógenos.

Por tanto, las directrices internacionales recomiendan introducir en el procedimiento de fabricación de productos farmacéuticos etapas específicas para eliminar o inactivar esos posibles contaminantes bacterianos o virales. La Nota Europea de Orientación CPMP/BWB/268/95 de 14 de febrero de 1996 define lo que es un método claramente eficaz para inactivar o eliminar virus como un método que puede reducir la infectividad en aproximadamente 4 Log (= 4 log 10) o más.

Existen numerosos métodos para la eliminación o inactivación de virus y otros contaminantes, por ejemplo, tratamiento con óxido de etileno, tratamiento con disolvente-detergente (SD, por sus siglas en inglés), tratamiento con calor o pH ácido, cromatografía, nanofiltración, pasteurización o radiación.

Sin embargo, todos estos métodos sufren graves inconvenientes:

El tratamiento con óxido de etileno tiene la desventaja de que a menudo reacciona con proteínas. Además, debido a la toxicidad tisular y el potencial carcinógeno conocidos de los subproductos del etileno, sólo se permite añadir cantidades muy pequeñas de óxido de etileno a los productos biofarmacéuticos.

El documento WO 2007/128550 se refiere a portadores sólidos recubiertos para la inmovilización de sustancias biológicas. El portador puede ser incubado con albúmina, hidroxietil almidón, manitol, sorbitol y PEG, y puede ser esterilizado de manera terminal.

El documento EP0805353 proporciona un agente inmunorreactivo que comprende: una o más sustancias inmunorreactivas y/o componentes inmunorreactivos en una capa o capas formadas sobre un portador en presencia de un agente de protección, y deshidratado y secado.

El documento WO 2006/124988 se refiere a un método para la esterilización terminal de un producto de colágeno inyectable. El método se dirige a reducir el nivel de contaminantes o patógenos biológicos activos sin afectar de manera adversa al material biológico. El método incluye una etapa de congelación. No se requiere la presencia de un estabilizador ya que se considera que la etapa de congelación es suficiente.

El documento WO 2002/082462 describe un método para esterilizar una formulación que contiene lípidos en el que el pH y la fuerza iónica de la formulación que contiene lípidos se ajusta opcionalmente y la formulación que contiene lípidos se somete a una temperatura de entre aproximadamente 126°C y aproximadamente 130°C durante un tiempo de entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 10 minutos. Un excipiente de estabilización es añadido opcionalmente a la formulación que contiene lípidos.

El documento US 4.244.943 se refiere a un método para preparar una inyección de urocinasa estable mediante la liofilización de urocinasa que comprende liofilizar una disolución acuosa que contiene urocinasa, albúmina sérica humana y uno o más compuestos aminoácídicos seleccionados entre aminoácidos polares y una sal de los mismos. La inyección de urocinasa obtenida según este método mejora la estabilidad en almacenamiento en comparación con preparaciones de urocinasa convencionales para inyección.

El documento WO 97/42980 describe un método de esterilización de compuestos biológicamente activos que usa inactivación por calor. El método incluye la obtención de una muestra secada que contiene una cantidad de

trehalosa suficiente para proporcionar estabilidad térmica y la exposición de la muestra secada a condiciones de calentamiento a una temperatura y durante una duración suficiente para inactivar sustancialmente los virus. Sin embargo, el tiempo y la temperatura aplicados no cumplen con la definición de esterilización. La esterilización se define como un procedimiento validado para la eliminación o destrucción de todas las formas de vida microbiana (bacterias, virus, hongos, esporas) (WHO Aids serie n.º 2, segunda edición. Guidelines on sterilization and disinfection methods' effective against human immunodeficiency virus (HIV). Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1989). Debido a motivos estadísticos, la eliminación completa no puede comprobarse durante la validación. Por tanto, el término "nivel de garantía de esterilidad" (SAL, por sus siglas en inglés) se usa como una medición de la esterilidad. Según la norma ISO 11139: 2006 (1), el nivel de garantía de esterilidad (SAL) es la probabilidad de que un único microorganismo viable se presente en un artículo después de la esterilización. El término SAL toma un valor cuantitativo, generalmente 10^{-6} ó 10^{-3} . Cuando se aplica este valor cuantitativo para garantizar la esterilidad, un SAL de 10^{-6} toma un valor más bajo, pero proporciona una garantía de esterilidad mayor que un SAL de 10^{-3} . Un SAL de 10^{-6} significa que existe una probabilidad de menos de 1 en un millón (10^{-6}) de que un artículo particular se contamine. SAL = 10^{-6} es el patrón aceptable para los artículos críticos. Para garantizar un SAL = 10^{-6} mediante esterilización térmica en seco, el tiempo y la temperatura son importantes. Se acepta generalmente que las siguientes combinaciones de tiempo y temperatura tienen que excederse para garantizar un SAL= 10^{-6} :

- 60 min a 170°C (340°F)

- 120 min a 160°C (320°F)

- 150 min a 150°C (300°F)

- 12 horas a 121°C (250°F)

El método descrito en el documento WO 97/42980 no es suficiente para garantizar un SAL= 10^{-6} . Por tanto, se hace un uso indebido del término "esterilización" y el método es más bien un "método de reducción de virus" que un método de esterilización.

El documento US 5.730.933 da a conocer un método para la inactivación de compuestos biofuncionales usando esterilización por radiación. La esterilización por radiación tiene la ventaja de una alta capacidad de penetración, una reactividad química relativamente baja y un efecto instantáneo sin la necesidad de controlar la temperatura, la presión, el vacío o la humedad. Además, la esterilización por radiación se usa ampliamente en la industria para una variedad de productos y se conocen bien, tanto los niveles de dosificación, como sus efectos biológicos. En general, se ha comprobado que una dosis de radiación de > 25 kGy garantiza un SAL = 10^{-6} durante la validación de procedimientos de esterilización.

El método de esterilización por radiación dado a conocer en el documento US 5.730.933 implica la incubación del compuesto biológico en una disolución protectora que contiene proteínas (gelatina, albúmina sérica bovina) y eliminadores de radicales libres, así como la congelación de los compuestos biológicos. Aunque la congelación de compuestos biológicamente activos es una parte esencial del método dado a conocer en el documento US 5.730.933, tiene la desventaja de que la actividad del compuesto biofuncional se reduce de manera drástica, en los ejemplos citados en el documento US 5.730.933 a menos del 10% de la actividad antes de la esterilización y congelación. Además, las disoluciones que contienen proteínas como la usada en el documento US 5.730.933 tienen la desventaja de que los compuestos biofuncionales que se incuban en estas disoluciones tienen un alto riesgo de ser contaminadas por microorganismos.

Otra solución para producir productos farmacéuticos no contaminados es su producción aséptica. Sin embargo, un inconveniente principal de este enfoque es que el procedimiento de producción completo tiene que realizarse en condiciones asépticas en una sala estéril. Esto lleva mucho tiempo y es costoso. Además, sólo puede alcanzarse un nivel de seguridad bajo mediante la producción aséptica. Habitualmente, una producción aséptica puede garantizar sólo un SAL= 10^{-3} , lo que significa que el procedimiento se valida para garantizar que menos de 1 en mil artículos particulares producidos en condiciones asépticas están libres de contaminaciones microbianas. Esto es mil veces menos que la esterilización habitual.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos de esterilización que sean compatibles con la fabricación de productos biofarmacéuticos.

Un reto principal cuando se esterilizan compuestos biofuncionales es evitar cambios irreversibles en los compuestos activos durante la esterilización. Las proteínas terapéuticas son, en general, de estructura compleja y muy frágiles, es decir, sensibles a la degradación (modificación de su estructura primaria) y/o desnaturalización (modificación de sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria), lo que hace que soporten con dificultad los métodos de inactivación de virus o de esterilización agresivos.

Estas modificaciones moleculares después de la esterilización pueden dar como resultado una pérdida de la actividad biológica o de las propiedades antigénicas de estos compuestos, una estabilidad reducida en su forma

farmacéutica tras el almacenamiento y nuevas propiedades de inmunogenicidad que podrían poner al receptor de tales productos en riesgo de reacciones alérgicas tras la administración o aplicación repetida.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un envase estéril tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas que comprende al menos un portador que es un estabilizador; y al menos una biomolécula unida de manera reversible al portador, en el que dicho portador cubre parcial o completamente las biomoléculas unidas y en el que dicho al menos un portador comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes.

Sorprendentemente, se encontró que proporcionando biomoléculas en un envase según la invención, o que puede producirse o que se produce según el método de la presente invención, se alcanzan las siguientes ventajas sobre el estado de la técnica: las biomoléculas comprendidas en los envases de la presente invención retienen un grado muy alto de su actividad incluso después de los métodos de esterilización convencionales que se conocen para dar como resultado un SAL de 10^{-6} . Por tanto, los envases que comprenden la biomolécula pueden llenarse y cerrarse antes de la esterilización y puede esterilizarse, preferiblemente esterilizarse de manera terminal o a granel. La esterilización (terminal o a granel) permite la producción del envase que comprende biomoléculas en condiciones no estériles o semiestériles. Debido a esta característica, los costes de producción pueden reducirse en gran medida en comparación con los costes para la producción de envases convencionales para biomoléculas que tienen que producirse en, es decir, condiciones asépticas.

Los envases esterilizados que se han esterilizado (de manera terminal o a granel) obtenidos de esta manera contienen productos biofuncionales estables que no contienen patógenos medibles, es decir, patógenos no viables o esencialmente no viables, o patógenos inactivados, o una cantidad de patógenos, que retiene un porcentaje significativo de su actividad, que no es detectable.

La invención se refiere además a métodos para producir envases esterilizados tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas.

Los métodos incluyen la obtención de una muestra en un envase que contiene un estabilizador en una cantidad suficiente para proporcionar estabilidad al producto biofuncional y la exposición de la muestra a las condiciones de esterilización durante una duración suficiente para inactivar sustancialmente los patógenos, especialmente bacterias y virus. Las condiciones de esterilización incluyen tratamiento con óxido de etileno, inactivación por calor, esterilización en autoclave, esterilización por plasma y, preferiblemente, radiación como radiación beta o gamma.

No tienen que añadirse eliminadores durante el procedimiento de esterilización.

Debido a la introducción de estabilizadores, la mayoría de biomoléculas pueden ser almacenadas incluso a temperatura ambiente durante mucho tiempo.

Debido a la unión reversible de las biomoléculas sobre el portador en el envase, se alcanza una liberación rápida de las biomoléculas después de la adición de un disolvente adecuado. Esto permite el uso directo de la disolución que contiene biomoléculas para la inyección en un paciente.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe un envase estéril que comprende un portador, al menos una biomolécula unida de manera reversible al portador, al menos un estabilizador que cubre la(s) biomolécula(s) parcial o completamente y opcionalmente una tapa, en el que dicho al menos un estabilizador se selecciona del grupo que consiste en (poli) péptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, polialcoholes, polietilenglicoles, líquidos iónicos, solutos compatibles, saponinas y una mezcla de los mismos, en el que preferiblemente el propio estabilizador es el portador.

La presente invención proporciona un envase estéril tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas que comprende al menos un portador que es un estabilizador; y al menos una biomolécula unida de manera reversible al portador, en el que dicho portador cubre parcial o completamente las biomoléculas unidas y en el que dicho al menos un portador comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes.

El término "envase" en el contexto de la presente invención se refiere a todos los receptáculos adecuados para biomoléculas. Estos receptáculos pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, viales, ampollas, crioenvases, tubos, frasquitos, frascos, botellas y bolsas.

El envase y la tapa (cuando el envase comprende una tapa) pueden estar formados por elementos separados (por ejemplo, un vial de vidrio con tapón de caucho) o prepararse en una pieza (por ejemplo, una ampolla de plástico).

El término "al menos uno/una" junto con los términos "biomolécula", "portador" y "estabilizador" se refiere a la

presencia de al menos una clase de molécula tal como al menos una clase de biomolécula y/o al menos una clase de estabilizador. El término no se refiere al número de moléculas.

El término "biomoléculas" describe, en el contexto de la invención, cualquier material que es esencialmente de origen biológico y que tiene características que son relevantes para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico y científicas. Las biomoléculas son moléculas orgánicas que se producen preferiblemente por un organismo vivo, incluyendo, preferiblemente, moléculas poliméricas biodegradables tales como (poli)péptidos o péptidos, hidratos de carbono, lípidos y ácidos grasos y ácidos nucleicos, así como moléculas pequeñas tales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios y productos naturales. Otras biomoléculas preferidas son combinaciones de las moléculas anteriores, por ejemplo, glicoproteínas, proteoglicanos, glicolípidos, complejos de ácido nucleico-proteína. El término "biomoléculas" no sólo comprende moléculas nativas, ya que pueden aislarse de orígenes naturales, sino también (derivados de) biomoléculas que se producen de manera natural o fragmentos biológicamente activos de las mismas, así como moléculas artificiales, recombinantes o (semi)sintéticas, es decir moléculas que se producen de manera natural o artificiales que se producen de manera sintética, semisintética o recombinante. Las moléculas artificiales son, por ejemplo, las derivadas de moléculas que se producen de manera natural con alteraciones introducidas. Moléculas poliméricas biodegradables distintas de las que pertenecen a las clases mencionadas anteriormente son: lignina y poli (alcanoatos de hidroxilo) (polímeros naturales) y ésteres de polialcileno, poli (ácido láctico) y sus copolímeros, ésteres de poliamida, ésteres de polivinilo, poli (alcoholes vinílicos) y polianhídridos (polímeros artificiales). Todas las moléculas o clases de moléculas anteriores están dentro del término "biomoléculas".

Para el experto en la técnica, se entiende que el término "biomoléculas", tal como se aplica en la presente invención, también comprende biomoléculas, tal como se describen anteriormente, que están comprendidas en o sobre estructuras tales como células eucariotas o procariotas, tejidos, virus, así como fragmentos de los mismos (por ejemplo, orgánulos, membranas o cápsides). El término "biomolécula" en términos de la presente invención también incluye biomoléculas que están comprendidas en o sobre células madre o células tumorales, así como fragmentos de las mismas. En esta realización de la presente invención, las biomoléculas pueden unirse al portador sólido de forma aislada o estar comprendidas en o sobre dichas células eucariotas o procariotas, tejidos, virus o fragmentos de los mismos. Alternativamente, las estructuras que comprenden las biomoléculas, preferiblemente sobre su superficie, pueden servir como portadores según la presente invención.

Las biomoléculas preferidas ejercen propiedades que son relevantes para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico o científicas. Dicho de otro modo, las biomoléculas aplicables en la presente invención ejercen preferiblemente una actividad biológica que las hace útiles y aplicables como agente(s) farmacéuticamente activo(s), agente(s) de diagnóstico y/o herramientas de investigación.

El término "(poli)péptido", tal como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas que comprende el grupo de los péptidos, así como el grupo de los polipéptidos, usándose el último término de manera intercambiable con el término "proteína". El grupo de los péptidos consiste en moléculas de hasta 30 aminoácidos, el grupo de los polipéptidos consiste en moléculas con más de 30 aminoácidos. El grupo de los "péptidos" también describe fragmentos de proteínas de una longitud de 30 aminoácidos o menos. Los polipéptidos o péptidos pueden formar además dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir que consisten en más de una molécula de polipéptido o péptido. Las moléculas de polipéptidos o péptidos que forman tales dímeros, trímeros, etc., pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes se denominan, por consiguiente, homo o heterodímeros, homo o heterotrímeros, etc. Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" también se refieren a polipéptidos/proteínas y péptidos modificados de manera natural, en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica. Los (poli)péptidos especialmente preferidos son anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen su especificidad de unión, enzimas, receptores, proteínas de membrana, proteínas de transporte, factores de la coagulación sanguínea, hormonas, citocinas o fragmentos funcionales de los mismos.

Los estabilizadores preferidos que están dentro del término "péptido" son dipéptidos y tripéptidos. Por consiguiente, el al menos un estabilizador que puede ser un portador es, preferiblemente, al menos un di y/o tripéptido. Más preferiblemente, el estabilizador comprende al menos dos (correspondiente al menos a dos estabilizadores o, cuando el estabilizador es el portador, al menos a dos portadores; que se transfiere por consiguiente a los siguientes números), al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez di y/o tripéptidos diferentes. Los dipéptidos, a modo de ejemplo, son: glicilglutamina (Gly-Gln, que presenta una estabilidad mejorada en comparación con la glutamina sola), gliciltirosina (Gly-Tyr), alanilglutamina (Ala-Gln, las últimas dos presentan una solubilidad en agua aumentada en comparación con la tirosina sola) y glicilglicina. Dipéptidos que se producen de manera natural adicionales son: carnosina ((*beta*-alanil-L-histidina), anserina (*beta*-alanil-N-metilhistidina), homoanserina (N-(4-aminobutiril)-L-histidina), kiotorfina (L-tirosil-L-arginina), balenina (u opidina) (*beta*-alanil-N-*tau*-metilhistidina), glorina (éster etílico de N-propionil- γ -L-glutamyl-L-ornitina- δ -lac) y baretin (ciclo-[(6-bromo-8-en-triptófano)-arginina]). Los dipéptidos artificiales adicionales son: aspartamo (éster 1-metílico de N-L-a-aspartil-L-fenilalanina) y pseudoprolina. Los tripéptidos a modo de ejemplo son: glutatión (γ -glutamyl-cisteinil-glicina) y sus análogos ácido oftálmico (L- γ -glutamyl-L- α -aminobutiril-glicina) y ácido noroftálmico (γ -glutamyl-alanil-glicina). Los tripéptidos adicionales son: isoleucina-prolina-prolina (IPP), gliptomato (gly-pro-glu),

hormona que libera tirotropina (TRH, tiroliberina o protirelina) (L-piroglutamyl-L-histidinil-L-prolinamida), melanostatina (prolil-leucil-glicinamida), leupeptina (N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-arginina) y eisenina (pGlu-Gln-Ala-OH). Se prefiere que el al menos un tripéptido, y más preferentemente, que todos los tripéptidos, usados como estabilizador, cuando se usan en relación con aplicaciones médicas (véase a continuación), no ejerzan ninguna propiedad farmacológica.

La composición no contiene preferiblemente proteínas o fragmentos de proteínas que no sean aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos. Por consiguiente, en este aspecto preferido, la composición no contiene proteínas o fragmentos de las mismas que consisten en más de tres aminoácidos. En cambio, la composición según este aspecto comprende preferiblemente, además, al menos un aminoácido, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez aminoácidos diferentes o más tales como al menos once, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes.

El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN, tal como ARN antisentido o ARNip. Además, se incluyen moléculas que imitan ácidos nucleicos conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Tales moléculas que imitan ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos incluyen ácido nucleico fosforotioato, ácido nucleico fosforamidato, ácido ribonucleico 2'-O-metoxietilo, ácido nucleico morfolino, ácido nucleico hexitol (HNA), ácido nucleico bloqueado (LNA por sus siglas en inglés) y ácido nucleico peptídico (PNA por sus siglas en inglés) (véase Braasch y Corey, Chem Biol 2001, 8: 1). El LNA es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está limitado por un enlace de metileno entre el oxígeno de la posición 2' y el carbono de la posición 4'. Las moléculas de ácido nucleico pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas adicionales, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico incluyen además ribozimas, aptámeros, plásmidos y cromosomas. Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse de forma aislada o en un complejo con otras biomoléculas tales como proteínas, por ejemplo, proteínas de histona o proteínas del ribosoma.

