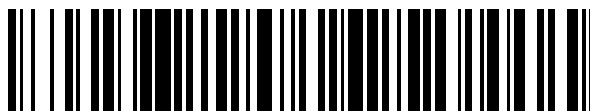


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 324**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/NL2013/050139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13133702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13709589 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2822540**

54 Título: **Métodos y composiciones para estabilizar materiales biológicos secos**

30 Prioridad:

05.03.2012 EP 12158086
05.03.2012 US 201261606577 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.10.2020

73 Titular/es:

**DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERT. DOOR
DE MINISTER VAN VWS (100.0%)
Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en
Sport, Parnassusplein 5
2500 EJ Den Haag, NL**

72 Inventor/es:

**KRAAN, HELEEN y
AMORIJ, JEAN-PIERRE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 788 324 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

Métodos y composiciones para estabilizar materiales biológicos secos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para estabilizar y preservar materiales biológicos secos. Estos materiales biológicos incluyen preparaciones liofilizadas o secadas al vacío de productos biofarmacéuticos tales como vacunas, en particular vacunas virales. Por lo tanto, la invención se refiere al campo de la producción y formulación de productos biofarmacéuticos y al sector de las vacunas.

Antecedentes de la invención

10 El almacenamiento a largo plazo de compuestos biológicos plantea un desafío único, teniendo en cuenta que estos compuestos suelen ser frágiles y vulnerables. Muy pocos compuestos biológicos son lo suficientemente estables en ambientes líquidos, en disolución o en suspensión, para ser aislados, purificados y almacenados en condiciones no refrigeradas, especialmente a temperatura ambiente o temperaturas más altas como disoluciones por poco más que un corto período de tiempo.

15 Una forma de mejorar la estabilidad de los productos biofarmacéuticos es pasarlos a un estado seco [17]. Tanto comercialmente como en la práctica, el almacenamiento de compuestos biológicos como un producto seco conlleva enormes beneficios. Los reactivos, materiales y tejidos secados con éxito poseen menos peso y requieren un menor espacio para su almacenamiento, a pesar de su mayor vida útil. Esto no sucede solo con relación al uso del producto final, como en los lotes finales de vacunas para su uso entre los siguientes 3 meses y 2 años, sino también para el almacenamiento de lotes madre, lotes a granel o lotes finales (entre 1 y 50 años o más de almacenamiento).
20 El almacenamiento a temperatura ambiente de materiales secos es además rentable en comparación con las opciones de almacenamiento a baja temperatura y costes concomitantes. Además, varias vías de suministro, incluido el suministro pulmonar de polvos, el suministro dérmico mediante microagujas recubiertas o en disolución, el suministro parenteral mediante polvos o agujas solubles dependen de formas sofisticadas de formulaciones. Existen varias tecnologías para producir compuestos biológicos secos, incluidos el secado por pulverización, el secado al vacío, el secado al aire, el recubrimiento y el secado con espuma.

Una de las técnicas más antiguas y de uso más común es la liofilización, es decir el secado por congelación. Durante un largo período de tiempo, la liofilización se ha estado considerando más un método exclusivamente técnico que científico, lo que ha obstaculizado su enfoque para fines científicos y de investigación.

30 El método más utilizado para preparar productos biofarmacéuticos sólidos es la liofilización. Este procedimiento consiste en una etapa de congelación seguida de dos etapas de secado, siendo en el primer secado cuando el agua congelada se elimina por sublimación y el segundo secado cuando se elimina el agua "de hidratación" no congelada. Las tensiones producidas en la congelación o el secado pueden modificar la estabilidad termodinámica de los productos biofarmacéuticos e inducir o facilitar la desnaturalización de las proteínas. La desnaturalización puede conducir a una desnaturalización irreversible del producto biofarmacéutico, aunque también puede reducir la
35 estabilidad de almacenamiento en estado seco [19]. Para un liofilizado estable, se utilizan excipientes que sirven como estabilizantes y / o agentes de carga. Se ha demostrado que diferentes compuestos, tales como azúcares, polímeros, aminoácidos y tensioactivos, mejoran la estabilidad de los productos biofarmacéuticos durante la liofilización y su almacenamiento posterior [18, 20]. En la bibliografía se describen diversos mecanismos de cómo se piensa que los excipientes protegen productos biofarmacéuticos, tales como las proteínas y las vacunas, durante la
40 congelación, el secado y su almacenamiento posterior. Comprender los mecanismos de crío- y lioprotección de diferentes estabilizadores es importante en el desarrollo de una formulación racional y un diseño de procesos oportuno para obtener una vacuna liofilizada estable [21].

45 Durante la congelación, el entorno físico de los productos biofarmacéuticos cambia drásticamente, lo que lleva al desarrollo de tensiones que afectan a la integridad del producto biofarmacéutico proteico. Las tensiones más críticas a las que se expone el producto biofarmacéutico durante la congelación son las bajas temperaturas, la concentración por congelación y la formación de hielo [18, 19, 21, 22]. La desnaturalización en frío es el fenómeno por el cual los productos biofarmacéuticos pierden su estructura compacta secundaria como resultado de una caída de la temperatura. La explicación actualmente aceptada para la desnaturalización en frío se basa en un cambio en la energía libre de contacto entre el agua y los grupos no polares a temperaturas más frías, lo que debilita la interacción hidrofóbica y, por lo tanto, altera la estructura biofarmacéutica [19, 20, 23]. Debido a la formación de hielo, la concentración de todos los solutos aumenta drásticamente durante la congelación. Todos los cambios relacionados con la concentración, como la fuerza iónica, la cristalización de solutos y la separación de fases, pueden potencialmente desestabilizar el producto biofarmacéutico [21].

55 La composición relativa inicial y el pH de la formulación pueden evitar el deterioro del producto biofarmacéutico derivado de las tensiones de congelación. Por ejemplo, se ha encontrado en muchos productos biofarmacéuticos que el aumento de la concentración biofarmacéutica en la formulación en relación con otros excipientes antes de la congelación aumenta también la estabilidad del producto biofarmacéutico durante la etapa de congelación-descongelación [24]. Del mismo modo, un pH inicial óptimo para el producto biofarmacéutico en solución

proporcionará una mayor recuperación del producto biofarmacéutico final después de la etapa de congelación-descongelación [20].

Incluso después de la optimización de todos estos factores, muchos productos biofarmacéuticos todavía se siguen desnaturalizando durante la etapa de congelación-descongelación, por lo tanto, se necesita añadir aditivos para minimizar la desnaturalización proteica / biofarmacéutica. Diferentes excipientes que provienen de clases químicas muy diferentes pueden dar crioprotección. Según la "hipótesis de la exclusión de solutos", se ha demostrado que los crioprotectores preferentemente no están directamente en contacto con la superficie de los productos biofarmacéuticos en las soluciones acuosas [24]. El fenómeno termodinámico de exclusión de solutos en presencia de diversos productos biofarmacéuticos ha sido mostrado en diversos excipientes, como sales, aminoácidos, metilaminas, polietilenglicoles, polioles, tensioactivos y azúcares [19, 21, 24, 25].

La 'hipótesis de la vitrificación' es un mecanismo cinético ampliamente conocido. Según este mecanismo, tanto la concentración por congelación como la caída de la temperatura aumentan la viscosidad, reducen la movilidad y ralentizan todos los procesos dinámicos. Cuando el sistema alcanza un estado vítreo, todas las moléculas en el cristal se vuelven físicamente inmóviles (por ejemplo, desnaturalización, agregación) y químicamente inmóviles (por ejemplo, oxidación, hidrólisis, desamidación) y la constante de velocidad de la degradación biofarmacéutica se reduce [19, 26].

Las interfaces de hielo-agua formadas durante la congelación pueden causar desnaturalización de la superficie. La adición de tensioactivos puede disminuir la tensión superficial de la solución biofarmacéutica y, por lo tanto, reducir la adsorción y agregación del producto biofarmacéutico [25, 27].

Los polímeros podrían estabilizar los productos biofarmacéuticos aumentando la temperatura de transición vítrea de la formulación e inhibiendo la cristalización de pequeños aditivos estabilizadores, como los disacáridos [18, 22]. Los aminoácidos también pueden proteger los productos biofarmacéuticos de la desnaturalización por congelación al reducir la tasa y el grado de cristalización de la sal del tampón y, por lo tanto, suprimir el desplazamiento del pH [18].

En una solución acuosa, los productos biofarmacéuticos están completamente hidratados, lo que significa que el producto biofarmacéutico tiene una monocapa de agua que cubre e interactúa (por enlaces de hidrógeno) con la superficie biofarmacéutica [28]. El secado elimina parte de la capa de hidratación y esto puede alterar el estado inicial del producto biofarmacéutico conduciendo a la desnaturalización. Para evitar la desnaturalización durante el secado se requieren protectores. Un mecanismo importante de la estabilización de tales protectores se denomina "hipótesis de la sustitución del agua" [18-20, 29]. Los azúcares, como la sacarosa y la trehalosa, los polioles [20, 30] y los aminoácidos [31] pueden formar enlaces de hidrógeno con el producto biofarmacéutico seco. Es decir, pueden actuar como un sustituto del agua, cuando se retira la capa de hidratación. La formación de un cristal amorfo, explicado anteriormente en la "hipótesis de la vitrificación", es también un mecanismo de protección importante.

Además de la sustitución del agua y la formación de cristales, muchos excipientes, especialmente los polímeros, pueden estabilizar los productos biofarmacéuticos al aumentar la temperatura de transición vítrea (T_g), que se define como la temperatura de transición entre los estados gomoso (líquido) y vítreo (sólido). En general, cuanto mayor es la T_g , menor es la movilidad molecular en el cristal (por ejemplo, el movimiento de los productos biofarmacéuticos, estabilizantes, oxígeno y agua) y más estable es la formulación biofarmacéutica durante el secado y el almacenamiento posterior [18, 22]. Otro mecanismo implicado en la estabilización de los productos biofarmacéuticos durante el secado y que es aplicable a los polisacáridos y otros polímeros, es la inhibición de la cristalización durante la concentración de solutos de pequeños excipientes que estabilizan el producto biofarmacéutico durante el secado.

Debido a su preferencia por un entorno a granel en lugar de la superficie biofarmacéutica (anteriormente denominada 'exclusión de solutos'), algunos excipientes pueden actuar como agentes de carga, lo que significa que brindan soporte mecánico a la torta final, mejoran la elegancia del producto y previenen el colapso del producto durante el secado. El manitol y la glicina son agentes de carga frecuentemente utilizados, debido a su baja toxicidad, alta solubilidad y alta temperatura eutéctica [18, 25, 32]. La mayoría de los aminoácidos son agentes de carga potenciales y cristalizan fácilmente [33].

Si el producto biofarmacéutico es estable durante el procedimiento de secado, a menudo es factible el almacenamiento a largo plazo en estado seco. Aunque, en general, el procedimiento de secado en sí es más perjudicial para el producto biofarmacéutico, los productos biofarmacéuticos secos pueden perder su estructura o potencia durante el almacenamiento si no se formulan adecuadamente. La agregación produce una inestabilidad física importante en los productos biofarmacéuticos durante el almacenamiento. También pueden ocurrir diferentes degradaciones químicas, como la desamidación, la oxidación y la hidrólisis, durante el almacenamiento, pero estas alteraciones pueden no afectar necesariamente a la actividad de los productos biofarmacéuticos, dependiendo de la ubicación de los residuos transformados. Los azúcares reductores como la glucosa y la sacarosa pueden reaccionar con los residuos de lisina y arginina en los productos biofarmacéuticos para formar aductos de carbohidratos a través de la reacción de Maillard, una reacción de ennegrecimiento, que puede conducir a una pérdida significativa de actividad del producto biofarmacéutico liofilizado durante el almacenamiento.

La temperatura de almacenamiento es uno de los factores más importantes que afectan a la estabilidad de los productos biofarmacéuticos en estado sólido. Otros factores que afectan a la estabilidad de almacenamiento a largo plazo son la temperatura de transición vítrea (T_g) de la formulación, el pH de la formulación y el contenido de humedad residual después del secado. El contenido de humedad de una formulación seca puede cambiar significativamente durante el almacenamiento debido a varios factores, incluida la liberación de la humedad por el tapón, la cristalización de un excipiente amorfo o la liberación de humedad de un hidrato del excipiente. Los excipientes que se usan para estabilizar los productos biofarmacéuticos durante el secado pueden desestabilizar los productos biofarmacéuticos en estado sólido si sus cantidades no se usan adecuadamente en la formulación. También existe el riesgo de que se produzca la cristalización de excipientes amorfos durante el almacenamiento, porque el estado cristalino es termodinámicamente más estable que el estado vítreo [39]. Muchos azúcares y polioles tienen tendencia a cristalizar, pero esto se ve muy afectado por su cantidad relativa en la formulación, la temperatura de almacenamiento y la humedad relativa [18, 40]. Además, la composición relativa de los diversos excipientes y la presencia de estabilizadores no cristalizantes, como los polímeros, pueden inhibir la cristalización de los excipientes.

Los mecanismos de estabilización de los productos biofarmacéuticos en estado seco durante el almacenamiento a largo plazo son similares a los de la lioprotección, incluida la formación de un estado vítreo amorfo, la sustitución de agua y los puentes de hidrógeno entre los excipientes y el producto biofarmacéutico [41]. Se requiere una combinación de estos mecanismos para la máxima estabilización biofarmacéutica en el estado sólido [18, 42]. La calidad final de un producto liofilizado está determinada por la elección de los excipientes, incluidos los agentes tamponantes, de carga y estabilizantes, y el procedimiento de liofilización.

La poliomielitis es una enfermedad altamente infecciosa que afecta principalmente a los niños pequeños. La enfermedad, causada por cualquiera de los tres serotipos del virus de la polio (tipo 1, tipo 2 o tipo 3) no tiene ningún tratamiento específico, pero puede prevenirse mediante la vacunación. Actualmente, la vacuna oral contra la poliomielitis (Sabin OPV) es la vacuna elegida para luchar por la erradicación mundial de la poliomielitis. Sin embargo, una preocupación importante es la capacidad de la OPV de revertirse en una forma que pueda causar parálisis, la llamada poliomielitis paralítica asociada a la vacuna (VAPP). Otro riesgo del uso permanente del virus de la polio atenuado in vivo es la reversión a los virus de la polio derivados de la vacuna (VDPV) [1]. En los países occidentales, el uso de una vacuna inactivada contra la polio Salk (IPV) es la forma preferida actualmente para eliminar el riesgo de VAPP y VDPV circulante. Se cree que IPV es el más adecuado para la continuación del programa de erradicación global [1-3].

Para lograr la erradicación mundial de la poliomielitis, una IPV (mejorada) debe ser eficaz, económica, segura de fabricar y fácil de administrar [4]. La viabilidad de la IPV actual en los países en desarrollo es limitada, porque la IPV es más costosa que la OPV y se administra a través de inyecciones solamente [1, 3, 5]. Para limitar los gastos de la IPV, la OMS y RIVM están desarrollando una IPV no comercial para la transferencia de esta tecnología a los países en desarrollo. Debido a que la contención del virus de la polio Salk de tipo salvaje durante la producción podría ser un problema, especialmente en los países en desarrollo, la nueva vacuna se basará en la cepa OPV, Sabin (sIPV), por lo que también se espera que los costes de producción sean menores. Para una mayor reducción de estos costes, RIVM está desarrollando formulaciones de sIPV que muestren el ahorro de dosis mediante el uso de un adyuvante y / u otras rutas de inmunización [6].