El término "hidrato de carbono" se refiere a un compuesto orgánico que es un aldehído o una cetona con varios grupos hidroxilo añadidos, habitualmente uno en cada átomo de carbono que no es parte del grupo funcional aldehído o cetona. Dependiendo de la longitud de la molécula, los hidratos de carbono se denominan mono, oligo o polisacáridos. Cuando los hidratos de carbono se encuentran unidos a moléculas que no son hidratos de carbono, las moléculas resultantes se denominan glicósidos. Los hidratos de carbono modificados tienen, por ejemplo, cadenas laterales de N-acetiléster, caboxilo o sulfato y pueden contener ácido glucurónico, ácido idurónico, galactosamina, glucosamina. Los hidratos de carbono a modo de ejemplo son: amilopectina, glucógeno, almidón, alfa y beta-glucano, dextrano y glicosaminoglicanos como ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina y derivados de los mismos, tales como glicósidos.

Las proteínas especialmente preferidas son anticuerpos o fragmentos de los mismos que retienen su especificidad de unión. Los anticuerpos aplicables pueden ser, por ejemplo, policlonales o monoclonales. El término "anticuerpo" también comprende derivados de anticuerpos que todavía retienen su especificidad de unión. Los fragmentos de anticuerpos comprenden, entre otros, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ o Fv. Las técnicas para la producción de anticuerpos y fragmentos de los mismos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para la inmunoprecipitación de moléculas de interés o para eliminar moléculas no deseadas de los líquidos corporales de un paciente.

El término "anticuerpo" también incluye realizaciones tales como anticuerpos sintéticos, quiméricos, de cadena sencilla (tal como scFv) y humanizados o derivados o fragmentos de los mismos que todavía retienen su especificidad de unión. Se conocen diversos procedimientos en la técnica y pueden usarse para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a una molécula de interés o fragmentos de la misma. Además, pueden usarse animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de líneas celulares. Los ejemplos para tales técnicas incluyen la técnica del hibridoma (Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). La resonancia de plasmón superficial tal como se emplea en el sistema BIAcore puede usarse para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen a un epítipo de una biomolécula de interés (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé en el presente documento que el término "anticuerpo" comprenda constructos de anticuerpos que pueden expresarse en células, por ejemplo, constructos de anticuerpos que pueden transfectarse y/o transducirse a través de, entre otros, virus o vectores de plásmidos. Una vez que se ha obtenido el anticuerpo o fragmento del mismo, el propio anticuerpo o el ADN que lo codifica puede secuenciarse contemplando la información para producir de manera recombinante el anticuerpo o fragmento del mismo a pequeña o gran escala. Los métodos de la producción de un anticuerpo recombinante se conocen por el experto en la técnica.

El anticuerpo o derivado o fragmento del mismo puede, adicionalmente, estar modificado químicamente tal como se conoce bien en la técnica.

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

Los estabilizadores se seleccionan del grupo que consiste en al menos dos aminoácidos diferentes. Lo mismo se aplica para los estabilizadores que sean portadores para los que también se aplica la siguiente lista de ejemplos.

10 También se describen en el presente documento estabilizadores que se seleccionan de entre albúminas (por ejemplo, albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, lactoalbúmina), proteínas de choque térmico de la familia Hsp100/Clp, la familia Hsp90, la familia Hsp70, la familia Hsp60/GroEL y las proteínas de choque térmico pequeñas (sHsps) Chaperonas generales: BiP, GRP94, GRP170, chaperonas de lectina: calnexina y calreticulina, chaperonas moleculares no clásicas como HSP47 y ERp29, chaperonas de plegamiento como proteína disulfuro-isomerasa (PDI), peptidil prolil cis-trans-isomerasa (PPI) o ERp57.

15 Se describen también en el presente documento estabilizadores que son o contienen mono, oligo y polisacáridos, preferiblemente hidroxietil almidón (HES), glucógeno, amilasa, dextrano, dextrina o inulina, xilosa, manosa, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, fucosa, glicerinaldehído, dihidroxiacetona, lactosa, lactulosa, trehalosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, manitol, sorbitol, inositol, con o sin grupos amino-, N-acetilo-, hidroxietilo-, sulfato-. Los estabilizadores también pueden comprender chaperonas o caseínas. Las chaperonas son proteínas que ayudan al plegamiento/desplegamiento no covalente y el ensamblaje/desensamblaje de otras estructuras macromoleculares, pero no son presentes en estas estructuras cuando las últimas están realizando sus funciones biológicas normales.

25 Se describe también en el presente documento que los estabilizadores también pueden ser o contener líquidos iónicos o solutos compatibles. Un líquido iónico es una sal en la que los iones están coordinados de manera deficiente, lo que da como resultado que estos disolventes sean líquidos. Se sugiere que los líquidos iónicos son adecuados para proteger sustancias, recubiertas de ese modo, de influencias de materiales o radiación potencialmente dañinos. Se cree que los líquidos iónicos protegen las biomoléculas de la descomposición tras la esterilización. Los solutos compatibles son moléculas orgánicas anfóteras que se unen al agua que se caracterizan por su propiedad de ser excluidas de las superficies de las proteínas.

35 El estabilizador puede contener al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina. Las saponinas son una clase de compuestos químicos que forman metabolitos secundarios que se encuentran en fuentes naturales, derivan de fuentes naturales o pueden sintetizarse químicamente. Las saponinas se encuentran en particular abundancia en diversas especies vegetales. Las saponinas son glicósidos anfipáticos agrupados de manera fenomenológica por la espuma similar al jabón que producen cuando se agitan en disoluciones acuosas, y de manera estructural por su composición con uno o más restos de glicósidos hidrófilos combinados con un derivado de triterpeno lipófilo. Ejemplos de saponinas son: ácido glicirrónico, ácido glicirretínico, ácido glucurónico, escina, hederacósido y digitonina. Se prefiere que la saponina usada como estabilizador, cuando se usa en relación con aplicaciones médicas (véase a continuación), no ejerza ninguna propiedad farmacológica.

40 Preferiblemente, la saponina es ácido glicirrónico (también: ácido glicirrónico) o un derivado del mismo y los solutos compatibles son ectoína o hidroxiectoína.

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

50 En una realización preferida, el al menos un estabilizador y/o la al menos una biomolécula están comprendidos en una disolución tamponada. El tampón que va a ser usado depende, entre otros, de la biomolécula que va a ser recubierta/integrada. Los tampones generalmente adecuados para el contacto con biomoléculas son, por ejemplo, fosfato, citrato, acetato, borato, carbonato, lactato, amonio, glicina, barbiturato, HEPES, MOPS, MES, TRIS. Los tampones a modo de ejemplo adecuados para anticuerpos se describen adicionalmente a continuación.

60 Según la presente invención, el al menos un estabilizador o la composición de estabilización comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes. En una realización más preferida de la presente invención, el al menos un estabilizador o la composición de estabilización comprende entre 2 y 18 aminoácidos diferentes, más preferiblemente entre 2 a 10, incluso más preferiblemente entre 2 a 8 y lo más preferiblemente entre 2 a 5 o entre 5 a 8 aminoácidos diferentes. Alternativamente, el al menos un estabilizador o la composición de estabilización comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 aminoácidos

diferentes o más, tales como al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes. El número de aminoácidos diferentes comprendidos en el al menos un estabilizador o la composición de estabilización no excede preferiblemente de 18.

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

Si el al menos un estabilizador o la composición de estabilización comprende cisteína, se prefiere que contenga menos del 1%, preferiblemente menos del 0,5% en peso seco de cisteína dentro de la mezcla de al menos dos aminoácidos. Esto también se aplica a composiciones que comprenden al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos o incluso más, tales como al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos.

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

En una realización más preferida, el al menos un estabilizador o la composición de estabilización comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes, tal como se definió anteriormente y una saponina que es preferiblemente ácido glicirrónico. En esta realización, el estabilizador o la composición de estabilización no comprende preferiblemente proteínas o fragmentos de proteínas que no son aminoácidos, dipéptidos y/o tripéptidos. Por consiguiente, en esta realización preferida de la presente invención, la composición no contiene proteínas o fragmentos de las mismas que consisten en más de tres aminoácidos, ni proteínas hidrolizadas que sean de origen humano o animal. Una composición de este tipo tiene la ventaja de que no existe riesgo de contaminación de las biomoléculas integradas en la misma. Además, es una alternativa rentable a las composiciones de estabilización conocidas.

En otra realización más preferida, una saponina está comprendida en dicho al menos un estabilizador o una composición de estabilización que comprende cualquier número de aminoácidos diferentes comprendidos en la lista anterior de números mínimos de aminoácidos, tales como en una composición que comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 aminoácidos diferentes o incluso más, tal como al menos once, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos diferentes.

Se prefiere especialmente una composición que comprende al menos un aminoácido de cada grupo de (a) un aminoácido con grupos R alifáticos apolares; y (b) un aminoácido con grupos R no cargados polares; y (c) un aminoácido con grupos R cargados positivamente; y (d) un aminoácido con grupos R cargados negativamente; y (e) un aminoácido con grupos R aromáticos.

Los aminoácidos producidos de manera natural pueden clasificarse en los grupos de característicos anteriores (Nelson D.L. y Cox M.M., "Lehninger Biochemie" (2005), págs. 122-127) de cada uno de los cuales se selecciona al menos un aminoácido para la composición según la invención. Además, aparte de los aminoácidos producidos de manera natural, otros aminoácidos, como los aminoácidos artificiales, pueden clasificarse de esta manera. Mientras que más de un aminoácido de cada grupo, tal como al menos dos o al menos tres, puede estar comprendido en la composición según la invención, se prefiere actualmente que sólo se seleccione un aminoácido de cada grupo. El experto en la técnica entiende, además, que no tiene que estar presente el mismo número de aminoácidos de cada grupo en la composición usada según la invención. Puede elegirse cualquier combinación de aminoácidos siempre que al menos un aminoácido de cada grupo esté presente.

Se prefiere especialmente una composición de estabilización en la que los al menos dos aminoácidos diferentes comprendidos en la composición sean alanina, ácido glutámico, lisina, treonina y triptófano. Otra composición de

estabilización especialmente preferida comprende aspartato, arginina, fenilalanina, serina y valina.

Además, se prefiere particularmente al menos un estabilizador o una composición de estabilización, en donde los al menos dos aminoácidos diferentes comprendidos en la composición sean o se seleccionen de arginina, glicina, histidina, alanina, ácido glutámico, lisina y triptófano. Esta composición ha demostrado ser especialmente ventajosa con respecto a sus propiedades después de la esterilización, en particular después de la radiación. Se demostró que dicha combinación de aminoácidos no ejercía ningún olor desagradable ni ninguna alteración del color después de la radiación. Sin embargo, incluso si estos efectos son no deseados, no afectan a la idoneidad de las composiciones de la invención que comprenden un porcentaje mayor de cisteínas o ejercen de otro modo colores amarillentados o un olor desagradable. Las biomoléculas se unen de manera reversible al portador. El término "unido", tal como se usa de manera intercambiable con el término "inmovilizado" o "que se inmoviliza", se refiere a la fijación de biomoléculas sobre el portador.

El término "unido de manera reversible" define que las biomoléculas, cuando están unidas al portador, pueden ser liberadas de dicho portador con medios adecuados. Dependiendo de la clase de unión, por ejemplo, de si la unión es covalente o no covalente, son aplicables diferentes medios de liberación de las biomoléculas. Los ejemplos son escisión por proteasas, un cambio de pH o un cambio en la temperatura. Las biomoléculas están unidas al portador hasta que sea necesario y, sólo entonces, se liberan del portador.

Las técnicas mencionadas anteriormente son sólo ejemplos para unir de manera reversible biomoléculas sobre portadores sólidos. Se enfatiza que la presente invención no se limita a estos ejemplos. Puede ser aplicado cualquier método convencional conocido en el estado de la técnica que sea adecuado para la unión reversible de biomolécula(s) sobre un portador.

La unión reversible de la biomolécula se elige de tal manera que la biomolécula puede ser liberada rápidamente del portador. Con respecto a esto, el término "rápidamente" significa que más del 50%, tal como el 60%, el 70% o el 80% de dicha biomolécula puede ser liberada en un plazo de 2 horas o menos, tal como 1 hora, 30 minutos o 20 minutos, en cualquier combinación tal como el 60% en 30 minutos o 20 minutos, el 70% en 30 minutos o 20 minutos o el 80% en 30 minutos o 20 minutos, preferiblemente más del 85% en un plazo de 10 minutos o menos y lo más preferiblemente más del 98% en un plazo de 1 minuto. Esto puede alcanzarse, por ejemplo, aplicando uno de los métodos descritos a continuación. Una liberación rápida de este tipo hace el envase de la invención adecuado para aplicaciones médicas o clínicas (véase a continuación). Además, la unión reversible de las biomoléculas se elige preferiblemente de tal manera que las biomoléculas se liberan inmediatamente antes de la aplicación clínica.

La unión reversible puede ser covalente o no covalente.

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

La biomolécula puede estar unida a través de un ligante, preferiblemente un ligante escindible. Los ligantes adecuados pueden seleccionarse, pero no se limitan a,

a) ligantes con puentes disulfuro como SDAD (NHS-SS-diazirina), SulfoSAND, DSP que puede escindirse fácilmente mediante la adición de reactivos con grupos SH como tioles, mercaptanos, cisteína, mercaptoetanol o ditiotritol.

b) ligantes con enlaces peptídicos que pueden escindirse con una proteasa específica; preferiblemente una enzima humana

c) ligantes que son escindibles a través de ultrasonidos

d) ligantes con enlaces éster como EGS que pueden escindirse mediante, por ejemplo, hidroxilamina

e) ligantes con sulfonas como BSOCS que pueden escindirse a mayor pH (por ejemplo, pH 11,6)

f) ligantes con cis-dioles como DST que pueden escindirse por meta-peryodato de sodio.

Alternativamente, las biomoléculas pueden estar unidas de manera reversible mediante secado tal como se describe en detalle a continuación en relación con los métodos de la invención. En esta realización, se logra la unión reversible ya que las biomoléculas y las moléculas usadas como estabilizadores se adhieren juntas. La liberación de las biomoléculas tiene lugar tras la adición de un líquido a los compuestos anteriores disolviendo/solubilizando de ese modo las biomoléculas y las moléculas estabilizadoras.

El portador puede ser bidimensional o tridimensional. El portador puede ser plano, esférico, de tipo perla, una malla,

una red o una red de fibras.

En una realización preferida, el portador está comprendido en o forma parte del envase. Los envases útiles para esta realización son viales de vidrio o plástico. La superficie del envase puede presentar estructuras específicas para este fin para aumentar la superficie, por ejemplo, microestructuras de tipo aguja.

En un aspecto adicional y cuando el portador no es un estabilizador, el portador es un sólido, preferiblemente un envase poroso (por ejemplo, una espuma o esponja). Materiales portadores adecuados se seleccionan del grupo que consiste en: vidrio, acero inoxidable de calidad médica, aleaciones metálicas (por ejemplo, cromo-cobalto-molibdeno, nitrato-óxido de titanio), hidroxiapatita, silicona, poliestireno, poli(ácido L-láctico); poliuretano, poliéster, polisulfona, polietileno, polipropileno, poliacrilo, poliacrilnitrilo, poliamida, PMMA, guata de vellón, espuma porosa abierta, plástico o vidrio y plástico o vidrio reticular y estructuras derivadas de esponjas marinas (*Porifera*) o cerámicas (sinterizadas).

Otros portadores sólidos preferidos son una malla, una red de fibras o material sinterizado.

En un aspecto adicional, los portadores son perlas. Las perlas pueden ser separadas de las biomoléculas mediante filtración o, si se usan perlas magnéticas como Dynabeads® o perlas MACS®, mediante imanes. Además, pueden usarse nanopérlas que pueden ser inyectadas como complejo biomolécula-perla en el paciente.

En una realización preferida adicional, el portador es semisólido. El material del portador semisólido puede ser seleccionado de entre, por ejemplo, geles que son capaces de hincharse como hidrogeles (por ejemplo, poliHema) o mezclas gelatinosas de proteínas (por ejemplo, Matrigel). En una realización preferida diferente, el portador es solubilizable. Portadores solubilizables adicionales incluyen cristales o líquidos iónicos. Generalmente, los portadores que son estabilizadores según esta invención son solubilizables.

En una realización más preferida, el portador solubilizable comprende preferiblemente estructuras que se disuelven en disoluciones acuosas, opcionalmente tamponadas.

En una realización preferida, el envase está esencialmente libre de oxígeno del aire en su interior. En esta realización, el término "esencialmente libre" se refiere a un contenido muy bajo de oxígeno del aire dentro del envase de la invención en comparación con el del aire. Por consiguiente, "esencialmente libre de oxígeno del aire" indica un contenido de oxígeno del aire dentro del envase de menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 2%, incluso más preferiblemente menos del 1% y lo más preferiblemente entre el 0 y el 1%.

En otra realización preferida, el envase está esencialmente libre de líquido en su interior, preferiblemente agua. En esta realización, el término "esencialmente libre" se refiere a un contenido muy bajo de líquido, preferiblemente agua, dentro del envase de la invención en comparación con el volumen total de biomolécula y estabilizador o el contenido de agua libre del envase. Por consiguiente, "esencialmente libre de líquido" indica un contenido de líquido dentro del envase de menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 2% tal como menos del 1%, el 0,5% o el 0,2%.

Las dos realizaciones anteriores dan como resultado una mejora adicional de la estabilidad de las biomoléculas unidas al estabilizador/portador y sometidas a esterilización optimizando las condiciones ambientales dentro del envase. Por ejemplo, retirando líquido del envase, la esterilización es incluso menos propensa a destruir biomoléculas unidas al portador/estabilizador dentro del envase ya que pueden desprenderse menos especies de oxígeno reactivas con la aplicación de radiación a líquidos tales como agua.

En un aspecto alternativo, el envase puede producirse o es producible mediante el método de la presente invención tal como se describe a continuación.

En el presente documento se describe un método para producir un envase para biomoléculas, que comprende: (a) insertar un portador en un envase; (b) unir de manera reversible al menos una biomolécula a dicho portador; (c) incubar el portador con la al menos una biomolécula unida de manera reversible en una disolución que comprende al menos un estabilizador seleccionado de entre (poli)péptidos tales como dipéptidos o tripéptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, polialcoholes, polietilenglicoles, líquidos iónicos, solutos compatibles, saponinas o una mezcla de los mismos, de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho al menos un estabilizador; (d) sellar el envase; y (e) esterilizar el envase.

La invención se refiere a un método para producir un envase esterilizado para biomoléculas tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende: (a) insertar al menos un portador que es un estabilizador que comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes en un envase; (b) unir de manera reversible al menos una biomolécula a dicho portador de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho al menos un portador; (c) sellar el envase; y (d) esterilizar el envase.

En el presente documento se describe también un método para producir un envase para biomoléculas, que comprende: (a) unir de manera reversible al menos una biomolécula a un portador, (b) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida en un envase, (c) incubar dicho portador con la al menos una biomolécula unida de manera reversible en una disolución que comprende al menos un estabilizador seleccionado de entre (poli)péptidos tales como dipéptidos o tripéptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, polialcoholes, polietilenglicoles, líquidos iónicos, solutos compatibles, saponinas o una mezcla de los mismos, de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho al menos un estabilizador, (d) sellar el envase; y (e) esterilizar el envase.