Dado que los métodos de administración alternativos y las mejores formulaciones de vacunas tienen el potencial de hacer que la administración de vacunas sea más fácil y segura [7, 8], actualmente se están desarrollando varios métodos alternativos de administración de vacunas.

Parece que hay diferencias con respecto a la estabilidad térmica entre los diversos serotipos de la polio inactivados, siendo el tipo 1 el más vulnerable. En ausencia de conservantes, el tipo 1 se deteriora lentamente después del almacenamiento durante dos años a 4°C, mientras que los tipos 2 y 3 mantienen su potencia durante muchos años. El contenido de antígeno D cae significativamente después de 20 días a 24°C y es indetectable después de la exposición a 32°C durante el mismo período. Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la antigenicidad D para el tipo 2 a ninguna de estas temperaturas. El tipo 3 permanece estable durante 20 días a 24°C, pero el contenido de antígeno D cae significativamente a 32°C [9].

Los tres serotipos de IPV muestran un mantenimiento satisfactorio de la potencia cuando se incorporan a las vacunas combinadas y se almacenan a 4°C durante períodos que van desde un año hasta más de cuatro años, según las observaciones realizadas en la vacuna DT-polio, que se conserva con 2-fenoxi-etanol y se adsorbe en hidróxido de aluminio [9, 10]. El almacenamiento prolongado provocó una disminución de la antigenicidad, especialmente para el tipo 1 [9]. El IPV como vacuna independiente es estable durante 4 años a 4°C y un mes a 25°C [10]. A 37°C hay una pérdida significativa de potencia del tipo 1 después de 1-2 días y de los tipos 2 y 3 después de dos semanas [11, 12]. Además, la congelación tiene un efecto negativo sobre la potencia de IPV, que está relacionada con la pérdida de la estructura del antígeno D [12].

Después de la erradicación de la poliomielitis, se requiere una reserva de vacunas contra la poliomielitis para anticipar el riesgo potencial de nuevos brotes de poliomielitis causados por el VDPV circulante (incluso después del cese de la OPV) [13-15] o los ataques de bioterrorismo. Para lograr una reserva óptima de vacunas, se deben

considerar varios problemas. La vida útil es un detalle importante, porque un tiempo de vencimiento retrasado reduciría los costes de almacenamiento [16]. Para garantizar la potencia de las vacunas durante muchos años, se debe extender la vida útil de las vacunas, como la IPV.

- 5 El documento US 4.500.512 describe un agente estabilizante para virus vivos en la preparación de vacunas que puede ser liofilizable. Sin embargo, en la solución estabilizadora del documento US 4.500.512, la sal metálica divalente está casi ausente a una concentración de 0,018%.

Por lo tanto, existe la necesidad de obtener mejores formulaciones que extiendan la vida útil de los productos biofarmacéuticos y un mejor método para producir tales formulaciones, preferiblemente en una forma seca.

Sumario de la invención

- 10 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para producir una formulación seca de un agente biofarmacéutico, en el que el método comprende secar una solución que comprende un agente biofarmacéutico, un aminoácido, un poliol, una sal metálica y agua.

- 15 Preferiblemente, en el método de la invención, la solución consiste esencialmente en 1 pg - 10 g por ml del agente biofarmacéutico, 0,01 - 20% (p/v) del aminoácido, 0,5 - 20% (p/v) del poliol, 0,005 - 10% (p/v) de la sal metálica y el agua. Más preferiblemente, el aminoácido es glutamato, arginina, histidina, asparagina, glicina o una mezcla de los mismos; el poliol es sorbitol, manitol, manosa, maltitol o una mezcla de los mismos; y la sal metálica es una sal de Mg^{++} , Ca^{++} o Li^{+} o una mezcla de los mismos, de los cuales se prefieren las sales de Cl^{-} o SO_4^{2-} o mezclas de los mismos.

- 20 En el método de la invención, el glutamato se disuelve preferiblemente en la disolución en forma de glutamato monosódico.

En una realización preferida del método de la invención, la solución consiste esencialmente en 1 pg - 10 g por ml del agente biofarmacéutico, 5 - 20% (p/v) de sorbitol, 5 - 20% (p/v) de glutamato monosódico, 2 - 10% (p/v) de una sal de magnesio, preferiblemente $MgCl_2$ y / o $MgSO_4$, y opcionalmente 5 - 20% (p/v) de manitol.

- 25 En los métodos de la invención, la solución comprende preferiblemente un tampón farmacéuticamente aceptable y está tamponada a un pH neutro. También se prefiere que la solución se seque por secado al vacío o por liofilización.

- 30 En los métodos de la invención, el agente biofarmacéutico es preferiblemente un agente que comprende material proteico. Más preferiblemente, el agente biofarmacéutico es un virus, preferiblemente un enterovirus o un neumovirus. Lo más preferiblemente, el agente biofarmacéutico comprende el virus de la polio de los serotipos 1, 2 y 3, el virus de la polio inactivado preferible de los serotipos 1, 2 y 3, o en el que el agente biofarmacéutico es un RSV humano o bovino.

- 35 En una realización preferida del método de la invención, la formulación seca, tras la reconstitución después del secado, retiene al menos el 50% de la actividad del agente biofarmacéutico presente en la solución antes del secado. En otra realización del método de la invención, en la que la solución a secar comprende más de un agente biofarmacéutico diferente y en la que la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes es preferiblemente inferior al 50%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida de actividad se expresa como porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, ésta se establece al 100%.

- 40 En una realización preferida del método de la invención, la formulación seca después de la reconstitución después del almacenamiento durante al menos una semana a 45°C retiene al menos el 50% de la actividad del agente biofarmacéutico presente en la solución antes del secado. En otra realización del método de la invención, en la que la formulación seca comprende más de un agente biofarmacéutico diferente y en la que la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes es preferiblemente inferior al 50%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida de actividad se expresa como porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, ésta se establece al 100%.

- 45 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una formulación seca de un agente biofarmacéutico obtenible en cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a la formulación de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento, preferiblemente para inducir una respuesta inmune (en un individuo) contra una enfermedad infecciosa o un tumor.

Descripción de la invención

- 50 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para producir una formulación seca de un agente biofarmacéutico. Los métodos de la invención tienen como objetivo lograr al menos dos mejoras: 1) minimizar la pérdida de actividad del agente biofarmacéutico tras el secado de la formulación (y preferiblemente la posterior reconstitución de la formulación seca); y 2) aumentar la estabilidad, es decir, la vida útil de la formulación seca del agente biofarmacéutico, es decir, minimizar la pérdida de actividad del agente biofarmacéutico tras el

almacenamiento de la formulación seca. El método comprende preferiblemente que la etapa comprenda secar una solución acuosa que comprende un agente biofarmacéutico y uno o más de un aminoácido, un poliol y una sal metálica.

En el método de la invención, la solución a secar comprende, consiste esencialmente o solo consiste en: a) el agente biofarmacéutico como se especifica a continuación en el presente documento y a la concentración especificada a continuación en el presente documento; b) el aminoácido como se especifica en el presente documento a continuación y a la concentración especificada en el presente documento a continuación; c) el poliol como se especifica en el presente documento a continuación y a la concentración especificada en el presente documento a continuación; d) la sal metálica como se especifica en el presente documento a continuación y a la concentración especificada en el presente documento a continuación; e) agua; opcionalmente, f) un tampón como se especifica en el presente documento a continuación a la concentración especificada en el presente documento más abajo y a un pH especificado en el presente documento a continuación; y, opcionalmente, g) otros ingredientes como se especifica en el presente documento a continuación y a la concentración especificada en el presente documento a continuación.

El agente biofarmacéutico

Se entiende en la presente memoria que un "agente biofarmacéutico" se refiere a un agente biológico, que es fisiológicamente activo cuando se aplica a un mamífero, especialmente cuando se aplica a un paciente humano, preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable. El agente biológico es preferiblemente un agente que se produce u obtiene de una célula, aunque las copias sintéticas de los agentes que se pueden obtener de una célula y los agentes modificados químicamente que se pueden obtener de una célula se incluyan en la expresión agente biológico. El agente biológico puede ser un agente basado en proteínas, es decir, un agente que comprenda material proteico tal como proteínas, polipéptidos y péptidos. El agente biológico puede comprender además o consistir en ácidos nucleicos, p. ej., ADN, ARN o un análogo de ácido nucleico.

Un agente biofarmacéutico preferido es un virus o un virión, preferiblemente un virus que infecte a mamíferos, preferiblemente un virus que infecte a seres humanos. El virus puede ser un virus con envuelta pero preferiblemente es un virus sin envuelta. Se entiende en el presente documento que el término 'virus', tal como se usa en el presente documento, incluye virus de tipo salvaje, tal como se presentan en la naturaleza (por ejemplo, aislados naturales), así como virus 'artificiales' atenuados, mutantes y defectuosos. El término 'virus' también incluye virus recombinantes, es decir, virus contruidos usando tecnología de ADN recombinante, como virus defectuosos, p. ej., que carecen de (partes de) uno o más genes virales y vectores de terapia génica en los que parte del genoma viral se reemplaza con uno o más genes de interés. Un virus preferido es el Piconavirus, más preferiblemente un Enterovirus, tal como el virus de la polio, Coxsackievirus, echovirus y rinovirus. Lo más preferiblemente, el virus es el virus de la polio. El virus de la polio puede ser un virus de la polio atenuado pero preferiblemente es un virus de la polio inactivado (IPV). El virus de la polio también puede ser un virus de la polio atenuado inactivado. El agente biofarmacéutico puede comprender uno o más de los serotipos poliovirales 1, 2 y 3, pero preferiblemente el agente comprende los tres serotipos poliovirales 1, 2 y 3. Las cepas adecuadas del virus de la polio de serotipo 1 incluyen, entre otras, una o más de las cepas Sabin 1, Mahoney, Brunhilde, CHAT y Cox. Las cepas adecuadas del virus de la polio de serotipo 2 incluyen, entre otras, una o más de las cepas Sabin 2, MEF-1 y Lansing. Las cepas adecuadas de virus de la polio de serotipo 3 incluyen, entre otras, una o más de las cepas Sabin 3, Saukett H y G, y Leon. En realizaciones preferidas, el agente biofarmacéutico es una vacuna de polio inactivada trivalente tal como p. ej. el Salk-IPV, que contiene la cepa de Mahoney polio viral inactivada para el tipo 1, la cepa polio viral inactivada MEF-1 para el tipo 2 y la cepa de Saukett polio viral inactivada para el tipo 3, o sIPV, que contiene la polio viral inactiva las cepas Sabin-1, -2 y -3. Los métodos para inactivar cepas virales de la polio para un uso seguro en vacunas son habituales en la técnica e incluyen, p. ej., la inactivación con formalina o beta-propiolactona (ver p. ej. Jonges et al., 2010, J. Clin. Microbiol. 48:928-940).

En otra realización, el agente biofarmacéutico es un virus o un virión de un neumovirus. El neumovirus es preferiblemente un virus sincitial respiratorio (RSV), más preferiblemente un RSV humano o bovino. El RSV humano puede ser un virus del subgrupo A o B, y preferiblemente es un aislado clínico, más preferiblemente un aislado que no se ha pasado ampliamente in vitro (preferiblemente pasado menos de 10, 8, 6 o 5 veces). Preferiblemente, el virus RSV (humano o bovino) es un virus que comprende un genoma viral que tiene un gen de la proteína de unión G deletado o inactivado, p. ej. que tiene una mutación en su genoma viral por el cual el genoma viral no codifica una proteína de unión G funcional, como p. ej. los viriones RSV ΔG y RSV $\Delta G + G$ como se describe en el documento WO 2005/061698 y en Widjoatmodjo et al. (2010, Virol J., 7: 114).

El agente biofarmacéutico está presente preferiblemente en la solución a secar en una cantidad que varía entre 1×10^0 y 1×10^{25} partículas vivas y / o muertas o inactivadas por ml. El número de partículas vivas se puede determinar, por ej., por unidades formadoras de placa, dosis infecciosa al 50% en cultivo celular o cultivo de tejidos (CCID₅₀ o TCID₅₀) y otros ensayos virológicos adecuados para determinar el título del agente. El número de partículas muertas o inactivadas se puede determinar usando un ensayo que cuantifique la cantidad de antígeno, como p. ej. ensayos de proteínas, o ensayos que determinen las unidades de hemaglutinación o las unidades de antígeno D de la polio. Preferiblemente, el agente biofarmacéutico está presente en la solución en una cantidad de al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} partículas vivas y / o muertas o

inactivadas por ml y / o en una cantidad de hasta 1×10^{24} , 1×10^{23} , 1×10^{22} , 1×10^{21} , 1×10^{20} , 1×10^{19} , 1×10^{18} , 1×10^{17} , 1×10^{16} , 1×10^{15} , 1×10^{14} partículas vivas y / o muertas o inactivadas por ml.

La cantidad del agente biofarmacéutico en la solución a secar también se puede expresar como el peso del agente biofarmacéutico por ml de la solución. Preferiblemente, el agente biofarmacéutico está presente en la solución en un peso / ml que varía entre 1 pg / ml y 10 g / ml. Más preferiblemente, el agente biofarmacéutico está presente en la solución en una cantidad de al menos 1×10^{-11} , 1×10^{-10} , 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} g / ml y / o en una cantidad de hasta 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} o 10^0 g / ml. El peso del agente biofarmacéutico en la solución puede determinarse por medios conocidos en la técnica per se, que incluyen p. ej., ensayos de proteínas. Los pesos mencionados anteriormente del agente biofarmacéutico también pueden expresarse como gramos de proteína por ml para determinarse en un ensayo de proteína adecuado (por ejemplo, el ensayo de Bradford; Zor y Selinger, 1996, Anal. Biochem. 236: 302-308).

En una realización preferida en la que el agente biofarmacéutico es el virus de la polio, la cantidad de virus de la polio en la solución preferiblemente es al menos 0,01, 0,1, 1,0 o 10 DU / ml y hasta 10.000, 1.000 o 100 DU / ml, en donde es definido 1 DU y determinado con un QC-ELISA como se describe en Westdijk et al. [6]. En una realización en la que el agente biofarmacéutico comprende un virus de la polio (vacuna) multivalente, se entiende que cada serotipo de la polio viral está presente en una cantidad de al menos 0,01, 0,1, 1,0 o 10 DU / ml y hasta 10.000, 1.000 o 100 DU / ml.

En una realización preferida en la que el agente biofarmacéutico es RSV, la cantidad de RSV en la solución preferiblemente es al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , TCID₅₀ / ml y hasta 1×10^{25} , 1×10^{20} , 1×10^{15} , 1×10^{12} , 1×10^{10} , 1×10^9 TCID₅₀ / ml, en el que el TCID₅₀ para RSV se define y determina como se describe en Widjoatmodjo et al. (2010, Virol J., 7: 114).