Además, se describe en el presente documento un método para producir un envase para biomoléculas, que comprende: (a) unir de manera reversible al menos una biomolécula a un portador, (b) incubar el portador con la al menos una biomolécula unida de manera reversible en una disolución que comprende al menos un estabilizador seleccionado de entre (poli)péptidos tales como dipéptidos o tripéptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, polialcoholes, polietilenglicoles, líquidos iónicos, solutos compatibles, saponinas o una mezcla de los mismos, de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho al menos un estabilizador, (c) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida de manera reversible en un envase, (d) sellar el envase; y (e) esterilizar el envase.

La invención se refiere, además, a un método para producir un envase esterilizado para biomoléculas tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende: (a) unir de manera reversible al menos una biomolécula a un portador que es un estabilizador que comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes, de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho estabilizador, (b) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida en un envase, (c) sellar el envase; y (d) esterilizar el envase.

En el presente documento se describe también un método para producir un envase estéril de manera terminal para biomoléculas, que comprende las siguientes etapas:

(a) unir de manera reversible las biomoléculas a un portador,

(b) insertar el portador con las biomoléculas unidas en el envase,

(c) incubar el portador en una composición que comprende uno o más estabilizadores seleccionados de entre (poli)péptidos, aminoácidos, almidón, azúcares, fosfatos, polialcoholes, polietilenglicoles o una mezcla de los mismos, de manera que las biomoléculas están cubiertas parcial o completamente por dicho uno o más estabilizadores,

(d) cerrar el envase,

(e) esterilizar de manera terminal el envase.

Las etapas (a), (b) y (c) pueden realizarse en secuencias diferentes: (a), (b) y (c) pueden realizarse de manera consecutiva. Alternativamente, la etapa (b) puede realizarse antes de la etapa (a) y seguida luego por la etapa (c). En una tercera alternativa, la secuencia es primero (b), luego (c), luego (a).

Las definiciones dadas para el envase de la invención y las realizaciones preferidas descritas anteriormente en relación con dicho envase, cuando sean aplicables, con las modificaciones pertinentes, se aplican a los métodos anteriores de la presente invención, en particular por lo que se refiere a la naturaleza y/o la composición del portador y/o estabilizador o la composición de estabilización, las biomoléculas y los métodos relacionados con la unión o la liberación del estabilizador y/o el portador y/o las biomoléculas. Esto incluye, en particular, las realizaciones preferidas relacionadas con el estabilizador, que es una mezcla de aminoácidos y, los constituyentes adicionales preferidos, tales como una saponina, y las realizaciones particularmente preferidas de los mismos.

En otra alternativa aplicable a los métodos de la invención, la unión reversible de la biomolécula al portador y/o la incubación en la disolución que comprende al menos un estabilizador se realiza en producción a granel que comprende una etapa de corte antes de la inserción del portador recubierto en el envase. Los métodos de producción a granel se conocen bien por el experto en la técnica.

La inserción del portador con las biomoléculas unidas puede realizarse de manera manual o automatizada.

El cierre del envase puede realizarse, por ejemplo, aplicando una tapa (por ejemplo, un tapón de goma) o fundiendo la abertura en caso de envases de vidrio o plástico que están formados sólo por una pieza.

Una ventaja principal del método y el portador producido de ese modo de la presente invención es que el envase que comprende biomoléculas se esteriliza (de manera terminal o a granel). El término "esterilización terminal" en el contexto de la presente invención significa que la esterilización puede realizarse al final del procedimiento de

producción, concretamente después de que las biomoléculas y el estabilizador se han unido al portador y dicho portador se ha insertado en el envase. Métodos de esterilización adecuados comprenden, pero no se limitan a, tratamiento con óxido de etileno (EO), tratamiento con calor (seco) o pH ácido, tratamiento con disolvente-detergente (SD), rayos X, esterilización en autoclave o esterilización por plasma. Se prefiere especialmente radiación, sobre todo, se prefiere radiación beta o gamma.

Por tanto, la esterilización (terminal o a granel) permite la producción del envase que comprende biomoléculas en condiciones no estériles o semiestériles. Debido a esta característica, los costes de producción pueden reducirse en gran medida en comparación con los costes para la producción de envases convencionales para biomoléculas que tienen que producirse en condiciones completamente estériles, es decir asépticas.

Otra ventaja del método de esterilización de la presente invención es que no se requiere congelación para la esterilización de los materiales biológicos. Esto es muy ventajoso ya que, por tanto, la funcionalidad biológica del material biológico que va a ser esterilizado puede ser mejorada en gran medida en comparación con los métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, el documento US 5.730.933.

En una realización preferida adicional, el al menos un estabilizador comprende adicionalmente una saponina, preferiblemente ácido glicirrízico o un derivado del mismo. Los derivados adecuados se han definido anteriormente.

En otra realización preferida, el método de la presente invención comprende además una etapa de secado de las biomoléculas. Esta etapa se realiza preferiblemente después de incubar el portador con la al menos una biomolécula unida de manera reversible o, cuando el portador es un estabilizador, uniéndolo de manera reversible al menos una biomolécula a dicho portador en una disolución que comprende al menos un estabilizador tal como se describió anteriormente. Cuando se alcanza la unión reversible ya que las biomoléculas y las moléculas usadas como estabilizador (por ejemplo, al menos dos aminoácidos diferentes, opcionalmente en conexión con una saponina tal como se describió) se adhieren juntas después del secado, la etapa de unión reversible comprende secar el portador junto con la biomolécula. La liberación de las biomoléculas, correspondiente a la reversibilidad de la unión, tiene lugar tras la adición de un líquido a los compuestos anteriores adheridos juntos disolviendo/solubilizando de ese modo las biomoléculas y las moléculas de estabilización del portador. Preferiblemente, las biomoléculas se secan hasta que el contenido de líquido residual sea menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 2%, tal como menos del 1%, el 0,5% o el 0,2%, de la composición aplicada al principio. Métodos de secado preferidos incluyen, pero no se limitan a, métodos que se usan para retirar la composición de estabilización tal como secado por aire, secado por pulverización, liofilización y precipitación. Las técnicas adecuadas adicionales comprenden cristalización y microcristalización.

El método según la presente invención puede comprender además la etapa (f), es decir la elución de las biomoléculas del portador. El método de elución aplicado depende del portador usado y puede comprender, pero no se limita a, disoluciones con altas concentraciones de sal, disoluciones que contienen biotina o disoluciones que contienen proteasas o sustancias que contienen SH.

En una realización adicional, la presente invención comprende un envase en el que se aplica una disolución que desprende la biomolécula del portador, preferiblemente con un porcentaje de más del 50%, tal como el 60%, el 70% o el 80%, de las biomoléculas unidas en un plazo de 2 horas o menos, tal como 1 hora, 30 minutos o 20 minutos, en cualquier combinación tal como el 60% en 30 minutos o 20 minutos, el 70% en 30 minutos o 20 minutos o el 80% en 30 minutos o 20 minutos, más preferiblemente más del 85% en un plazo de 10 minutos y lo más preferiblemente más del 98% en un plazo de 1 minuto. El desprendimiento de la(s) biomolécula(s) del portador puede efectuarse, por ejemplo, mediante escisión de los enlaces no covalentes y/o covalentes debido a una fuerza iónica alta o baja, cambios en el pH y/o sustancias que contienen grupos sulfhidrilos, hidroxilaminas, peryodatos, proteasas, que están presentes en dicha disolución.

En otra realización, la(s) biomolécula(s) se desprende(n) del portador mediante la ayuda de ultrasonidos y/o radiación, preferiblemente mediante luz infrarroja, visible o ultravioleta.

Una ventaja adicional del método según la presente invención es que los envases que comprenden biomoléculas producidos mediante dicho método son aptos para almacenamiento de larga duración. La introducción de productos nuevos o modificados al mercado médico requiere la garantía de que pueden ser almacenados durante un periodo prolongado (desde uno hasta cinco años) sin ninguna disminución principal del rendimiento que pueda afectar a la seguridad y eficacia cuando se usan los productos. Debido a que no existen habitualmente muestras envejecidas en ambiente por un periodo completo para tales productos, generalmente es necesario realizar pruebas de "envejecimiento acelerado" para proporcionar datos experimentales que respalden las reivindicaciones de rendimiento y vida útil de dichos productos, hasta que estén disponibles muestras de periodo completo.

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

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

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

Sorprendentemente, se encontró que proporcionando biomoléculas en un envase según la presente invención (es decir, unidades de manera reversible sobre/en un portador, cubiertas total o parcialmente (es decir, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60, al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% tal como al menos el 98 o el 99%) por al menos un estabilizador según la presente invención, dichas biomoléculas pueden almacenarse hasta 7 días a 45°C sin pérdida significativa de su actividad biológica. Según la regla descrita anteriormente, este “envejecimiento acelerado” es igual a un almacenamiento de 16 semanas a 5°C.

Las temperaturas de almacenamiento preferidas son desde -273°C hasta -15°C, se prefieren especialmente temperaturas desde 2°C hasta 8°C y desde 2°C hasta 30°C.

En una realización preferida del envase, el al menos un estabilizador y/o la al menos una biomolécula están comprendidos en una disolución tamponada preferiblemente acuosa. El tampón que vaya a ser usado depende, entre otros, de la biomolécula que vaya a ser cubierta/integrada. Los tampones generalmente adecuados para el contacto con biomoléculas son, por ejemplo, fosfato, citrato, acetato, borato, carbonato, lactato, amonio, glicina, barbiturato, HEPES, MOPS, MES, TRIS.

En otra realización preferida del envase o los métodos de la invención, dicho estabilizador comprende menos del 1%, más preferiblemente menos del 0,3% de Tween, preferiblemente Tween 80.

Tween es un término genérico para los polisorbatos que son una clase de emulsionantes y tensioactivos usados en algunos productos farmacéuticos y preparaciones alimenticias. Se usan a menudo para solubilizar componentes oleosos en productos a base de agua. Los polisorbatos son líquidos oleosos derivados de sorbitano pegilado (un derivado de sorbitol) esterificados con ácidos grasos. Los ejemplos para polisorbatos son polisorbato 20 (Tween 20 o monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), polisorbato 40 (Tween 40 o monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), polisorbato 60 (Tween 60 o monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano), y polisorbato 80 (Tween 80 o monooleato de polioxietileno (20) sorbitano). Tween 80 es el más preferido en las composiciones usadas en la presente invención.

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

En una realización preferida, el método de la invención, antes de sellar el envase y después de unir de manera reversible la al menos una biomolécula, o insertar el portador con la al menos una biomolécula unida en un envase, retira el oxígeno del aire del envase y/o retira el líquido, preferiblemente agua del envase.

Tal como se describió anteriormente en relación con el envase de la invención, las características de la realización anterior mejoran, además, la estabilidad de las biomoléculas unidas al estabilizador/portador y sometidas a esterilización, optimizando las condiciones ambientales dentro del envase. Por ejemplo, retirando el líquido del envase, la esterilización es incluso menos propensa a destruir biomoléculas unidas al portador/estabilizador dentro del envase.

En el presente documento se describe también un método para la producción de una disolución estéril que comprende al menos una biomolécula que comprende: (a) llevar a cabo el método para producir un envase para biomoléculas según la invención; y (b) eluir la al menos una biomolécula del portador; y opcionalmente (c) simultáneamente con, antes de o después de la etapa (b), aplicar una disolución de renaturalización que permite renaturalizar biomoléculas estructuralmente desnaturalizadas. Alternativamente, las etapas (b) y (c) de esta realización pueden formar parte de los métodos para producir un envase esterilizado de la invención descrito de manera adicional anteriormente.

El término “eluir” se refiere a la liberación de la al menos una biomolécula unida de manera reversible del portador. La elución puede efectuarse usando una disolución acuosa, preferiblemente tamponada, tal como una disolución de sales tamponada o no tamponada, o agua, en condiciones adecuadas dependiendo de la clase de unión, es decir, si es covalente o no covalente tal como se describió anteriormente.

Los porcentajes de elución ya se han descrito anteriormente. Un porcentaje de elución adecuado, tal como se definió anteriormente, hace el envase de la invención adecuado para aplicaciones médicas si es necesario preparar un dispositivo para aplicaciones médicas en un plazo de unos pocos minutos. En esta realización, la elución puede efectuarse inyectando una disolución adecuada preferiblemente acuosa en el envase y aplicándola al paciente de manera que las biomoléculas eluidas puedan abandonar el envase y propagarse dentro del cuerpo del paciente.

Preferiblemente, la disolución de renaturalización comprende chaperonas (por ejemplo, proteínas de choque térmico de la familia Hsp100/Clp, la familia Hsp90, la familia Hsp70, la familia Hsp60/GroEL y las proteínas de choque térmico pequeñas (sHsps). Chaperonas generales son, por ejemplo, BiP, GRP94, GRP170, las chaperonas de lectina son, por ejemplo, calnexina y calreticulina, las chaperonas moleculares no clásicas son, por ejemplo, HSP47 y ERp29, las chaperonas de plegamiento son, por ejemplo, proteína disulfuro-isomerasa (PDI), peptidil prolil cis-trans-isomerasa (PPI) o ERp57, líquidos iónicos y/o arginina.

Después de la etapa (b) y opcionalmente la (c), el método para la producción de una disolución estéril puede comprender, además, aplicar la al menos una biomolécula eluida en una columna o un filtro. Columnas o los filtros adecuados son, por ejemplo, columnas de intercambio iónico, tales como DEAE, colestiramina, polietilenimina acoplada a una matriz adecuada, como Sepharose o estírol, o columnas de exclusión molecular, tales como Sepharose G25, o columnas rellenas con carbón.

Dicha aplicación corresponde a la purificación de la disolución que contiene la biomolécula directamente después de la liberación de la biomolécula de su portador y/o durante la infusión en un paciente. Esta etapa permite la retirada de sustancias, que pueden ser dañinas para las biomoléculas unidas, así como la retirada de biomoléculas desnaturalizadas, que pueden haberse formado durante el procedimiento de esterilización.

El envase según la presente invención puede ser usado para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Por consiguiente, el envase de la invención puede formar parte de un dispositivo médico o de diagnóstico. Siendo tales dispositivos una combinación del componente biológico que comprende las biomoléculas estabilizadas según la invención y una parte no biológica también denominada dispositivo biológico de producto combinado.

Los dispositivos terapéuticos incluyen implantes médicos, catéteres, endoprótesis, tubos solos o en combinación con otros componentes o dispositivos médicos usados en la circulación extracorporal.

Los enfoques de terapia pueden comprender aplicaciones *in vivo* así como *ex vivo* del envase de la invención en el contexto de un dispositivo médico. Por consiguiente, un dispositivo que comprende el envase de la invención puede ser implantado en un paciente para una aplicación *in vivo* liberando de manera gradual la biomolécula tras aplicar un líquido (corporal) en el envase. Para una aplicación *ex vivo*, puede conectarse un dispositivo que comprende el envase de la invención con la circulación de un líquido corporal que va a ser tratado. La sangre derivada de una arteria o una vena de un paciente puede ser conducida, por ejemplo, a través de tal dispositivo y se vuelve a introducir posteriormente en el paciente (conexión con el torrente circulatorio). Alternativamente, pueden incubarse muestras de un líquido corporal con el portador *in vitro*. En una etapa posterior del último tratamiento, el líquido corporal puede volver a introducirse en el cuerpo de un paciente. Todas estas aplicaciones necesitan la aplicación de un líquido en el envase para disolver las biomoléculas comprendidas en el mismo que luego pueden actuar, por ejemplo, como un fármaco.

El término "paciente" tal como se usa durante toda la presente invención comprende sujetos enfermos o patológicos, así como sanos. Un paciente según la presente invención es cualquier persona que recibe atención, asistencia o tratamiento médico. La persona está, con mayor frecuencia, pero no siempre, enferma o lesionada y, en ese caso, necesita tratamiento por un médico u otro profesional médico. En otros términos, el término "paciente" se usa de manera intercambiable con "sujeto" que puede estar enfermo o no. El sujeto puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano. Según lo anterior, un paciente también es, por ejemplo, un ser humano sano que, de forma aguda o de rutina, se le diagnostica una enfermedad o un estado de salud.

Las figuras muestran:

Figura 1

Se muestra un vial que comprende un portador con la biomolécula unida de manera reversible y el recubrimiento protector. La biomolécula (por ejemplo, citocina) se incorpora mediante la disolución de estabilizador y se protege de ese modo contra influencias de estrés como deshidratación durante el almacenamiento o radiación durante la esterilización.

Figura 2

Se muestran diferentes portadores:

a) el portador es un gel no soluble o un gel soluble

b) el portador es una red de fibras no tejida

c) el portador es una malla o red tejida

5 d) el propio recubrimiento protector es el portador y cubre la biomolécula o el propio vial es el portador

e) el portador tiene una estructura porosa abierta (como una esponja) o sinterizada

10 f) el portador comprende nano, micro o macropartículas

g) el propio vial es el portador y tiene micro o macroestructuras que aumentan la superficie (por ejemplo, estructuras de tipo aguja).

Figura 3

15 Se muestra un ejemplo, en el que el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (aquí interleucina 8 = IL8) pierde la mayoría de su función biológica durante la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 4

25 Se muestra un ejemplo, en el que el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (aquí interleucina 8 = IL8) pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento acelerado (45°C) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 5

35 Se muestra un ejemplo, en el que el propio vial es el portador. En primer lugar, la biomolécula se unió al portador mediante secado. Posteriormente, se añadió la disolución de estabilizador y también se secó. La biomolécula (aquí ADNbc) pierde parte de su función biológica durante la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la cantidad de ADN detectable como porcentaje del valor de partida.

Figura 6

40 Se muestra un ejemplo, en el que el propio estabilizador es el portador. Se añaden la biomolécula y la disolución de estabilizador y se secan juntas. La biomolécula (aquí interleucina 8 = IL8) pierde la mayoría de su función biológica durante la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Figura 7

50 Se muestra un ejemplo, en el que el propio estabilizador es el portador. Se añaden la biomolécula y la disolución de estabilizador y se secan juntas. La biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento y/o la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la unión específica al antígeno.

Figura 8

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

Figura 9

65 La desorción de una biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) fue evaluada experimentalmente después de

que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano porosa abierta (suministrador A, poros grandes). Mientras que tampón de citrato a pH 4,75 y NaCl 1 M sólo desorbieron pequeñas cantidades de la biomolécula, pudieron desorberse significativamente más biomoléculas con NaCl 1 M + imidazol 0,02 M y solución salina tamponada con fosfato, respectivamente. Se muestra la unión específica al antígeno.

Figura 10

La desorción de una biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) fue evaluada experimentalmente después de que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano porosa abierta (suministrador B, poros más pequeños). Tampón de citrato a pH 4,75 y solución salina tamponada con fosfato desorbieron un poco mejor que NaCl 1 M con o sin imidazol 0,02 M. Se muestra la unión específica al antígeno.

Figura 11

La desorción de una biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) fue evaluada experimentalmente después de que la biomolécula se uniera a una espuma de poliuretano porosa abierta (suministrador Smith&Nephews, poros pequeños). La biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento y/o la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador (albúmina y manitol) protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo es casi del 100% (5 µg/ml) Se muestra la unión específica al antígeno.

Figura 12

La desorción de una biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) fue evaluada experimentalmente después de que la biomolécula se uniera a un hidrogel de PVA. La biomolécula pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento y/o la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) y B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. La recuperación del anticuerpo eluido es muy alta. Se muestra la unión específica al antígeno.

Figura 13

Estructuras químicas de ejemplos de ligantes escindibles

Figura 14

Prueba antihepatitis A (ELISA funcional) de una composición de aminoácidos usada para proteger anticuerpos antihepatitis después de la liofilización y la esterilización.