El aminoácido

El aminoácido en la solución a secar puede ser cualquier aminoácido D o L que sea farmacéuticamente aceptable. Dichos aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos estándar 'proteínógenos' o 'naturales' (histidina, alanina, isoleucina, arginina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, tirosina y serina), así como aminoácidos no naturales como p. ej. ornitina, citrulina, selenocisteína, taurina y pirrolisina. Preferiblemente, el aminoácido en la solución a secar es uno o más de glutamato, glutamina, arginina, histidina, asparagina, lisina, leucina y glicina, más preferiblemente uno o más de glutamato, arginina e histidina. La solución a secar puede comprender así una mezcla de aminoácidos. Los aminoácidos en la solución a secar pueden ser isómeros ópticos D o L o mezclas de los mismos, aunque preferiblemente los aminoácidos son isómeros L.

En una realización preferida, el aminoácido en la solución a secar es uno o más de L-glutamato, L-arginina y L-histidina. El L-glutamato también puede estar en forma de Na-glutamato, peptona, peptona no animal, peptona vegetal. La L-arginina también puede estar en forma de poli-L-arginina, peptona, peptona no animal, peptona vegetal. La L-histidina también puede estar en forma de Na-histidina. La L-lisina también puede estar en forma de poli-L-lisina.

En una realización particularmente preferida, el aminoácido en la solución a secar comprende glutamato. El glutamato puede ser uno o más de glutamato de sodio, glutamato de potasio, glutamato de amonio, diglutamato de calcio, diglutamato de magnesio y ácido glutámico. Más preferiblemente, el glutamato se disuelve en la solución en forma de glutamato monosódico (MSG).

Los aminoácidos están preferiblemente presentes en la solución a secar a una concentración en el intervalo de 0,01 - 20% (p/v), es decir, porcentaje en peso por volumen de la solución. Por lo tanto, preferiblemente, los aminoácidos están presentes en la solución a secar en una concentración de al menos 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 8,0, 9,0 o 9,5 % (p/v) o más y / o los aminoácidos están presentes en la solución a secar a una concentración de no más o menos el 20,0, 17,5, 15,0, 12,5, 11,0 o 10,5% (p/v). Lo más preferiblemente, los aminoácidos están presentes en la solución a secar a una concentración de aproximadamente 10% (p/v).

El poliol

El poliol en la solución a secar preferiblemente es un azúcar o alcohol de azúcar. Los azúcares preferidos incluyen sacarosa, trehalosa, manosa y dextrano. Los alcoholes de azúcar preferidos incluyen sorbitol, manitol y maltitol. Preferiblemente, la solución a secar comprende al menos uno o más de sorbitol, manosa, manitol y maltitol, más preferiblemente, al menos uno o más de sorbitol, manosa y manitol, aún más preferiblemente al menos uno o ambos de sorbitol y manitol. Lo más preferiblemente, la solución a secar comprende como poliol al menos sorbitol, opcionalmente en combinación con manitol.

En una realización, el poliol o polioles están presentes preferiblemente en la solución a secar a una concentración en el intervalo de 0,1 - 20% (p/v), es decir, un porcentaje en peso por volumen de la solución. Por lo tanto, preferiblemente, el poliol o polioles están presentes en la solución a secar a una concentración de al menos 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 8,0, 9,0 o 9,5% (p/v) o más, y / o el poliol o polioles están presentes en la solución a secar a una

concentración de no más o menos del 20,0, 17,5, 15,0, 12,5, 11,0 o 10,5% (p/v). Más preferiblemente, en esta realización, el poliol o polioles están presentes en la solución a secar a una concentración de aproximadamente 10% (p/v). Las concentraciones en esta realización son, p. ej., adecuadas cuando se usa el sorbitol como poliol.

- 5 En otra realización, el poliol o los polioles están presentes preferiblemente en la solución a secar a una concentración en el intervalo de 0,1 - 40% (p/v), es decir, un porcentaje en peso por volumen de la solución. Por lo tanto, preferiblemente, el poliol o los polioles están presentes en la solución a secar a una concentración de al menos 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 12,5, 15,0 18,0, 19,0 o 19,5% (p/v) o más, y / o el poliol o los polioles están presentes en la solución a secar a una concentración de no más o menos del 50,0, 40,0, 35,0, 30,0, 25,0, 22,5, 21,0 o 20,5% (p/v). Lo más preferiblemente, en esta realización, el poliol o los polioles están presentes en la solución a secar a una concentración de aproximadamente 40% (p/v). Las concentraciones en esta realización son, p. ej., adecuado cuando se usan dos polioles diferentes, como, p. ej., el sorbitol y el manitol. En ese caso, la relación en peso entre los dos polioles puede variar de 1: 100 a 1: 1, incluidos, p. ej., 1:50, 1:20, 1:10, 1:5 y 1: 2.

La sal metálica

- 15 La sal metálica disuelta en la solución a secar puede ser cualquier sal farmacéuticamente aceptable de un catión metálico divalente o monovalente. Los cationes divalentes preferidos son Ca^{++} , Mg^{++} y Zn^{++} , de los cuales Ca^{++} y Mg^{++} son más preferidos, y de los cuales Mg^{++} es el más preferido. Los cationes monovalentes preferidos son Li^+ , Na^+ y K^+ , de los cuales Li^+ , Na^+ son más preferidos y de los cuales el Li^+ es el más preferido de todos. El contra-anión en la sal metálica preferiblemente no es un aminoácido, preferiblemente no es glutamato ni aspartato. Más preferiblemente, el contra-anión en la sal metálica es un anión inorgánico. Los contraiones aniónicos (inorgánicos) preferidos son Cl^- , SO_4^{2-} y CO_3^{2-} , de los cuales Cl^- y SO_4^{2-} son los más preferidos, y de los cuales el Cl^- es el más preferido. La solución puede comprender mezclas de una o más de las sales metálicas anteriores.

- 20 La sal o sales metálicas están presentes preferiblemente en la solución a secar a una concentración en el intervalo de 0,005 - 10% (p/v), es decir, un porcentaje en peso por volumen de la solución. Por lo tanto, preferiblemente, las sales metálicas están presentes en la solución a secar a una concentración de al menos 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 o 4,5% (p/v) o más y / o la sal o sales metálicas están presentes en la solución a secar a una concentración de no más o menos 10,0, 8,0, 7,0, 6,0 o 5,5% (p/v). Lo más preferiblemente, la sal o sales metálicas están presentes en la solución a secar a una concentración de aproximadamente 5% (p/v).

- 25 Se entiende que en el caso de que el aminoácido en la solución a secar se disuelva en forma de una sal metálica del aminoácido, p. ej. MSG, la sal metálica de aminoácido no estará incluida en el porcentaje en peso de la sal o las sales metálicas sino en el porcentaje en peso de los aminoácidos, por lo que el peso del contra catión metálico estará incluido en el peso del aminoácido.

El tampón

- 30 La solución por secar tiene preferiblemente un pH neutro, p. ej. un pH en el intervalo de 6,0 - 8,0, o 6,5 - 7,5 o un pH de aproximadamente 7,0. La solución por secar comprende preferiblemente un tampón para mantener el pH entre los valores indicados. En principio, cualquier tampón farmacéuticamente aceptable, que preferiblemente tenga una capacidad de tamponamiento efectiva en el intervalo de los valores de pH que se indica, puede usarse en la solución a secar. El tampón está presente preferiblemente a una concentración en el intervalo de 0,5 - 100 mM, más preferiblemente en el intervalo de 1 - 50 mM y lo más preferiblemente en el intervalo de 2 - 20 mM, tal como, p. ej., aproximadamente 10 mM.

- 40 Los tampones adecuados para usar en la solución a secar incluyen el tampón Mcllvaine (véanse los ejemplos), un tampón citrato, un tampón fosfato, un tampón HEPES y un tampón histidina.

Agua

El agua usada para preparar la solución a secar preferiblemente es agua ultrapura y preferiblemente sin pirógenos, como el agua usada en las inyecciones.

- 45 Las concentraciones de ingredientes (por ejemplo, los excipientes) en la solución a secar de la invención generalmente se expresan en este momento como porcentaje en peso por volumen (p/v) de la solución. Esto se entiende como la relación de un soluto (por ejemplo, el excipiente) con el disolvente (por ejemplo, agua) expresado en gramos de soluto por litro de la solución total. Por ejemplo, 50 g de glucosa en 1 L de solución se considera una solución al 5% p/v.

- 50 En una realización preferida, la solución a secar consiste esencialmente en una composición del agente biofarmacéutico en una cantidad como se define anteriormente en el presente documento, 5 - 20% (p/v) de sorbitol, 5 - 20% (p/v) de glutamato monosódico, 2 - 10 % (p/v) de una sal de magnesio, preferiblemente MgCl_2 y / o MgSO_4 , opcionalmente 5 - 20% (p/v) de manitol, y opcionalmente 2 - 50 mM de un tampón farmacéuticamente aceptable que amortigüe la solución a un pH neutro como se indica en este momento.

- 55 El secado

En el método de la invención, la solución acuosa que comprende el agente biofarmacéutico se seca. Se puede usar cualquier método de secado conocido. Un método de secado puede ser, p. ej., el secado por pulverización, secado al aire, revestimiento, secado de espuma, desecación, secado al vacío, secado al vacío / congelación o liofilización, todos los cuales son conocidos por los expertos en la materia per se. En una realización preferida, el método de secado es secado al vacío o liofilización, de los cuales se prefiere el secado por congelación o la liofilización.

En una realización de un procedimiento de liofilización, la solución a secar preferiblemente se congela primero a una temperatura de liofilización inicial o de almacenamiento igual o inferior a -50°C, -40°C, -30°C, -20°C o -10°C. Una temperatura de almacenamiento inicial preferida es igual o inferior a -50°C o -40°C. La solución por secar puede someterse a una congelación rápida colocando inmediatamente (un recipiente / vial que contiene) la solución en el almacenamiento con una temperatura inicial de almacenamiento como se indicó anteriormente. Alternativamente, la solución a secar puede someterse a una congelación lenta colocando (un recipiente / vial que contiene) la solución en un almacenamiento con una temperatura superior a 0°C, p. ej. 2, 4 o 6°C, y luego congelando lentamente la solución a la temperatura de liofilización inicial como se indicó anteriormente, reduciendo la temperatura, preferiblemente a una velocidad de aproximadamente 0,5, 1 o 2°C por minuto. La solución por secar puede llevarse a una presión de 100 microbares o menos. Cuando se alcanza la presión establecida, la temperatura del almacenamiento puede aumentarse a temperaturas más altas. La temperatura de almacenamiento puede, p. ej., aumentarse a una velocidad de, p. ej., 0,05, 0,1 o 0,2°C por minuto a una temperatura de 5, 10 o 15°C por encima de la temperatura inicial de liofilización. La etapa de secado primario se termina preferiblemente cuando no se mide aumento de presión en la cámara. Preferiblemente, en ese momento, la temperatura del almacenamiento puede aumentarse a p. ej. 5, 10, 15, 20 o 25°C a una velocidad de p. ej. 0,01, 0,02 o 0,05°C por minuto y, opcionalmente, en uno o más pasos. Durante la fase de secado secundario, la temperatura se mantiene preferiblemente en este valor hasta que no se pueda detectar ningún aumento de presión más. Un procedimiento de liofilización preferido se describe en los Ejemplos de la presente memoria.

En una realización de un procedimiento de secado al vacío, la solución a secar preferiblemente está a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 5-25°C, p. ej., a temperatura ambiente o, más preferiblemente, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10-20°C, p. ej., a una temperatura de aproximadamente 15°C. Luego se reduce la presión, p. ej., a una presión de menos de 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05 mbar. Una vez alcanzada la presión reducida, la temperatura de la solución que se está secando puede reducirse a una temperatura que puede estar por debajo de 0°C pero que está (justo) por encima de la temperatura eutéctica de la solución para evitar la congelación de la solución. Cuando no se mida ningún aumento de presión en la cámara, la temperatura de la solución se puede aumentar a, p. ej., 5, 10, 15, 20 o 25°C a una velocidad de p. ej. 0,01, 0,02 o 0,05°C por minuto y, opcionalmente, en uno o más pasos. La temperatura se mantiene preferiblemente en este valor hasta que no se pueda detectar ningún aumento de presión más. Un procedimiento de secado al vacío preferido se describe en los Ejemplos de la presente memoria.

En un segundo aspecto, la descripción se refiere a una formulación secada o seca de un agente biofarmacéutico obtenible u obtenido en un método de acuerdo con la descripción como se describe anteriormente en el presente documento.

Los métodos de la invención para producir una formulación seca de un agente biofarmacéutico están dirigidos preferiblemente a minimizar la pérdida de actividad del agente biofarmacéutico tras el secado de la formulación. Preferiblemente, los métodos de la invención, así como las formulaciones en sí mismas, también tienen como objetivo minimizar la pérdida de actividad del agente biofarmacéutico tras el almacenamiento posterior de la formulación seca obtenible con los métodos de la invención. Por lo tanto, los métodos de la invención son preferiblemente métodos para producir formulaciones estables de agentes biofarmacéuticos, es decir, formulaciones con una vida útil larga o prolongada, preferiblemente en condiciones refrigeradas (p. ej. 2 - 10°C), a temperatura ambiente (p. ej. 18 - 25°C), o incluso a temperaturas elevadas (p. ej. 32 - 45°C) como puede ocurrir en regiones tropicales.

Se entiende que la pérdida de actividad o la inactivación de un agente biofarmacéutico incluye tanto la pérdida de actividad debido a vías químicas (como oxidación, hidrólisis o acción enzimática) como a vías físicas (como desnaturalización, agregación, gelificación). Preferiblemente, la pérdida de actividad del agente biofarmacéutico no excede el nivel aceptable. En otras palabras, al menos el nivel de actividad biológica o viabilidad y / o el nivel de función o estructura original suficiente para la aplicación terapéutica y / o diagnóstica comercial prevista del agente biofarmacéutico se retiene después del secado y / o almacenamiento posterior.

Dependiendo de la identidad del agente biofarmacéutico, los expertos sabrán qué ensayo utilizar para evaluar la actividad de dicho agente biofarmacéutico. La actividad del agente biofarmacéutico puede expresarse en función de su viabilidad, p. ej., en el caso de virus vivos activos, o la actividad puede expresarse como actividad enzimática o actividad biológica que puede determinarse en ensayos adecuados conocidos por los expertos. En otros casos, la actividad del agente puede relacionarse más bien con la integridad física y química del agente y puede determinarse evaluando la estructura y / o función de dicho agente biofarmacéutico. La estructura del antígeno se evalúa preferiblemente mediante análisis ELISA o Biacor. La estructura secundaria y terciaria se evalúa preferiblemente mediante espectroscopía UV, fluorescencia, infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y / o difracción circular (CD). La inmunogenicidad se evalúa preferiblemente mediante análisis in vivo usando modelos animales (por

ejemplo, ratones, ratas, ratas de algodón, hurones o conejos). Las ratas son, p. ej., un modelo preferido para el virus de la polio, y el género de roedores sigmodon es un modelo preferido para RSV.

En una realización preferida de los métodos de la invención, el secado de la solución (que se seca) hace que la formulación secada tras la rehidratación (preferiblemente inmediatamente) después del secado, retenga al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de la actividad biológica presente en la solución antes del secado. En el caso de que esté presente más de un agente biofarmacéutico en la formulación, la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes es preferiblemente menor del 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida de actividad se expresa como el porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, que se establece en 100%.