Figura 15

La clase estructural de saponinas tiene el potencial para mejorar el efecto protector de combinaciones de aminoácidos. Se prefiere el uso de la saponina ácido glicirrízico.

Figura 16

Las combinaciones de al menos 3 aminoácidos y combinaciones de 2 aminoácidos con la adición de ácido glicirrízico proporcionan una protección máxima de un anticuerpo inmovilizado cuando es esterilizado con radiación beta de 50 kGy.

Figura 17

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

Figuras 18 y 19

Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos proporcionan protección durante almacenamiento de larga duración. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 80% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 70% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen sólo 2 aminoácidos mantienen sólo aproximadamente el 40% de capacidad de unión a antígeno durante el procedimiento de almacenamiento, independientemente de la esterilización. Sin el recubrimiento posterior sólo se conserva el 20-30% de actividad.

Figuras 20 y 21

La adición de ácido glicirrízico 1 mM a las disoluciones de recubrimiento posterior mejoran el efecto protector. Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos y ácido glicirrízico proporcionan protección durante almacenamiento de larga duración. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 90% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 80% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen 2 aminoácidos y ácido glicirrízico mantienen aproximadamente el 70% de capacidad de unión a antígeno durante el procedimiento de almacenamiento, independientemente de la esterilización. Sin recubrimiento posterior sólo se conserva el 20-30% de actividad.

Figura 22

Muestras esterilizadas con radiación gamma mantienen aproximadamente el 85% de actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no mejora más con ácido glicirrízico; con 5 aminoácidos la actividad restante es del 75%; con 2 aminoácidos sólo se mantiene el 40%. La protección con 2 aminoácidos mejora mediante la adición de ácido glicirrízico, aquí la actividad restante es del 65%. Las muestras esterilizadas con ETO mantienen aproximadamente el 85% de actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contienen 18 aminoácidos; este efecto no mejora con ácido glicirrízico. Los recubrimientos posteriores que contienen 5 ó 2 aminoácidos sólo tienen un pequeño efecto protector; la adición de ácido glicirrízico mejora la protección de manera marginal.

Figura 23

Recubrimiento posterior de aminoácidos con aminoácidos, dipéptidos o mezclas de los mismos, opcionalmente junto con ácido glicirrízico.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: se esterilizó interleucina 8 en viales de vidrio, el propio vial es el portador (ejemplo de referencia).

Experimento:

Se diluyó interleucina 8 (IL-8, *R&D, 208-IL*) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, *PAA, H15-002*) hasta 10 µg/ml. Se añadieron 5 µl de la disolución (50 ng de IL-8) a viales de vidrio y se rotaron durante 4 horas hasta estar secos. Se añadieron 25 µl de una disolución de estabilización (A = albúmina 20 g/l (*Biotest Pharma*) y manitol 10 g/l (*Serag Wiesner, 219675*), B = mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrízico 1 mM (sal de amonio, *Fluka, 50531*)) y se rotaron/secaron durante la noche.

Se esterizaron los viales con ≥ 25 kGy (radiación beta). Se almacenaron los controles no esterilizados en condiciones de enfriamiento.

Ensayo:

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

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

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

Resultados: véase la figura 3

La biomolécula (aquí interleucina 8 = IL8) pierde la mayoría de su función biológica durante la esterilización posterior (radiación de ≥ 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Ejemplo 2: se esterilizó interleucina-8 en viales de vidrio, el propio estabilizador es el portador (ejemplo según la presente invención).

Experimento:

Se diluyó interleucina 8 (IL-8) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002) hasta 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se mezclaron 5 μl de la disolución (50 ng de IL-8) y 25 μl de una disolución de estabilización (A = albúmina 20 g/l (Biotest Pharma) y manitol 10 g/l (Serag Wiesner, 219675), B = mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrízico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y se pipetearon a viales de vidrio. Los viales se rotaron/secaron durante la noche.

Se esterilizaron los viales mediante radiación con ≥ 25 kGy. Se almacenaron los controles no esterilizados en condiciones de enfriamiento.

Ensayo:

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

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

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

Resultados:

véase la figura 6

La biomolécula (aquí interleucina 8 = IL8) pierde la mayoría de su función biológica durante la esterilización posterior (radiación de ≥ 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la actividad quimiotáctica de IL8 sobre granulocitos neutrófilos humanos.

Ejemplo 3: se esterilizó anti-IgG de ratón en viales de vidrio, el propio estabilizador es el portador (ejemplo según la presente invención).

Experimento:

Se diluyó anti-IgG de ratón (biotinilada, Jackson ImmunoResearch, 115-065-003) en PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, PAA, H15-002) hasta 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se mezclaron 25 μl (100 ng) de la disolución de anticuerpo y 25 μl de una disolución de estabilización concentrada 2x (A = albúmina 20 g/l (Biotest Pharma) y manitol 10 g/l (Serag Wiesner, 219675), B = mezcla de aminoácidos 20 g/l y ácido glicirrízico 1 mM (sal de amonio, Fluka, 50531)) y se pipetearon a viales de vidrio. Los viales se rotaron/secaron durante la noche.

Se esterilizaron los viales mediante radiación con ≥ 25 kGy. Se almacenaron los controles no esterilizados en condiciones de enfriamiento.

Ensayo:

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

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

Se pipetearon las muestras y el patrón a la placa de ELISA (2 x 200 μl de cada uno) y se incubaron 1 h a temperatura ambiental. Se lavó la placa 3 x. A cada pocillo se le añadieron 200 μl de disolución de estreptavidina

(peroxidasa del rábano picante (HRP) marcada, *Pierce*, 21126, diluida hasta 0,1 µg/ml en PBS) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3x. Se diluyó 1:2 el sustrato cromogénico de HRP TMB (TMB = tetrametilbencidina, *Invitrogen*, 00-2023) en H₂O y se añadieron 200 µl a cada pocillo. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Para detener la reacción de coloreado, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ diluido (diluido 1:5 con agua dest., *Merck*, 1007311000). Se detectó la absorción de la placa a 450 nm (*Fusion Photometer A 153601*, *PerkinElmer*).

Resultados:

véase la figura 7

La biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento y/o la esterilización posterior (radiación de ≥25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, tanto la disolución de estabilizador A (albúmina y manitol) como la B (disolución con aminoácidos diferentes) protegieron la biomolécula. Se muestra la unión específica al antígeno.

Ejemplo 4: se esterilizó anti-IgG de ratón, el portador es una espuma de poliuretano (ejemplo de referencia).

Experimento:

A partir de una espuma de poliuretano (PU) porosa fina (*Smith&Nephew*, 66012608) se troquelaron muestras con un diámetro definido (1 cm). Se unió anti-IgG de ratón (biotinilada, *Jackson ImmunoResearch*, 115-065-003) a las muestras: se diluyó el anticuerpo hasta 5 µg/ml o bien en PBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺, *PAA*, H15-002) o bien en una disolución de estabilización (albúmina 20 g/l (*Biotest Pharma*) y manitol 10 g/l (*Serag Wiesner*, 219675) en PBS) y se cubrieron las muestras de PU con disoluciones de anticuerpo. Se incubaron las muestras 1 h a 37°C.

Se retiró la disolución de anticuerpo y se secaron al aire las muestras de PU durante 2 h. Se esterilizaron las muestras a través de radiación beta (25 kGy) y se almacenaron los controles no estériles en condiciones de enfriamiento.

Ensayo:

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

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

Se pipetearon las muestras y el patrón a la placa de ELISA (2 x 200 µl de cada uno) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3x. A cada pocillo se le añadieron 200 µl de disolución de estreptavidina (peroxidasa del rábano picante (HRP) marcada, *Pierce*, 21126, diluida hasta 0,1 µg/ml en PBS) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3x. Se diluyó 1:2 el sustrato cromogénico de HRP TMB (TMB = tetrametilbencidina, *Invitrogen*, 00-2023) en H₂O y se añadieron 200 µl a cada pocillo. Se incubó la placa 15 min a temperatura ambiental y se protegió de la luz. Para detener la reacción de coloreado, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ diluido (diluido 1:5 con agua dest., *Merck*, 1007311000). Se detectó la absorción de la placa a 450 nm (*Fusion Photometer A 153601*, *PerkinElmer*).

Resultados:

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

Ejemplo 5: se esterilizó anti-IgG de ratón, el portador es un hidrogel de PVA (ejemplo de referencia).

Experimento:

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

- 6,75 ml de disolución de PVA (7%)

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

- 5 - 2,25 de o bien PBS o bien disolución de estabilización (albúmina 20 g/l (*Biotest Pharma*) y manitol 10 g/l (*Serag Wiesner*, 219675) en PBS)

10 Se vertieron los hidrogeles de PVA en pequeñas placas de Petri (diámetro de 35 mm, 2 ml de disolución). Se secaron al aire las películas de hidrogel durante 48 h. Se esterilizaron las muestras a través de radiación beta (25 kGy) y se almacenaron los controles no estériles en condiciones de enfriamiento.

Ensayo:

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

20 Se colocaron los hidrogeles de PVA en placas de 6 pocillos y se cubrieron con 2 ml de PBS (sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, *PAA*, *H15-002*). Después de 30 min, 1 h y 2 h, se recogió el PBS y se sustituyó por PBS recién preparado.

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

30 Resultados:

35 La biomolécula (aquí un anticuerpo anti-IgG de ratón) pierde la mayoría de su función biológica durante el almacenamiento y/o la esterilización posterior (radiación de 25 kGy) si no se añade estabilizador. En cambio, una disolución de estabilizador (albúmina y manitol) protegió la biomolécula. La recuperación del anticuerpo eluido es muy alta. Se muestra la unión específica al antígeno.

40 **Ejemplo 6: efecto protector de una composición de aminoácidos específica (ejemplo según la presente invención).**

Se disolvieron 20 mg de anticuerpo antihepatitis A humano (beriglobina (IgG humana, AK), CSL Behring) y 40 mg de una composición protectora en agua hasta un volumen total de 525 µl por muestra y se liofilizaron. A continuación, se disolvieron las muestras en 1 ml de agua y fueron evaluadas para determinar su funcionalidad usando ELISA de IgG de VHA (virus de la hepatitis A).

45 **Composición:**

20 g	Arginina
20 g	Histidina
20 g	Lisina
3 g	Ácido glutámico
2 g	Triptófano
20 g	Glicina
15 g	Alanina
0,2 g	Tween 80
1 g	Sal de amonio de ácido glicirrízico

50 Se ajustó el pH a aproximadamente 7,2 usando NaOH y/o NaCl. A continuación, se sometieron las disoluciones a filtración estéril.

Se mezclaron 400 µl de disolución (correspondientes a 40 mg de compuestos sólidos) con 125 µl de beriglobina (correspondientes a 20 mg de anticuerpo).

55

Liofilización:

Se llevó a cabo la liofilización de la siguiente manera:

- temperatura de congelación inicial -40°C;
- inicio de vacío de 0,1 mbar después de 3 h de tiempo de congelación;
- subida de temperatura de aproximadamente 1,5°C/h durante 23 h;
- 6 h de secado durante la noche a 6°C y 0,004 mbar.

Esterilización:

Se irradiaron las muestras liofilizadas con 25 kGy y una con radiación beta de 50 kGy.

Resultados:

Los resultados del ELISA de VHA se representan en la figura 14.

Después del secado y la esterilización, se obtuvieron tortas blancas inodoras inherentemente estables. Se añadió 1 ml agua a cada muestra y se monitorizó el comportamiento de la disolución. La disolución tuvo lugar en un plazo de menos de 30 segundos y estaba libre de agregados. Incluso después de 24 h no era detectable ni agregación macroscópica ni microscópica.

Conclusión:

La aplicación de la composición dio como resultado sólo una pequeña pérdida de porción del anticuerpo antihepatitis A de beriglobina en comparación con el control no irradiado.

Ejemplo 7: prueba de diferentes saponinas como compuestos de estabilización. La clase estructural de saponinas tiene un efecto de estabilización sobre los anticuerpos (ejemplo de referencia).

Materiales y métodos

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

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

Exposición a estrés de la superficie recubierta

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

Experimento:

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

Resultados:

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

Ejemplo 8: composiciones de estabilización que comprenden al menos 3 aminoácidos diferentes o al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina tal como ácido glicirrízico proporcionan una protección muy buena (ejemplo según la presente invención).

Materiales y métodos

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

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

Exposición a estrés de la superficie recubierta

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

Experimento:

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

Se ajustó el pH de la mezcla de aminoácidos a aproximadamente 7,0.

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

Resultados:

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

Ejemplo 9: una composición preferida de aminoácidos proporciona protección en diferentes condiciones de estrés (ejemplo según la presente invención).

Materiales y métodos

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

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

Exposición a estrés de la superficie recubierta

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

Experimento:

Composiciones usadas:

composición protectora A (compuestos por litro)

20 g	Arginina
20 g	Histidina
20 g	Lisina
3 g	Glutamina
2 g	Triptófano
20 g	Glicina
15 g	Alanina
0,2 g	Tween 80
1 g	Sal de amonio de ácido glicirrízico

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

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

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

Ejemplo 10: los recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan protección durante el almacenamiento de larga duración (ejemplo según la presente invención).

Experimento:

Se disolvieron los aminoácidos, o bien en NaOH 0,5 M (*Merck, 106482*), o bien en HCl 0,5 M (*Merck, 100319*), para obtener disoluciones madre con una concentración máxima. Se mezclaron entre sí las madre de aminoácidos para

obtener una concentración de aminoácidos total de 200 mM en la disolución de recubrimiento posterior. Los aminoácidos se usaron en razón equimolar.

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

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

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

2 aminoácidos (1): Asp, Val

2 aminoácidos (2): Ala, Glu

Se ajustó el pH de las mezclas de aminoácidos a aproximadamente 7,0; y adicionalmente se diluyeron las mezclas en PBS para obtener la concentración final de 200 mM.

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

Resultados:

Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen al menos 5 aminoácidos proporcionan protección durante almacenamiento de larga duración. Para las muestras no esterilizadas, después de 62 días a 45°C se conservó aproximadamente el 80% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 70% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen sólo 2 aminoácidos mantienen sólo aproximadamente el 40% de capacidad de unión a antígeno durante el procedimiento de almacenamiento, independientemente de la esterilización. La adición de ácido glicirrízico 1 mM a las disoluciones de recubrimiento posterior aplica el efecto protector: para las muestras no esterilizadas que contienen al menos 5 aminoácidos y ácido glicirrízico, después de 62 días a 45°C se conserva aproximadamente el 90% de la capacidad de unión a antígeno. Las muestras esterilizadas (beta, 25 kGy) mantienen aproximadamente el 80% de su capacidad de unión a antígeno después de 62 días a 45°C. Los recubrimientos posteriores de aminoácidos que contienen 2 aminoácidos y ácido glicirrízico mantienen aproximadamente el 70% capacidad de unión a antígeno durante el procedimiento de almacenamiento.

Ejemplo 11: los recubrimientos posteriores de aminoácidos proporcionan protección durante los diferentes procedimientos de esterilización (ejemplo según la presente invención).

Experimento:

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

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

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

2 aminoácidos: Asp, Val

Se ajustó el pH de las mezclas de aminoácidos a aproximadamente 7,0; y adicionalmente se diluyeron las mezclas en PBS para obtener la concentración final de 200 mM.

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

Resultados:

Las muestras esterilizadas con radiación gamma mantienen aproximadamente el 85% de actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no mejora adicionalmente con ácido glicirrízico; con 5 aminoácidos la actividad restante es del 75%; con 2 aminoácidos sólo se mantiene el 40%. La protección con 2 aminoácidos mejora con la adición de ácido glicirrízico; aquí la actividad restante es del 65%. Las muestras esterilizadas con ETO mantienen aproximadamente el 85% de actividad cuando se protegen con un recubrimiento posterior de aminoácidos que contiene 18 aminoácidos; este efecto no mejora adicionalmente con ácido glicirrízico. Los recubrimientos posteriores que contiene 5 ó 2 aminoácidos tienen sólo un pequeño efecto protector; la adición de ácido glicirrízico mejora la protección de manera marginal.

Ejemplo 12: los recubrimientos posteriores que consisten en aminoácidos y dipéptidos proporcionan protección frente a altas dosis de radiación (ejemplo según la presente invención).

Materiales y métodos

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

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

- Exposición a estrés de la superficie recubierta

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

Experimento:

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

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

2 dipéptidos: Gly-Tyr, Gly-Gln

Se ajustó el pH de las mezclas de aminoácidos a aproximadamente 7,0.

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

Resultados:

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

REIVINDICACIONES

1. Un envase estéril que comprende
5 - al menos un portador que es un estabilizador; y
- al menos una biomolécula unida de manera reversible al portador,
10 en el que dicho portador cubre parcial o completamente las biomoléculas unidas y en el que dicho al menos un portador comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes.
2. El envase según la reivindicación 1, en el que la al menos una biomolécula se une al portador de manera que más del 50% de dicha biomolécula puede ser liberada del portador en un plazo de 2 horas o menos, preferiblemente más del 85% en 10 min o menos.
- 15 3. El envase según la reivindicación 1 ó 2, en el que la al menos una biomolécula se selecciona del grupo que consiste en: (poli)péptidos, preferiblemente un anticuerpo, una enzima, un receptor, una proteína de membrana, una proteína de transporte, un factor de la coagulación sanguínea, una hormona, una citocina, un factor de crecimiento o un fragmento funcional de los mismos,
20 ácidos nucleicos,
hidratos de carbono,
lípidos
y una combinación de los mismos.
- 25 4. El envase según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el portador es sólido, semisólido o solubilizable.
5. El envase según la reivindicación 4, en el que el portador semisólido comprende un hidrogel o una mezcla gelatinosa de proteínas.
- 30 6. El envase según la reivindicación 4, en el que el portador solubilizable comprende estructuras que se disuelven en disoluciones acuosas, opcionalmente tamponadas.
- 35 7. Un método para producir un envase para biomoléculas, que comprende:
(a) insertar al menos un portador que es un estabilizador que comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes en un envase;
40 (b) unir de manera reversible al menos una biomolécula a dicho portador, de manera que la al menos una biomolécula esté cubierta parcial o completamente por dicho al menos un portador;
(c) sellar el envase; y
45 (d) esterilizar el envase.
8. Un método para producir un envase para biomoléculas, que comprende:
(a) unir de manera reversible al menos una biomolécula a un portador que es un estabilizador que comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes, de manera que la al menos una biomolécula está cubierta parcial o completamente por dicho estabilizador,
50 (b) insertar el portador con la al menos una biomolécula unida en un envase,
(c) sellar el envase; y
(d) esterilizar el envase.
- 55 9. El método según la reivindicación 8, en el que dicha unión reversible de la biomolécula al portador se realiza en producción a granel que comprende una etapa de corte antes de la inserción del portador recubierto en el envase.
- 60 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicha unión de manera reversible comprende el secado de dicho portador junto con dicha biomolécula.