En otra realización preferida de la invención, la formulación seca retiene al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de la actividad biológica presente en la solución antes del secado, después del almacenamiento durante al menos una semana a 45°C y tras la rehidratación de la formulación seca. En el caso de que esté presente más de un agente biofarmacéutico en la formulación, la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes es preferiblemente menor del 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida de actividad se expresa como el porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, que se establece en 100%. Preferiblemente, los porcentajes de actividades retenidas después del almacenamiento como se indicó anteriormente también se retienen después del almacenamiento dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas, diez semanas o más a 37°C o a 45°C.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una formulación de un agente biofarmacéutico que se puede obtener o es obtenible por medio de un método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente en el presente documento para su uso como un medicamento. Para su uso como un medicamento, la formulación puede usarse como formulación seca o puede reconstituirse disolviendo la formulación seca, p. ej., usando agua como se definió anteriormente. La formulación se reconstituye preferiblemente a su volumen original, es decir, el volumen antes del secado. Preferiblemente, la formulación es una formulación para inducir una respuesta inmune (en un individuo) contra una enfermedad infecciosa o un tumor. Se entiende que el individuo o sujeto a quien se administran las formulaciones de la invención puede ser un ser humano pero también puede ser un animal, como un animal de granja o una mascota, que incluye, p. ej., mamíferos, aves, ganado, aves de corral, ganado, bovinos. Más preferiblemente, la formulación es una formulación para la vacunación contra una enfermedad infecciosa o tumor. Por lo tanto, la formulación es preferiblemente una formulación para la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa o tumor. En otra realización, la invención se refiere al uso de la formulación obtenible u obtenida en un método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para inducir la respuesta inmune, para la vacunación y / o para la prevención o tratamiento de un enfermedad infecciosa o tumor. En otra realización más, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune contra un agente infeccioso o tumor mediante la administración de una cantidad eficaz de la formulación a un sujeto que lo necesite. La respuesta inmune se induce preferiblemente contra un antígeno en el agente biofarmacéutico. El antígeno es preferiblemente un antígeno de un patógeno que causa la enfermedad infecciosa o un antígeno del tumor, o un antígeno que induce una respuesta inmune contra el patógeno o el tumor. El patógeno es preferiblemente un virus como se define en este momento anteriormente. La formulación de la invención se puede administrar con o sin reconstitución por vía intranasal, parenteral, intramuscular, subcutánea y / o transdérmica.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "una/uno" o "un" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "una/uno" o "un" significa generalmente "al menos uno".

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras.

Figura 1. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV del serotipo 1, 2 y 3 (experimento A). Se probó el efecto estabilizador de sacarosa (SUC), trehalosa (TREH), manitol (MAN), dextrano (DEX) y cloruro de sodio (NaCl).

Figura 2. Gráficos respuesta de la superficie que representan los porcentajes de recuperación de antígeno D de los tres serotipos directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV que contienen 10% de manitol y 0% de dextrano.

Figura 3. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 (experimento B). Se probó el efecto estabilizador de sacarosa (SUC), trehalosa (TREH), glutamato monosódico (MSG), hidroxietilalmidón (HES) y cloruro de sodio.

5 Figura 4. Recuperación del antígeno D directamente después del secado al vacío (V), de una liofilización con una velocidad de congelación lenta (L) y una liofilización con una velocidad de congelación rápida (S). Se investigó el efecto estabilizador de la sacarosa y la trehalosa, en comparación con la vacuna IPV sin la adición de estabilizadores (control negativo).

Figura 5. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV del serotipo 1, 2 y 3 como se indica (experimento C).

10 Figura 6. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 (experimento D). Todas las formulaciones contienen un 5% de sorbitol y NaCl 125 mM y, excluyendo D11-D16, 5% de peptona y son además como se indica.

15 Figura 7. Prueba de la estabilidad acelerada de formulaciones de IPV liofilizadas de serotipo 1, 2 y 3 como se indica (experimento D) según lo determinado por la recuperación del antígeno D después de una semana de incubación a 45°C.

Figura 8. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 como se indica (experimento E). Los efectos estabilizadores de sorbitol (SOR), sacarosa (SUC), manitol (MAN), glutamato monosódico (MSG), peptona (PEP) y $MgCl_2$ se probaron utilizando tasas de congelación rápidas (panel A) y lentas (panel B).

20 Figura 9. Estabilidad de las formulaciones de IPV liofilizadas de serotipo 1, 2 y 3 como se indica (experimento E) después de una semana de incubación a 45°C y utilizando velocidades de congelación rápidas (panel A) y lentas (panel B). Solo se muestran las formulaciones más prometedoras directamente después de la liofilización.

25 Figura 10. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 (experimento F, n = 3). El efecto estabilizador de la peptona se investigó en una formulación de IPV que contenía 10% de sorbitol, 10% de MSG y 5% de $MgCl_2$ con o sin 10% de manitol. Todas las formulaciones se congelaron rápidamente antes de la fase de secado del procedimiento de liofilización.

30 Figura 11. Estabilidad de las formulaciones de IPV liofilizadas de serotipo 1, 2 y 3 (experimento F, n = 3) después de una semana de incubación a 45°C. Este experimento investiga si es posible mejorar la formulación de IPV que contiene 10% de sorbitol, 10% de MSG y 5% de $MgCl_2$ con o sin 10% de manitol durante la estabilidad acelerada con la adición de peptona o aminoácidos únicos.

35 Figura 12. Recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 con diferentes componentes de tampón como se indica (experimento G). Cuatro formulaciones como se indica en los paneles A, B, C y D, todas conteniendo 10% de sorbitol, 10% de MSG y se analizaron con McIlvaine 10 mM, citrato 10 mM, histidina 10 mM, HEPES 10 mM y tampón fosfato 10 mM. La formulación de control no se dializó.

40 Figura 13. Estabilidad de formulaciones de IPV liofilizadas de serotipo 1, 2 y 3 con diferentes componentes de tampón como se indica (experimento G) después de la liofilización y posterior almacenamiento a 45°C durante una semana. Se probaron cuatro formulaciones, que contenían 10% de sorbitol, 10% de MSG y $MgCl_2$ sin o con manitol y sin o con peptona en combinación con tampones McIlvaine 10 mM, citrato 10 mM, histidina 10 mM, HEPES 10 mM y fosfato 10 mM. Las formulaciones de control no se dializaron y se diluyeron 1:1 con tampón McIlvaine que contenía los excipientes como se indica.

45 Figura 14. Recuperación de antígeno D directamente después del secado al vacío (V), liofilización con una velocidad de congelación lenta (L) y liofilización con una velocidad de congelación rápida (S). El efecto estabilizador de diferentes formulaciones en comparación con la vacuna IPV sin la adición de estabilizantes (control negativo) e IPV formulado con sacarosa o trehalosa.

Figura 15. Recuperación de antígeno D directamente después de la liofilización de las formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 como se indica.

Figura 16. Estabilidad de las formulaciones de IPV de serotipo 1, 2 y 3 como se indica después de la liofilización y posterior almacenamiento a 45°C durante una semana, según lo determinado por la recuperación del antígeno D.

50 Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1 Materiales

La vacuna de la polio inactivada trivalente (Salk-IPV), que contiene la cepa de Mahoney inactivada para el tipo 1, MEF para el tipo 2 y Saukett para el tipo 3, se obtuvo del departamento de desarrollo de procesos de RIVM-Vaccinology (Bilthoven, Países Bajos). El volumen trivalente de Salk-IPV (10x) se formuló como una dosis concentrada de 40-8-32 DU / dosis humana única diez veces (1 ml). La concentración del volumen de IPV 05-126B que se usó en este estudio se determinó a 411-90-314 DU / ml con el QC-ELISA según lo descrito por Westdijk et al. [6].