11. El envase según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la esterilización se realiza por óxido de etileno (EO), radiación beta, radiación gamma, rayos X, inactivación por calor, esterilización en autoclave o esterilización por plasma.
- 5 12. El envase según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que los aminoácidos son una mezcla de al menos tres aminoácidos diferentes.
- 10 13. El envase según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 ó 12 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el al menos un estabilizador está comprendido en una disolución tamponada.
14. El envase según la reivindicación 13 o el método según la reivindicación 13, en el que la disolución tamponada es una disolución acuosa tamponada.
- 15 15. El envase o el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en los que dicha mezcla de aminoácidos comprende al menos un aminoácido de cada grupo de
 - a) un aminoácido con grupos R alifáticos apolares;
 - 20 (b) un aminoácido con grupos R no cargados polares;
 - (c) un aminoácido con grupos R cargados positivamente;
 - (d) un aminoácido con grupos R cargados negativamente; y
 - (e) un aminoácido con grupos R aromáticos.
- 25 16. El envase o el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que los aminoácidos comprendidos en dicha mezcla se seleccionan de entre prolina, serina, asparagina, ácido aspártico, treonina, fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina, valina, alanina, glutamina, ácido glutámico, lisina, triptófano, arginina, histidina, glicina, metionina y cisteína, en el que el contenido de cisteína es menos del 1% de la mezcla sólida seca de aminoácidos.
- 30 17. El envase o el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que los aminoácidos comprendidos en dicha mezcla son o se seleccionan de entre arginina, histidina, lisina, ácido glutámico, triptófano, glicina y alanina.
- 35 18. El envase según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 ó 12 a 17 o el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en el que dicho estabilizador comprende menos del 1%, más preferiblemente menos del 0,3% de Tween, preferiblemente Tween 80.
- 40 19. El envase según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está por dentro esencialmente libre de oxígeno del aire.
20. El envase según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está internamente esencialmente libre de líquido, preferiblemente agua.
- 45 21. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, después de la etapa (b) y antes de la etapa (c)
 - retirar el oxígeno del aire del envase, y/o
 - 50 - retirar líquido, preferiblemente agua del envase.
22. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además:
 - (e) eluir la al menos una biomolécula del portador; y opcionalmente
 - 55 (f) simultáneamente con, antes de o después de la etapa (b), aplicar una disolución de renaturalización que permite renaturalizar biomoléculas estructuralmente desnaturalizadas.
23. Uso de un envase según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas.
- 60 24. El envase, el método o el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el portador comprende una mezcla de aminoácidos de al menos dos aminoácidos diferentes y una saponina.

Fig. 1

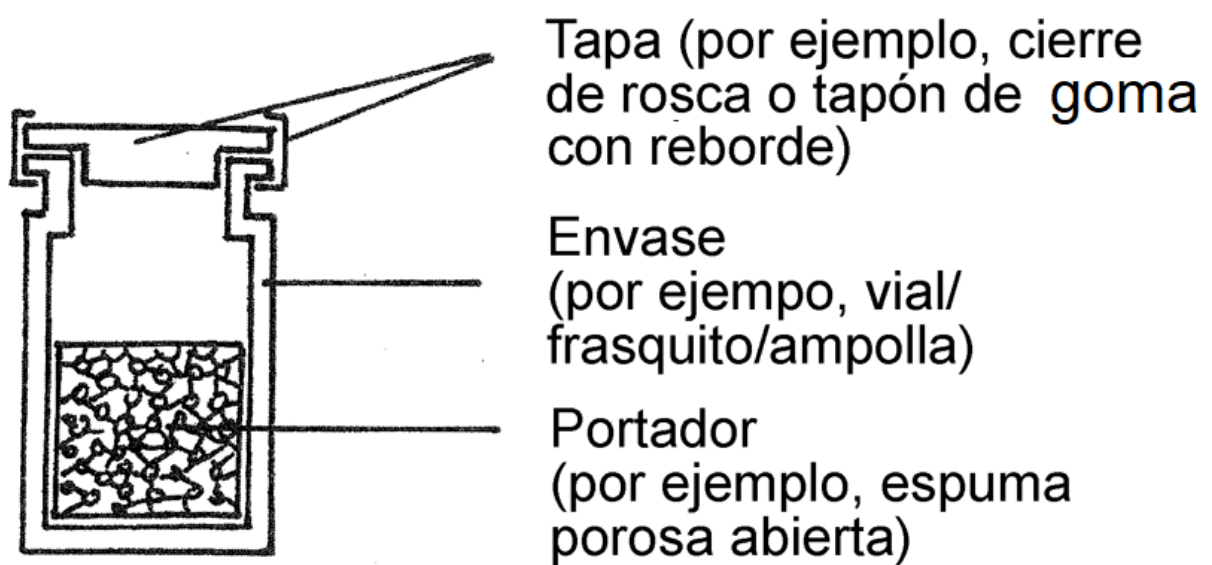


Fig. 2

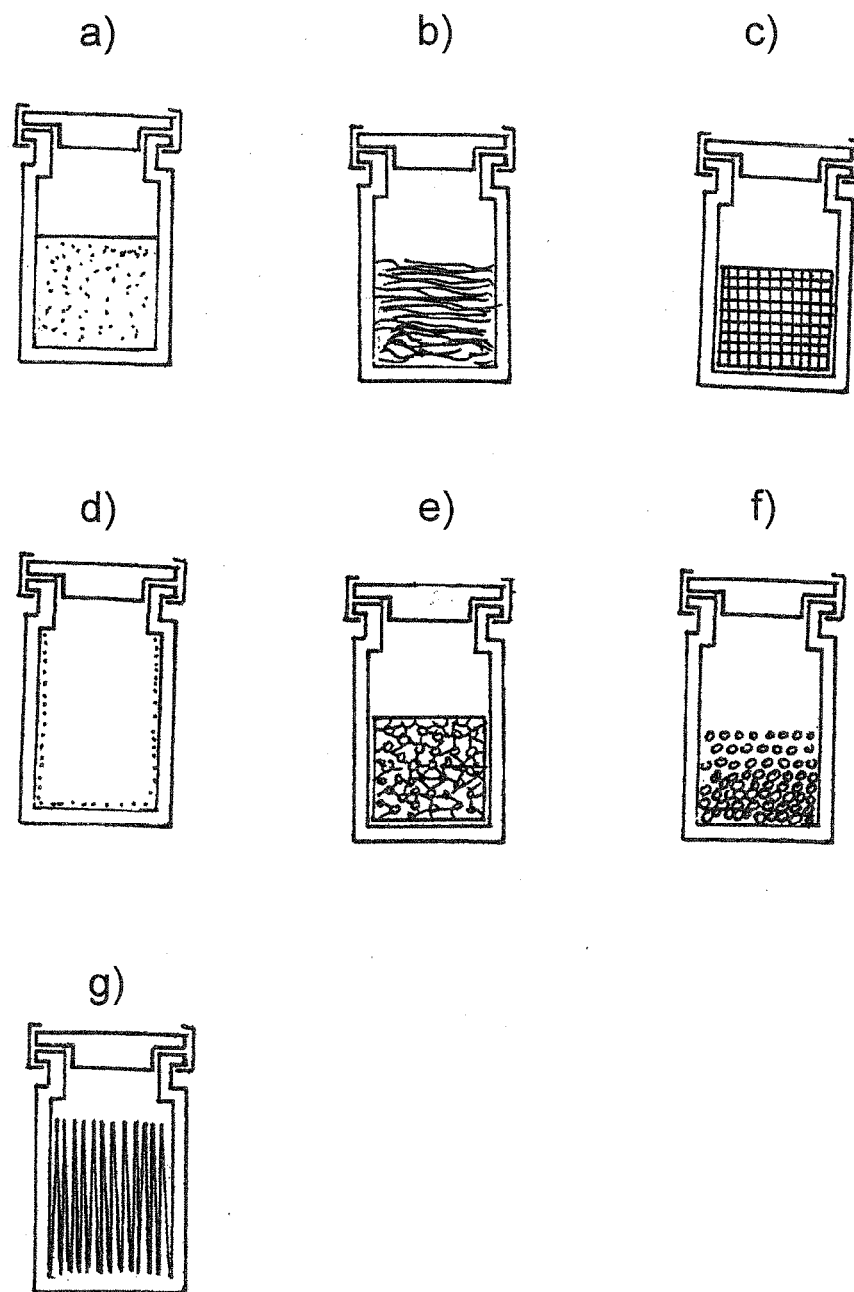


Fig. 3

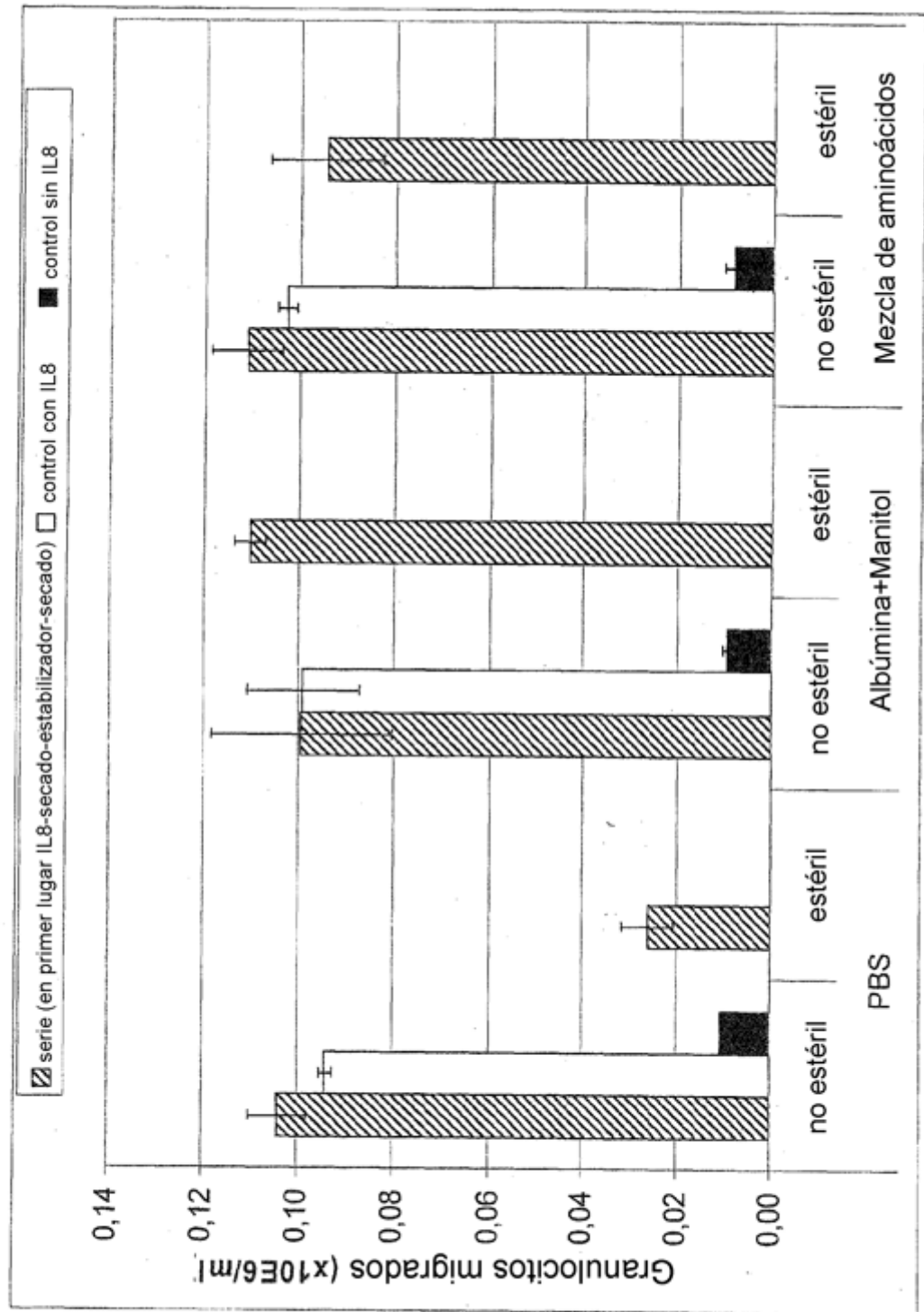


Fig. 4

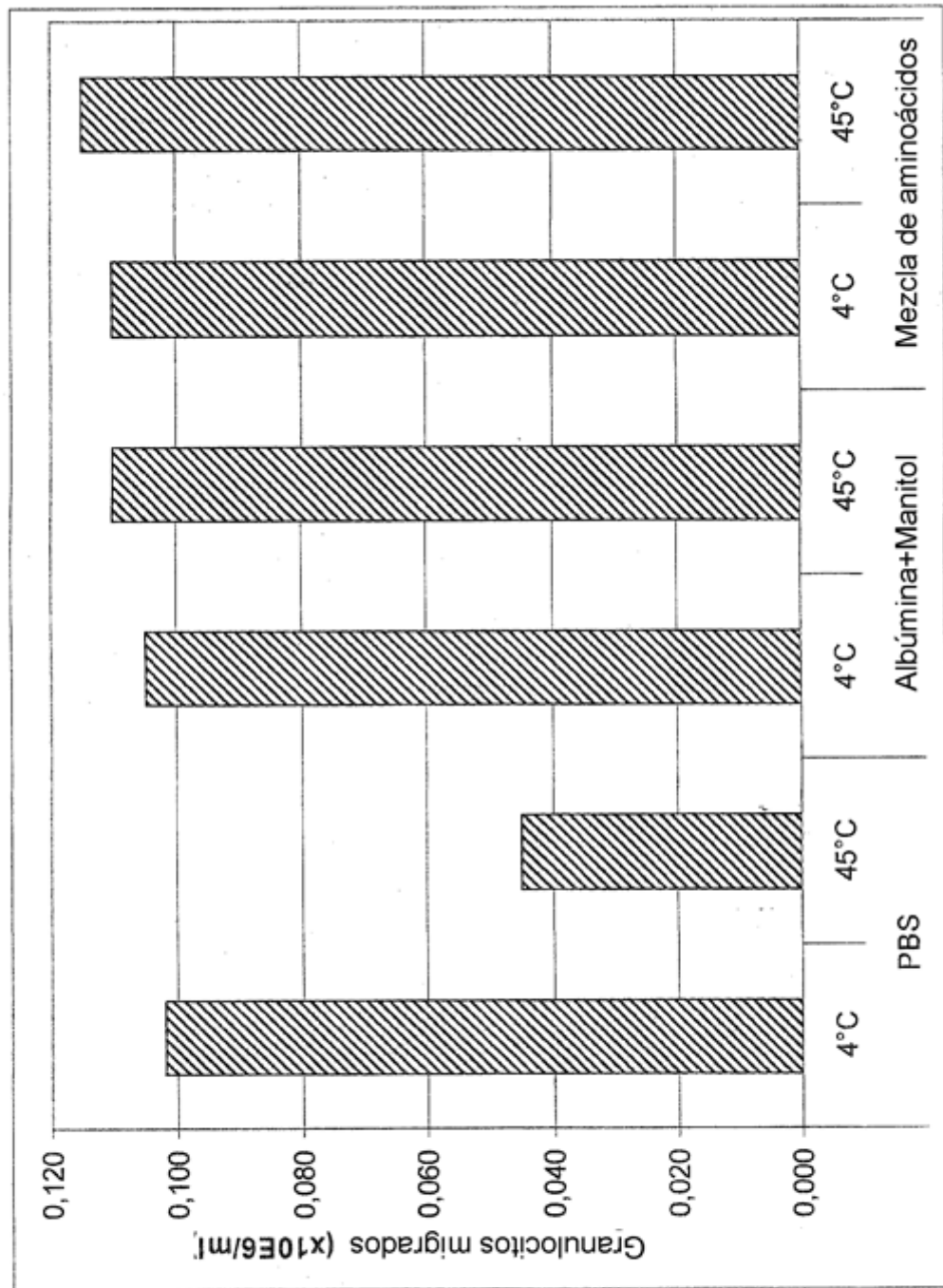


Fig. 5

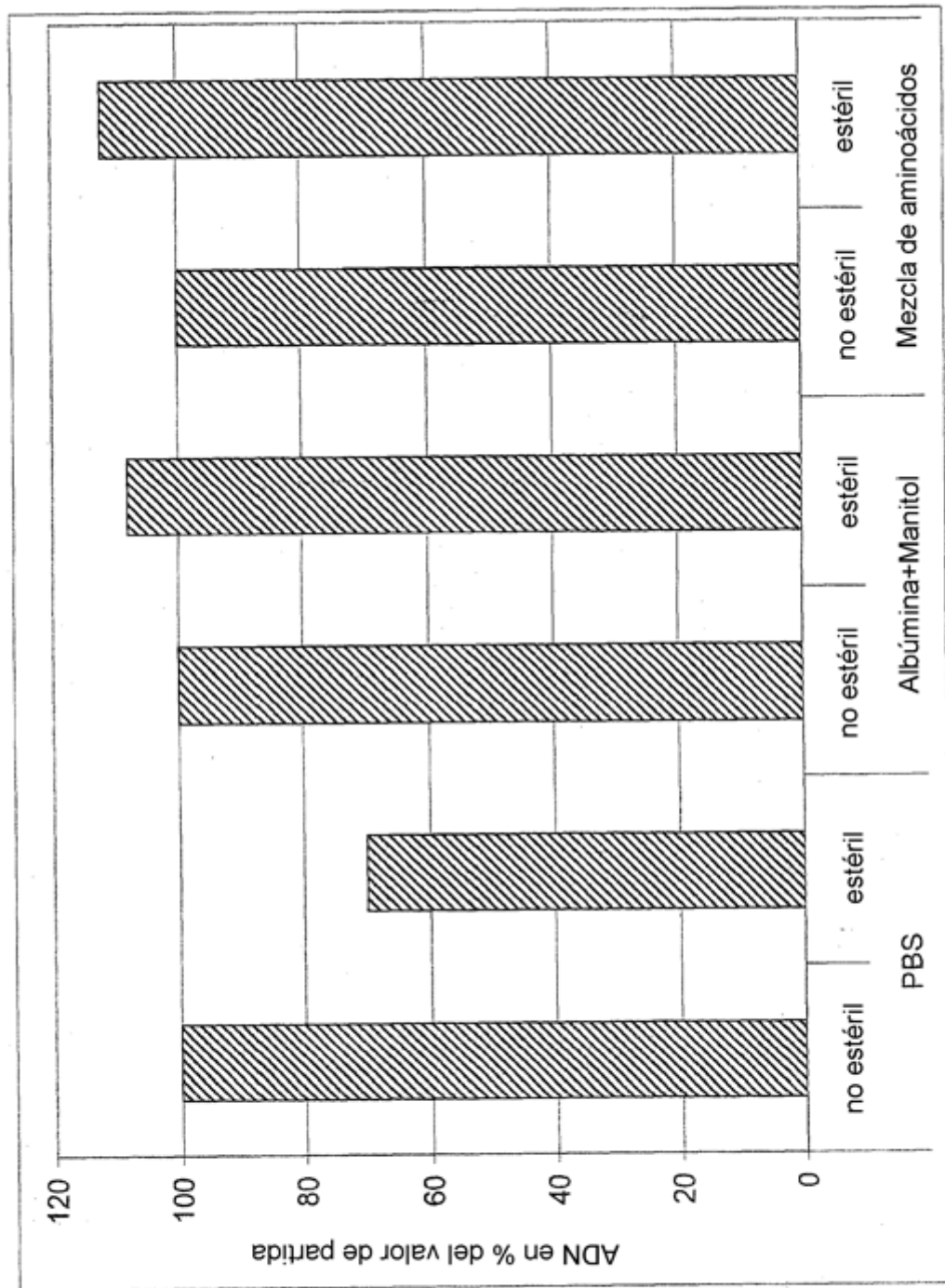


Fig. 6

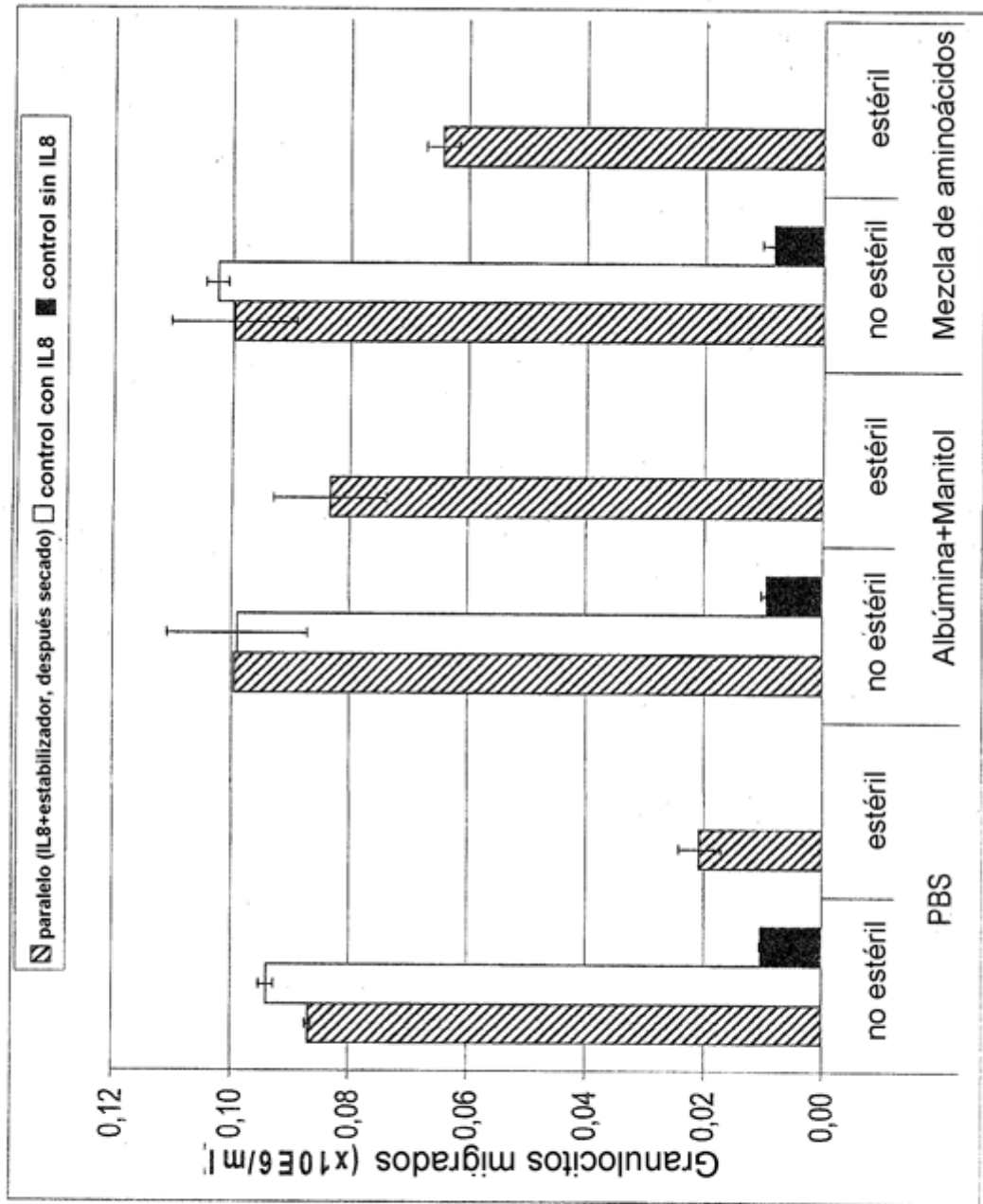


Fig. 7

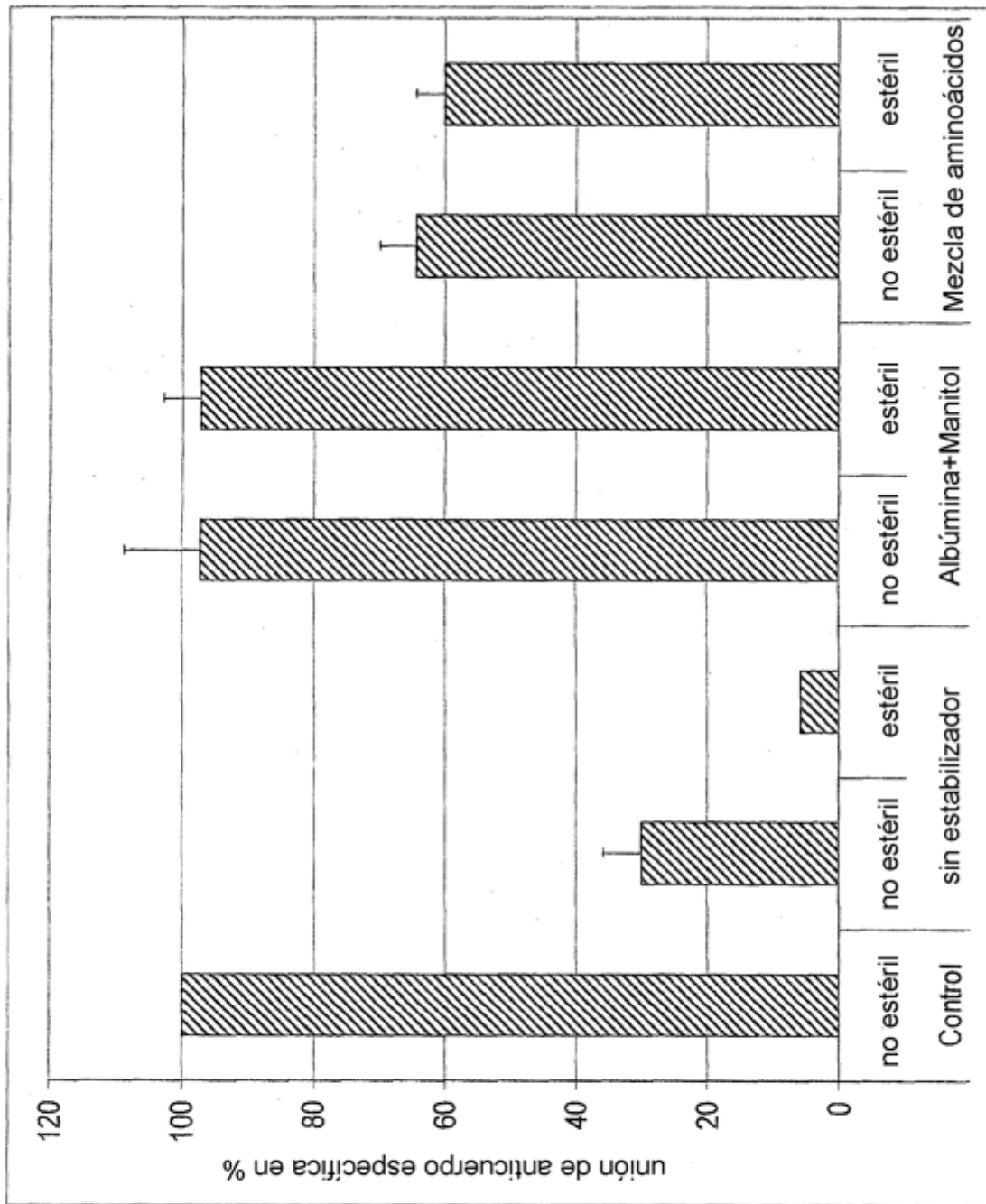


Fig. 8

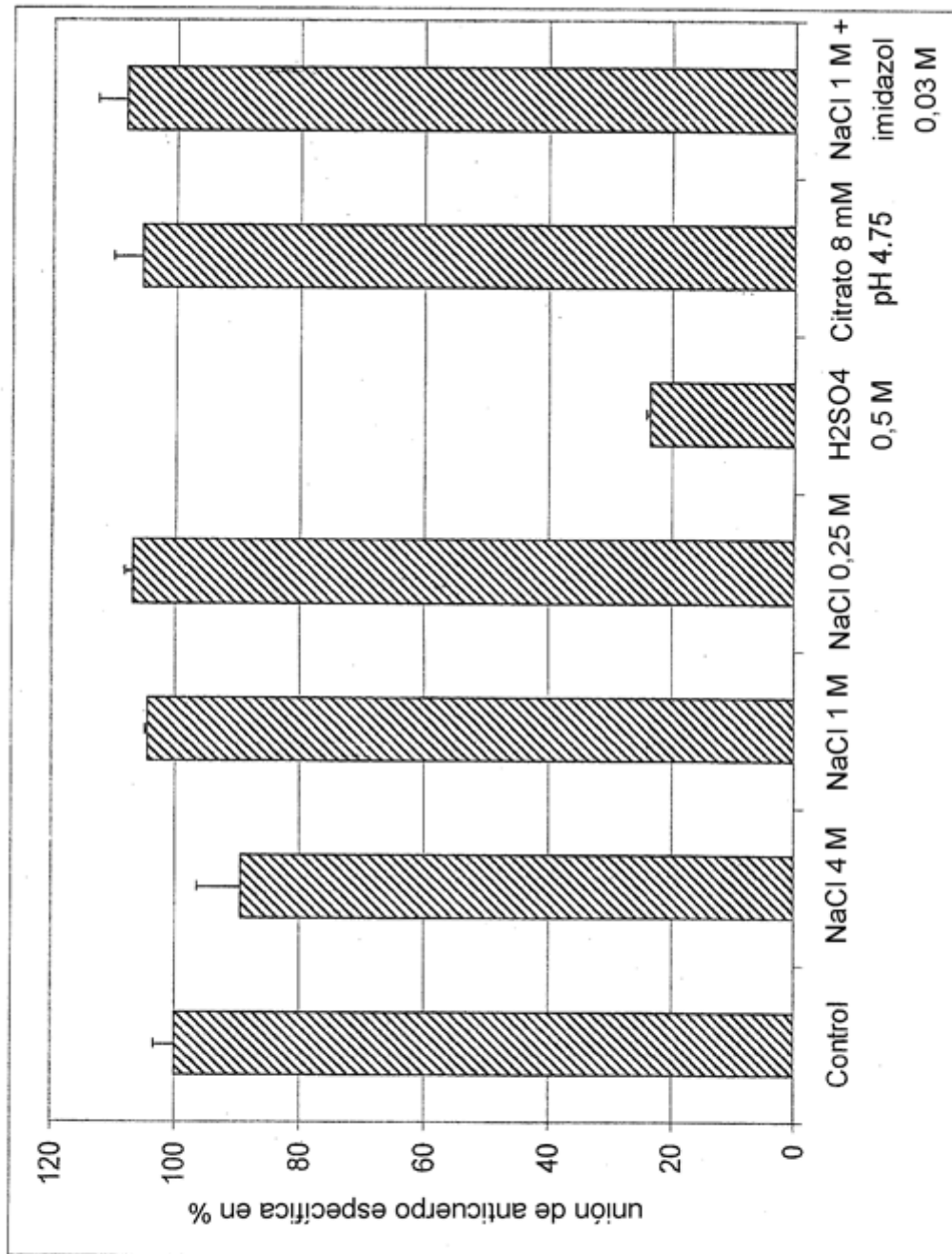


Fig. 9

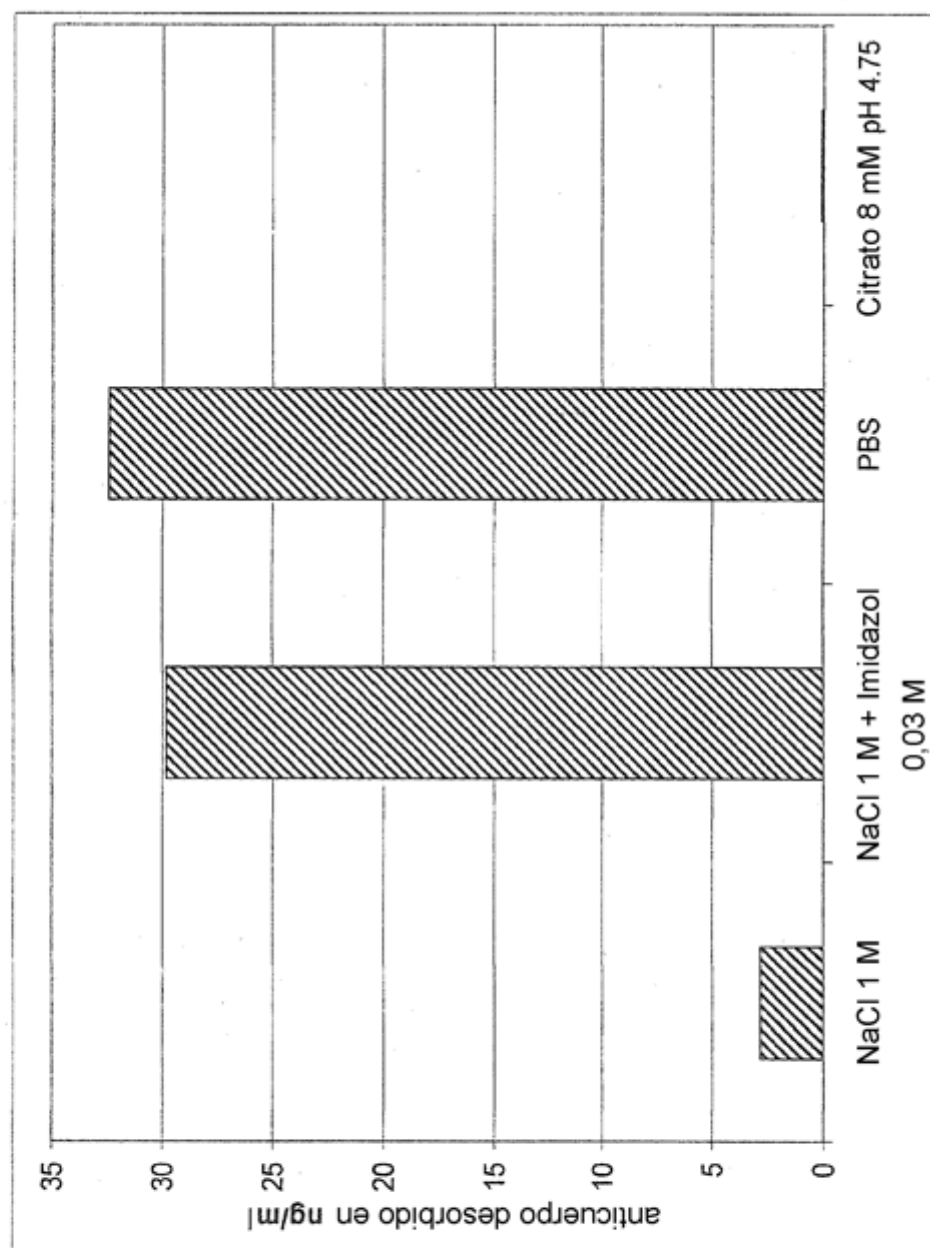


Fig. 10

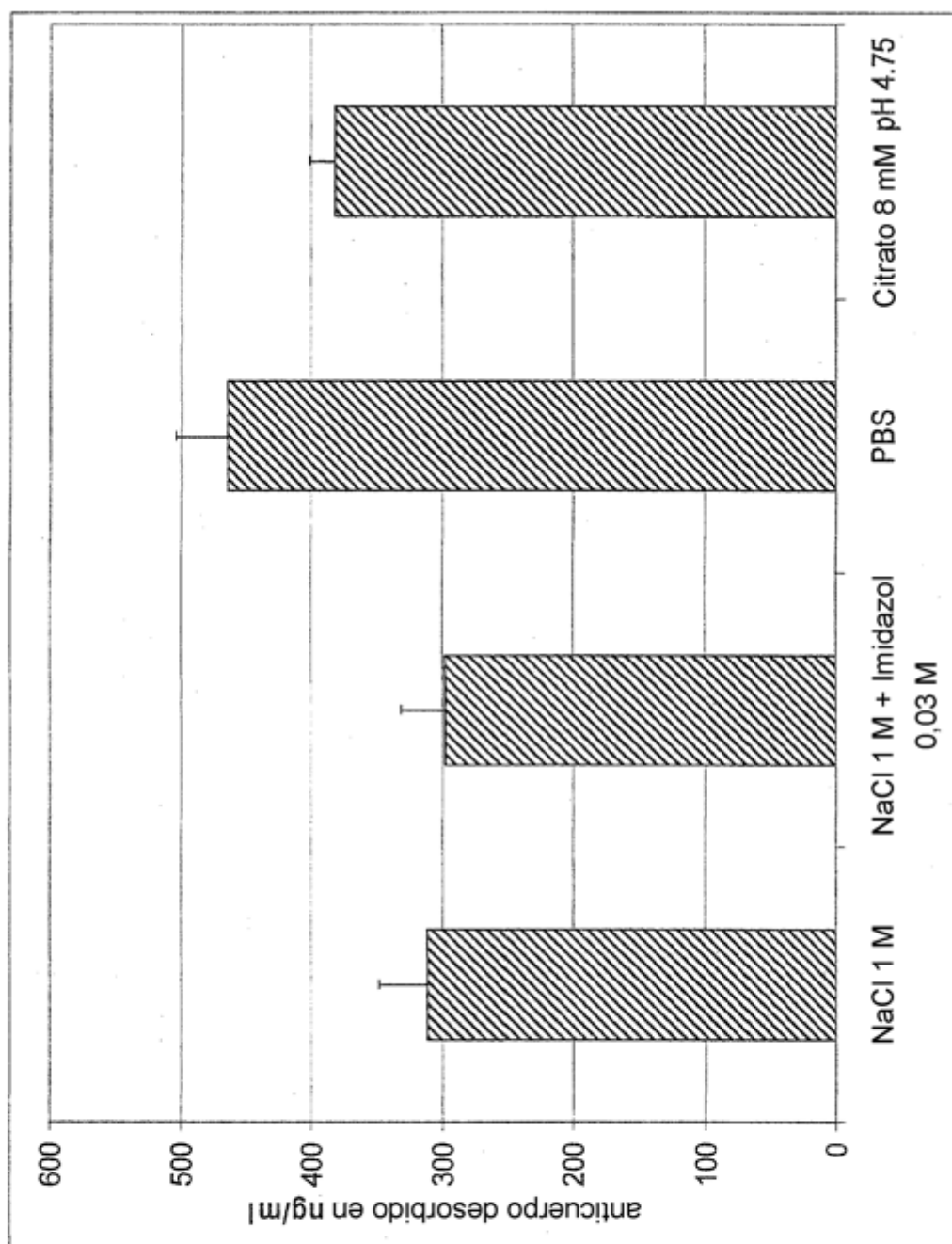


Fig. 11

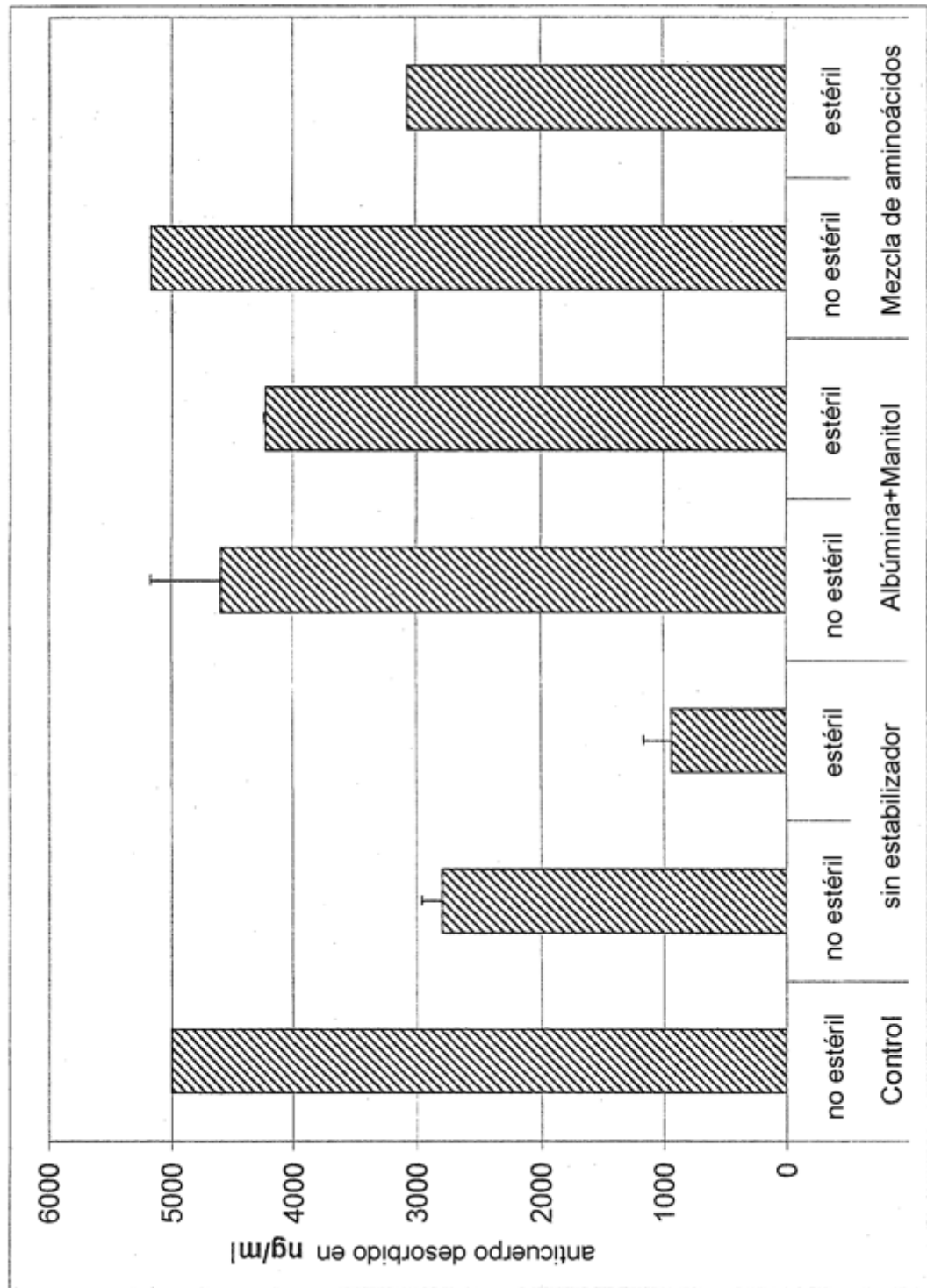


Fig. 12

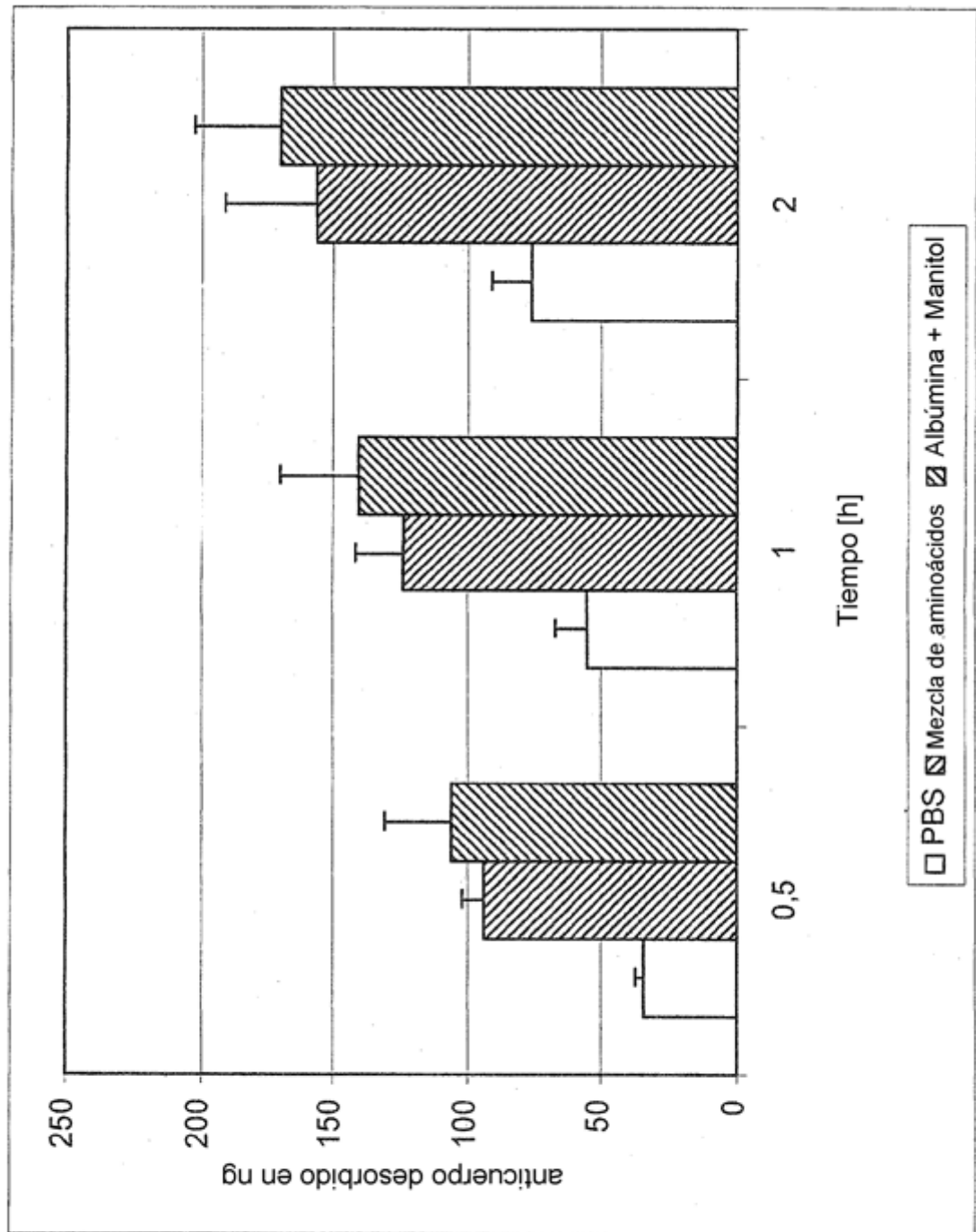
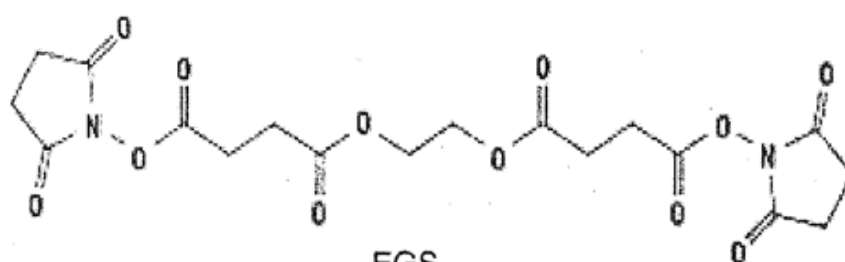
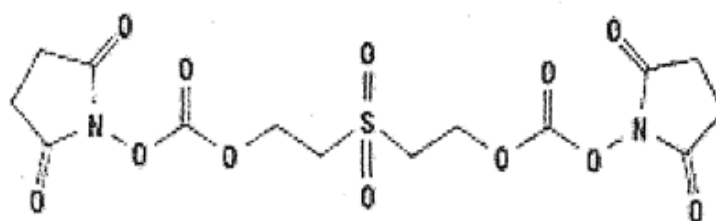


Fig. 13



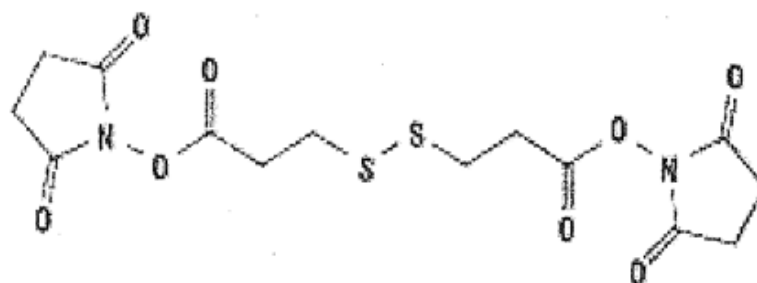
EGS
P.M. 456.36
Brazo espaciador 16.1 Å

EGS (Etilenglicol bis[succinimidilsuccinato])



BSOCOES
P.M. 436.35
Brazo espaciador 13.0 Å

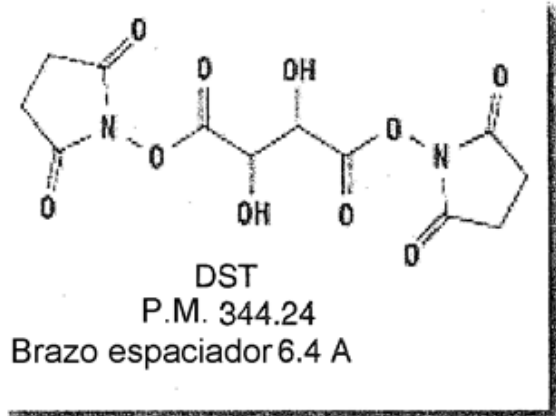
BSOCOES (Bis[2-succinimidooxycarboniloxi]etil)sulfona)



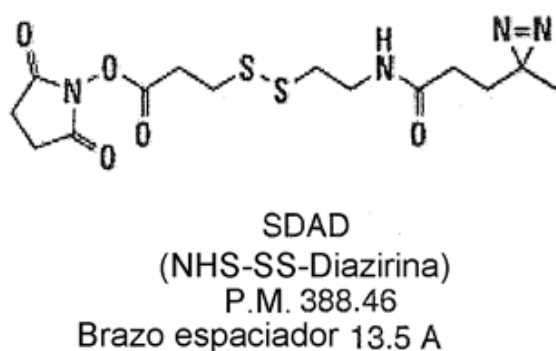
DSP
P.M. 404.42
Brazo espaciador 12.0 Å

DSP (Ditiobis[succinimidilpropionato])

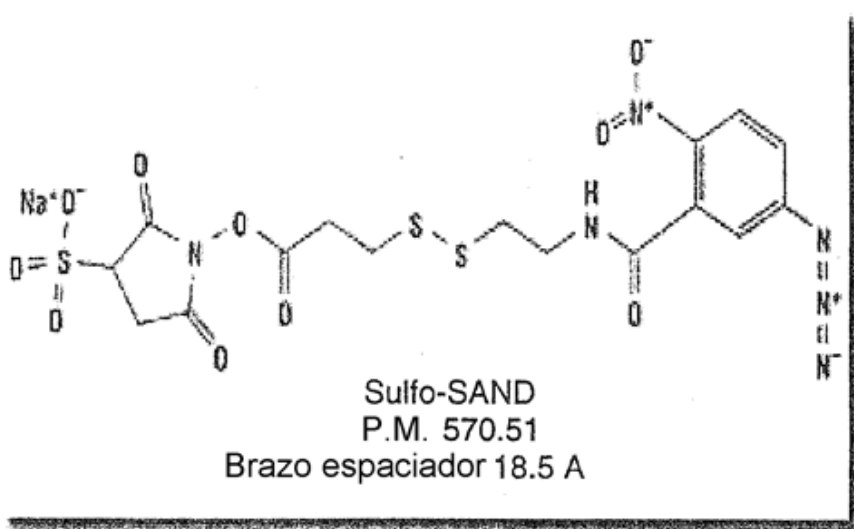
Fig. 13 continuación



DST (Tartrato de disuccinimidilo)



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



2-(m-Azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-propionato de sulfosuccinimidilo

Fig. 14

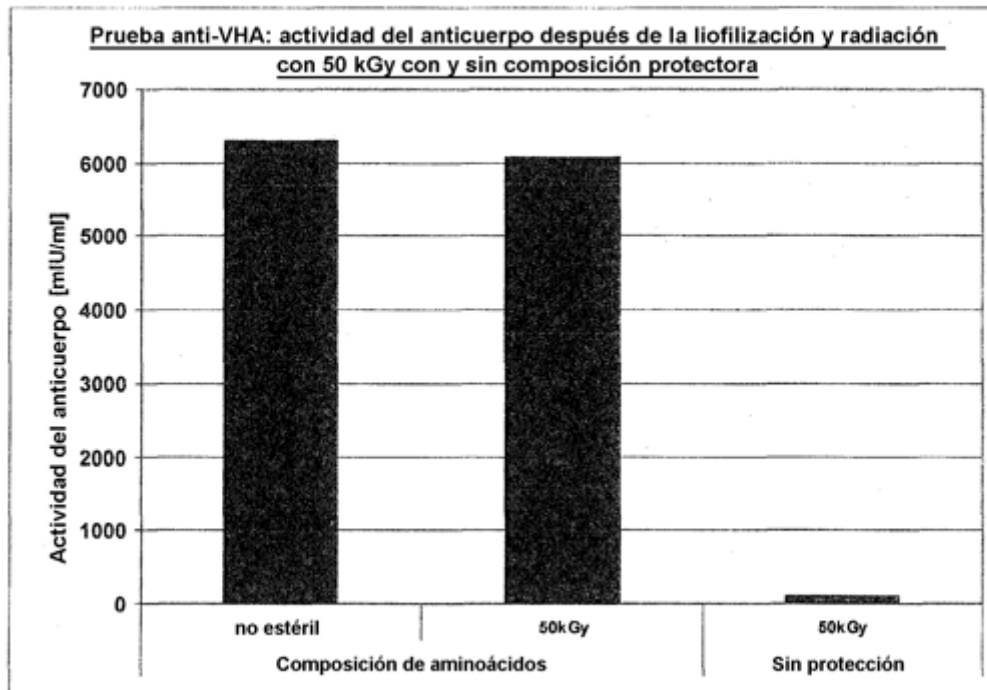


Fig. 15

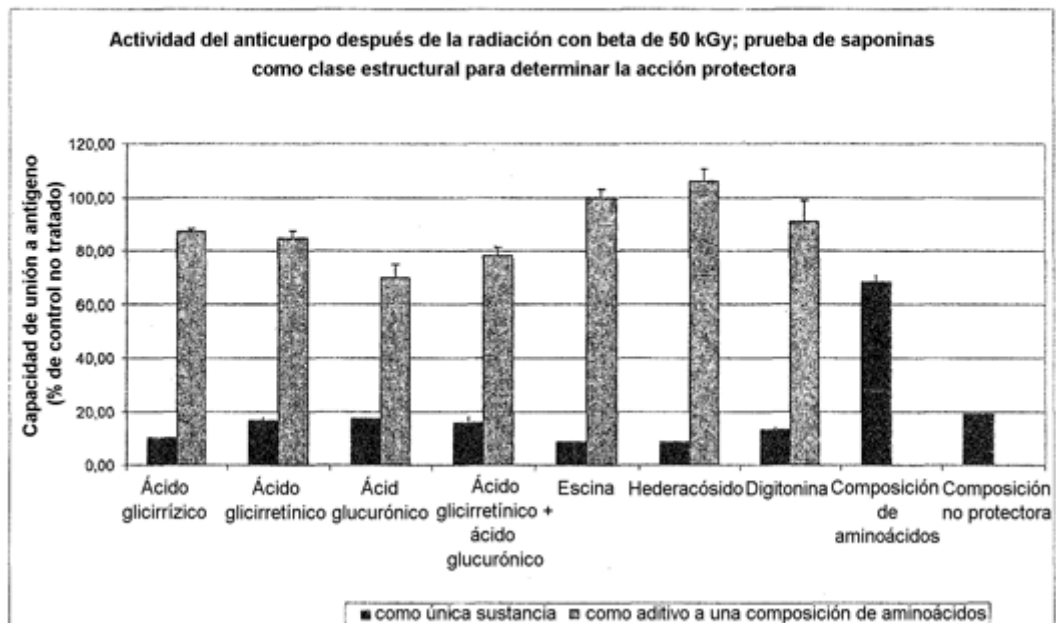


Fig. 16

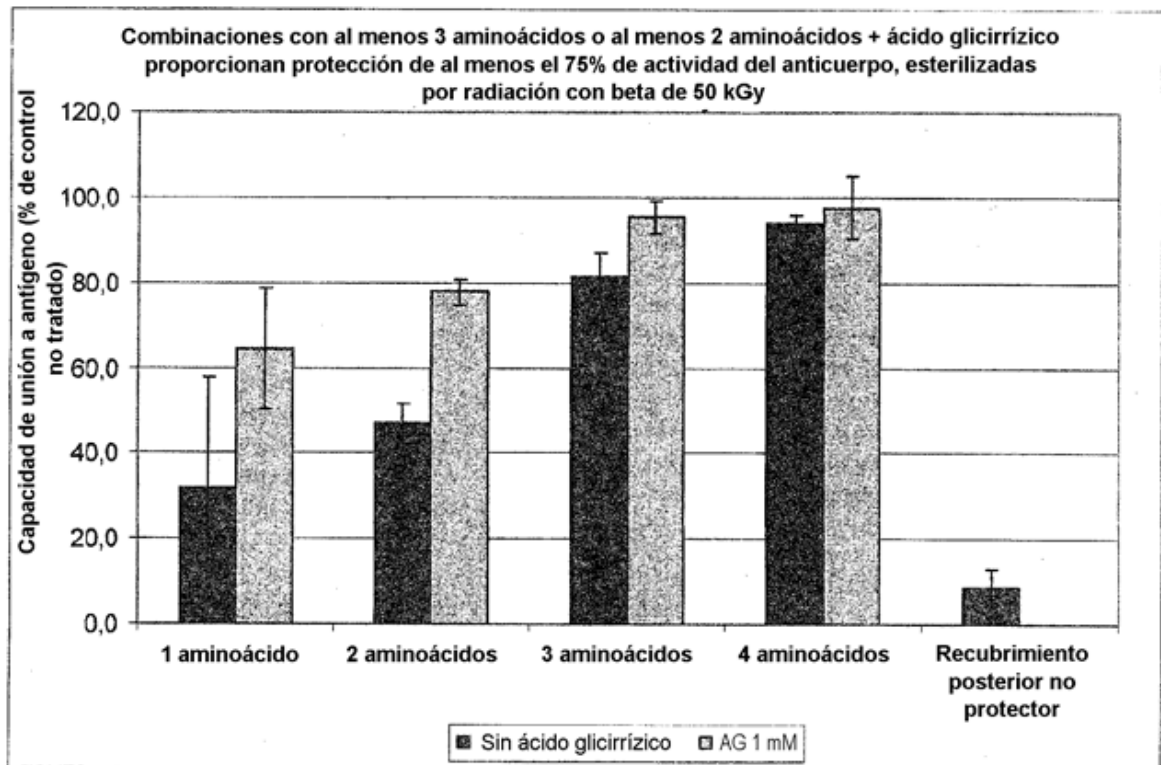


Fig. 17

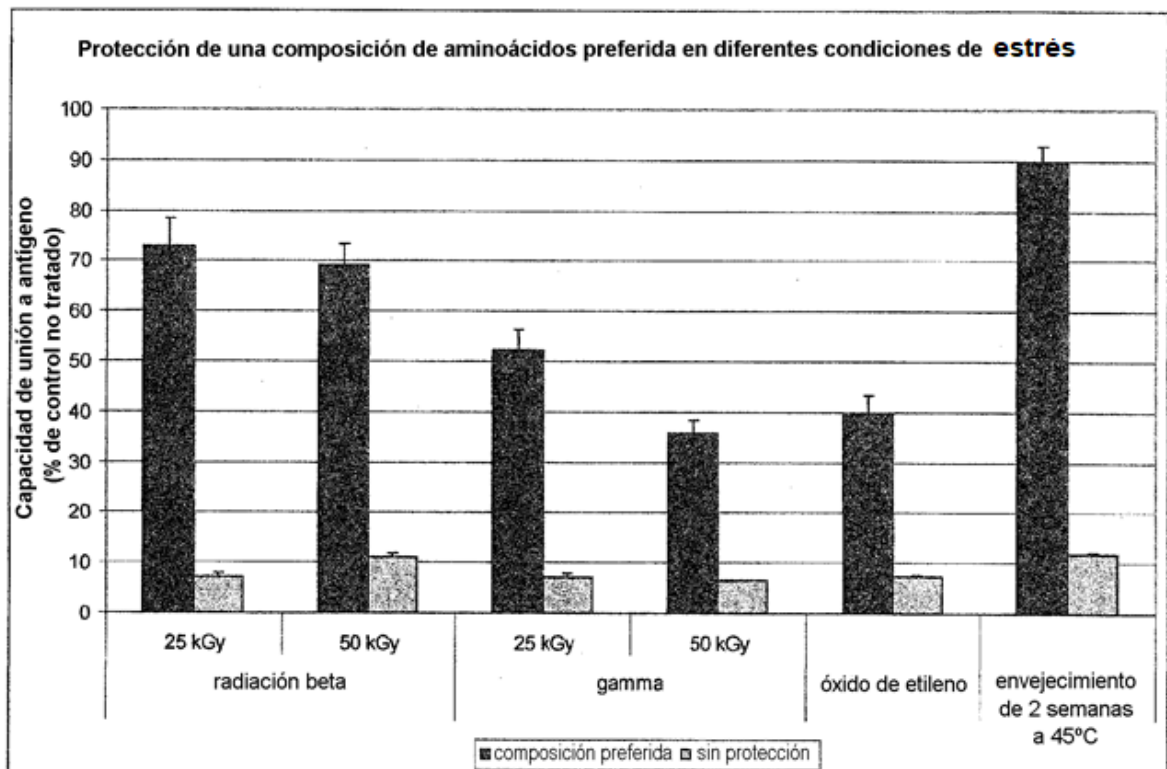


Fig. 18

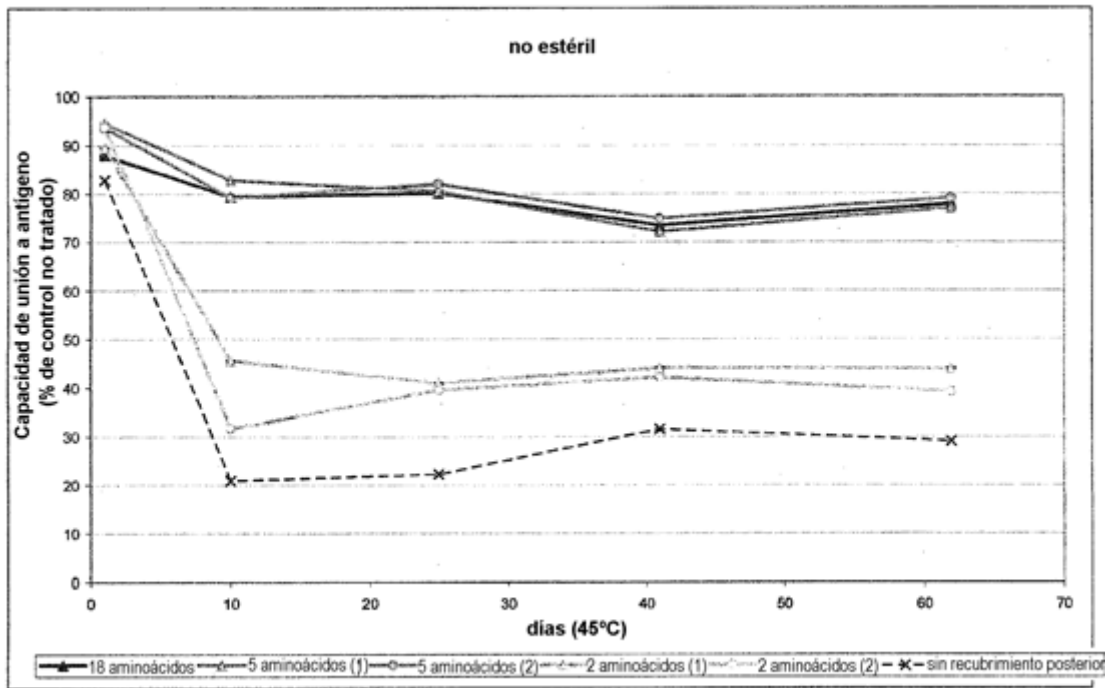


Fig. 19

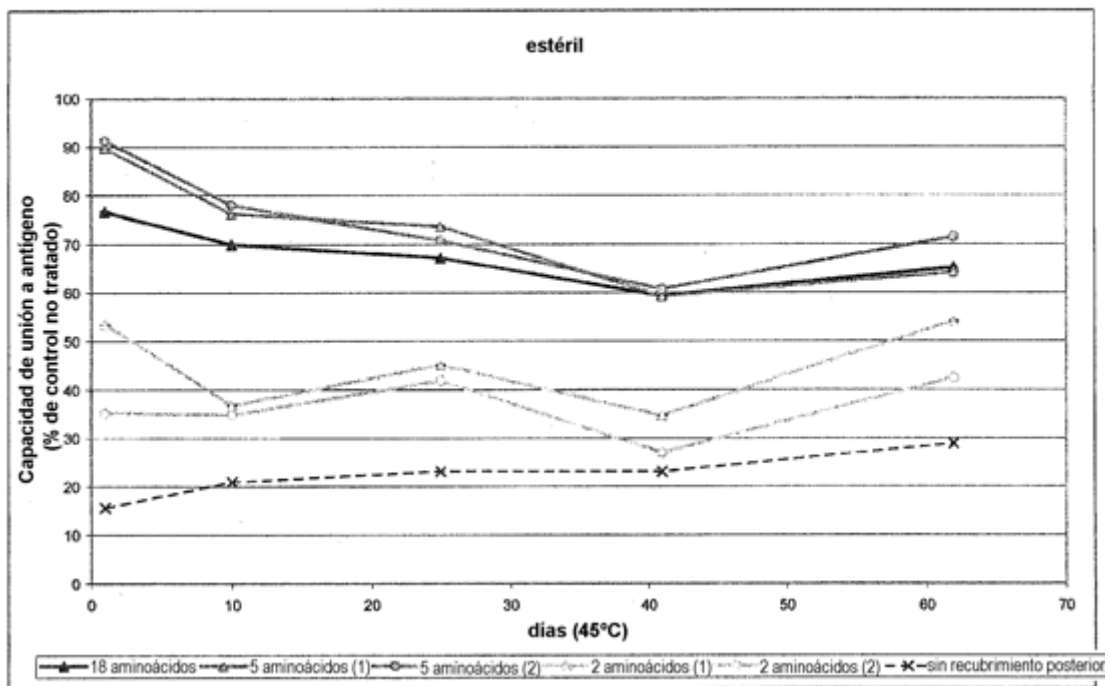


Fig. 20

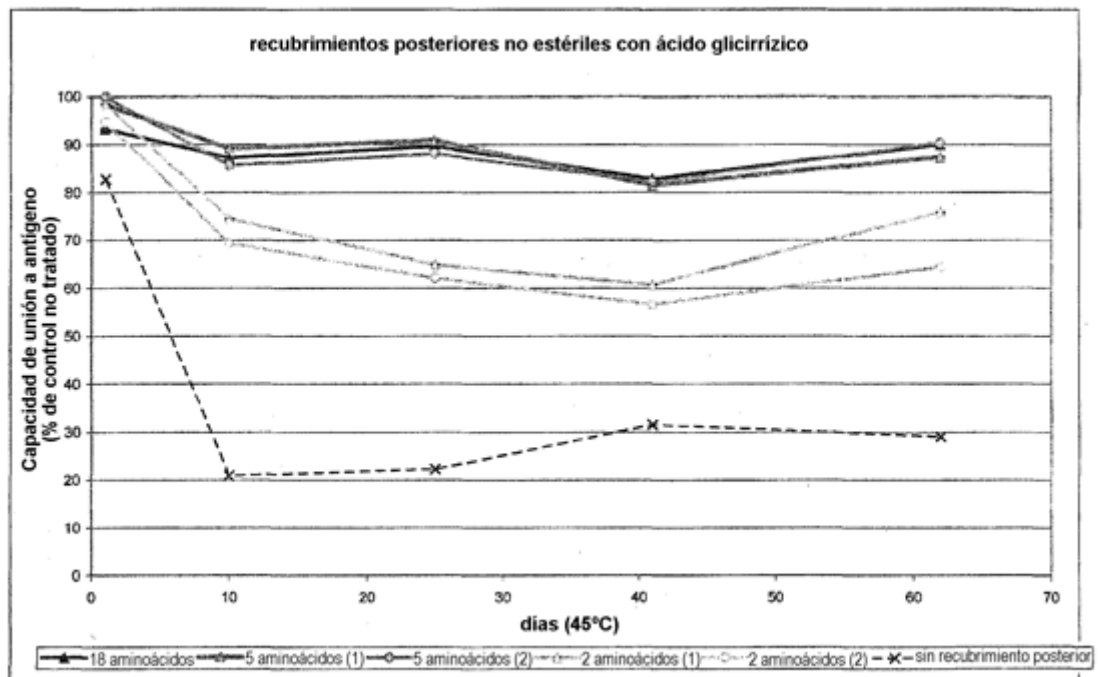


Fig. 21

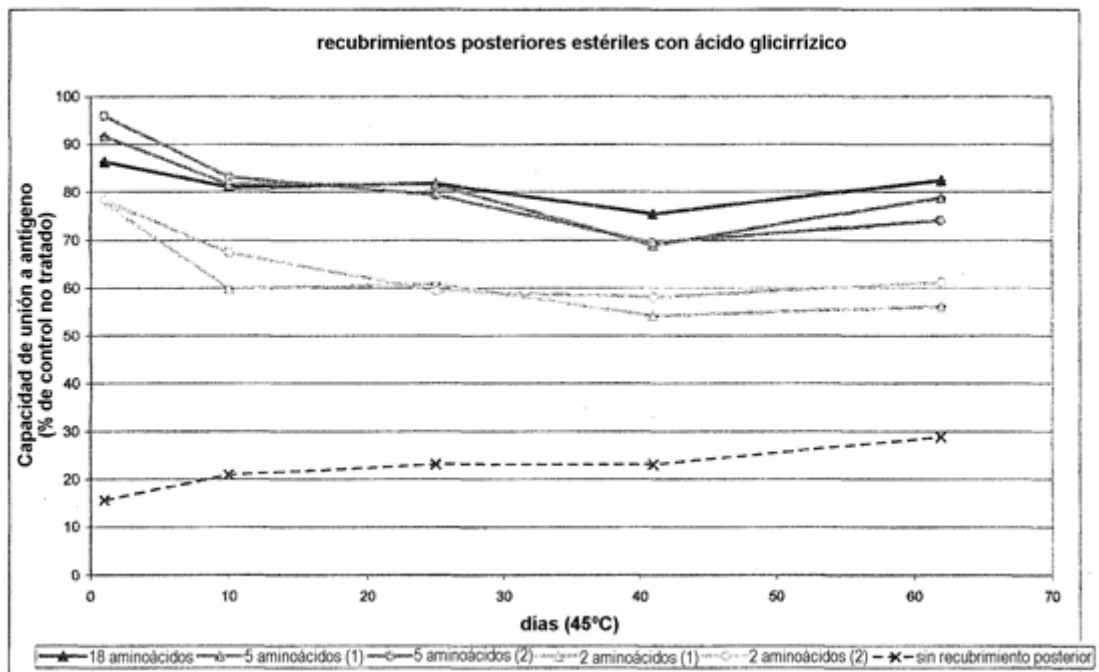


Fig. 22

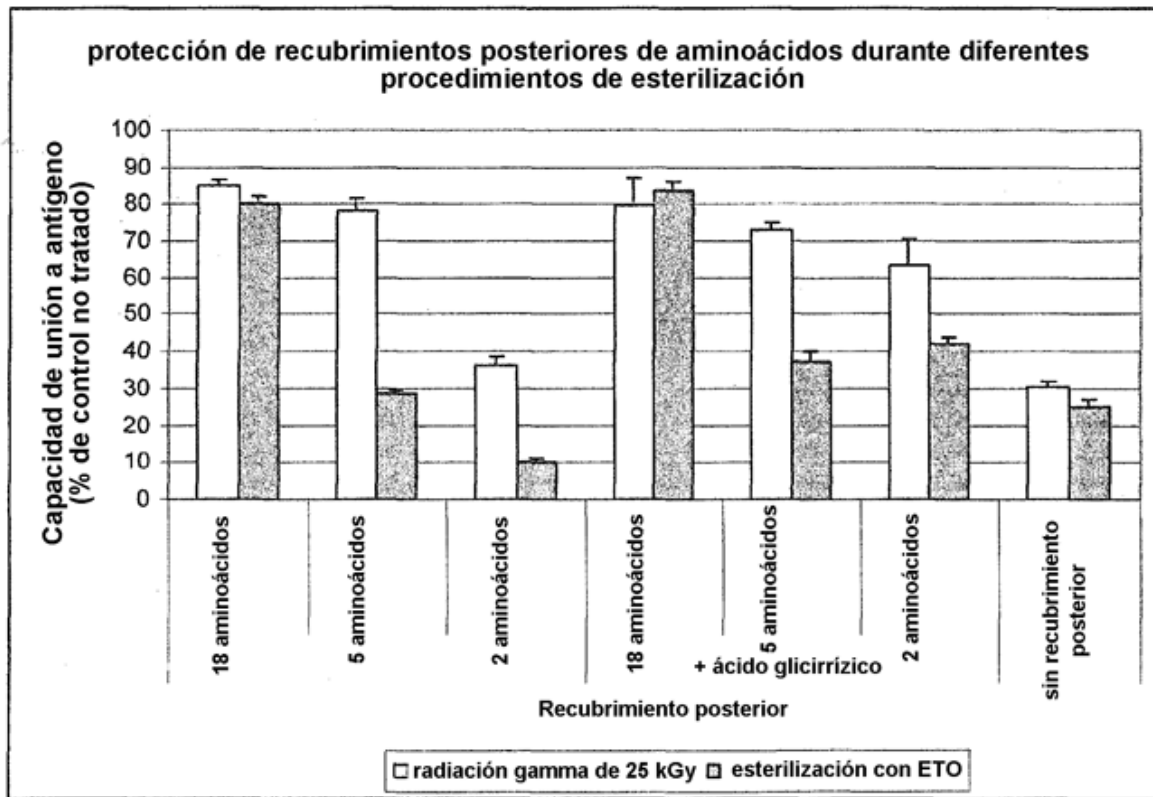
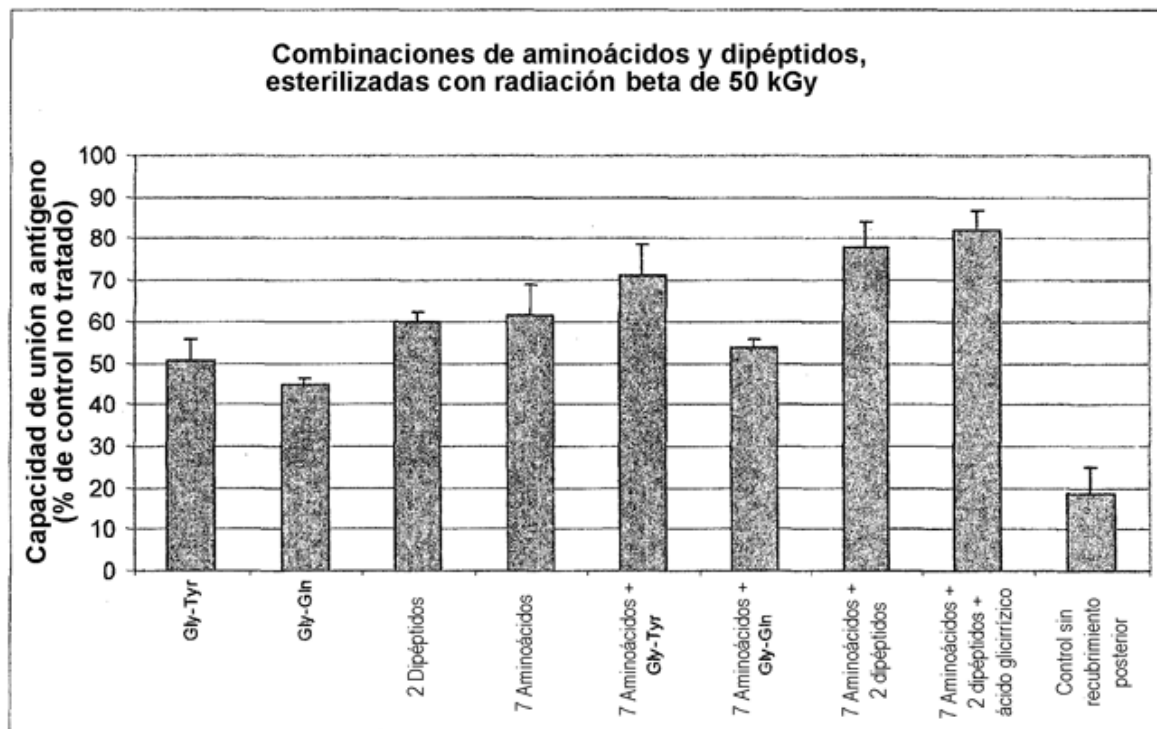


Fig. 23



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2007128550 A [0007]
- EP 0805353 A [0008]
- WO 2006124988 A [0009]
- WO 2002082462 A [0010]
- US 4244943 A [0011]
- WO 9742980 A [0012] [0013]
- US 5730933 A [0014] [0015] [0092]

10 **Literatura no patente citada en la descripción**

- Guidelines on sterilization and disinfection methods' effective against human immunodeficiency virus (HIV). WHO Aids. World Health Organization, 1989 [0012]
- BRAASCH ; COREY. *Chem Biol*, 2001, vol. 8, 1 [0038]
- HARLOW ; LANE. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0040]
- HARLOW ; LANE. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998 [0040]
- KÖHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0040]
- KOZBOR. *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0040]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0040]
- SCHIER. *Human Antibodies Hybridomas*, 1996, vol. 7, 97-105 [0040]
- MALMBORG. *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 183, 7-13 [0040]
- KONDRATENKO et al. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30 (2), 148-153 [0049]
- NELSON D.L. ; COX M.M. *Lehninger Biochemie*, 2005, 122-127 [0058]
- CLELAND et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, vol. 90, 310-321 [0100]