Los excipientes sacarosa, D-sorbitol, D-trehalosa dihidrato, D-glucosa monohidrato, manitol, monohidrato de sal monosódica de L-glutámico (denominado glutamato, glutamato de sodio, glutamato monosódico o MSG en este documento), mioinositol, D-rafinosa, hidroxietil almidón, glicina, L-prolina, L-leucina, cloruro de calcio dihidrato, maltitol, cloruro de magnesio hexahidrato, cloruro de litio y ovoalbúmina se compraron en Sigma (St. Louis, MO). La peptona (vegetal), dextrano (6 kDa, de *Leuconostoc ssp*), L-histidina, L-alanina, cloruro de zinc, lactobionato de calcio monohidrato provenían de Fluka (Buchs, Suiza). El lactitol (Lacty®-M) se compró en Purac Biochem (Gorinchem, Países Bajos), L-arginina (EP, de origen no animal) y Tween80 en Merck (Darmstadt, Alemania), la polivinilpirrolidona 25 (PVP, 29 kDa) en Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg, Alemania), Sol-U-Pro, una gelatina porcina hidrolizada, en Dynagel Inc. (Calumet City, IL) y Ficoll en Pharmacia (Uppsala, Suecia). Como componentes tampón se usaron dihidrógeno fosfato de sodio dihidrato (NaH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) y EDTA de Merck. El dihidrato de citrato trisódico, ácido cítrico y HEPES provenían de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y el dihidrato de hidrógeno-fosfato disódico (Na_2HPO_4) de Fluka (Buchs, Suiza). Todos los excipientes utilizados fueron de calidad de reactivo o de grado superior.

Para preparar el tampón McIlvaine 10 mM, se añadió ácido cítrico 10 mM a Na_2HPO_4 10 mM en una relación de 1: 6 y un valor de pH de 7,0. Para el tampón de citrato 10 mM, los componentes dihidrato de citrato trisódico (10 mM) y ácido cítrico (10 mM) se mezclaron hasta alcanzar un pH de 7,0. El tampón fosfato 10 mM de pH 7,0 consistió en KH_2PO_4 10 mM y Na_2HPO_4 10 mM. Los tampones HEPES 10 mM e histidina 10 mM se prepararon pesando y disolviendo los componentes del tampón seguido de un ajuste del valor de pH a 7,0 usando HCl y / o NaOH.

1.2 Métodos

1.2.1 Diálisis

A menos que se indique lo contrario, el material a granel trivalente de IPV se dializó contra tampón McIlvaine 10 mM (pH 7,0) usando un casete de diálisis de membrana de celulosa regenerada de baja unión de límite de peso molecular de 10 kDa (Slide-A-Lyzer®, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL) para reemplazar los componentes del búfer del volumen de IPV (medio M199).

1.2.2 Soluciones a secar

Todos los excipientes se disolvieron en tampón McIlvaine a una concentración doble de la concentración final indicada. El IPV dializado se mezcló igualmente con la formulación a analizar. Posteriormente, se llenaron viales de inyección de vidrio de 2 ml (Müller + Müller, Holzminden, Alemania) con 0,2 ml de mezclas de excipientes de IPV y se les proporcionaron taponos de goma previamente secados (durante la noche a 90°C) de 13 mm (tipo V9250 de Helvoet Pharma, Alken, Bélgica).

1.2.3 Procedimiento de liofilización y secado al vacío.

Para la liofilización, los viales rellenos y medio taponados se cargaron en una liofilizadora Leybold GT4 o en un sublimador de liofilización piloto / laboratorio Zirbus 2-3-3 a una temperatura de almacenamiento de -50°C, o en un almacenamiento de 4°C y luego se congeló a -50°C reduciendo la temperatura a una velocidad de 1°C / min, que se indica como congelación rápida y lenta, respectivamente. Los viales se mantuvieron a una temperatura de -50°C durante 2 h. Para la fase de secado primario, la temperatura de almacenamiento aumentó a 0,1°C / min a -45°C, luego a 0,02°C / min a -40°C, seguido de una incubación durante 42 h. La fase de secado secundario se realizó mediante un aumento adicional de la temperatura del almacenamiento a 0,02°C / min a 10°C, seguido de 8 h durante la incubación a 10°C. A partir de entonces, la temperatura de almacenamiento aumentó a 0,02°C / min a 25°C.

Para el secado al vacío, los viales llenos y a medio taponar se cargaron en una unidad sublimadora de secado por congelación Zirbus 2-3-3 a una temperatura de 15°C y se mantuvieron a esa temperatura durante 10 minutos. La presión de la cámara se redujo hasta 1 mbar en incrementos de 15 minutos con diferentes velocidades (1 mbar/min, 0,3 mbar/min, 0,1 mbar/min) y comenzando a una presión de la cámara de 25 mbar. La temperatura disminuyó hasta -10°C durante 1 hora a 0,05 mbar y durante 1 hora a 0,03 mbar, lo que dio como resultado la falta de congelación de las formulaciones (temperatura del producto por encima de la temperatura eutéctica de las formulaciones). Posteriormente, la temperatura de almacenamiento se incrementó a 0,05°C / min a 30°C. Al final del ciclo, los viales se cerraron en vacío, se sellaron con tapas de aluminio y se mantuvieron a 4°C hasta el análisis. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de las temperaturas de almacenamiento y las presiones de la cámara durante el procedimiento de secado al vacío.

Tabla 1

	T _{almacenamiento} (°C)	Periodo (min)	Presión (mbar)
FT01	15	10	-
D01	15	15	25
D02	15	15	10
D03	15	15	5
D04	15	15	3
D05	15	15	1
D06	-10	60	0,05
D07	-10	60	0,03
D08	-5	120	0,03
D09	5	120	0,03
D10	10	120	0,03
P01	20	240	-
P02	30	240	-
P03	4	60	-

1.2.4 ELISA de antígeno D

- 5 Las placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con suero antipoliomielítico bovino específico de serotipo (RIVM, Bilthoven, Países Bajos). Después de lavar con Tween20 al 0,1% en PBS (tampón de lavado), se agregaron diluciones dobles de un estándar de referencia de IPV y una dilución única de formulaciones de IPV diluidas en tampón de ensayo (PBS con Protifar al 0,5% y Tween20 al 0,1%) (100 µl / pocillo, por duplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación suave, se lavaron abundantemente y una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón específicos de serotipo (mab 3-4-E4 (tipo 1), 3-14-4 (tipo 2), 1-12-9 (tipo 3), todos de RIVM, Bilthoven, Países Bajos) y se añadió IgG anti-ratón marcada con HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos bajo agitación suave. Las placas se lavaron ampliamente y se añadió reactivo de señalización ELISA HighLight de (Zomerbloemen BV, Zeist, Países Bajos) y se midió la quimioluminiscencia durante 10-15 minutos usando un luminómetro (Berthold Centro LB960).

15 1.2.5 Análisis del contenido de humedad

- 20 El contenido de agua se determinó utilizando un titulómetro colorimétrico Karl Fischer (medidor de humedad modelo CA-06, Mitsubishi). El principio de la determinación de residuos de agua por el método de Karl Fischer se basa en el hecho de que el yodo y el dióxido de azufre solo reaccionan en presencia de agua. Las muestras se pesaron y posteriormente se reconstituyeron en el reactivo Karl-Fischer, Hydranal Coulomat A (Fluka, Buchs, Suiza). La muestra reconstituida se extrajo en una jeringa y se inyectó en el recipiente de titulación. Cada vial se midió por triplicado. Los viales vacíos se pesaron y el contenido de agua se calculó en función del contenido de agua medido por el titulador, el peso del producto liofilizado en el vial, el volumen de reconstitución del reactivo, el volumen de titulación y el contenido de agua de la titulación en blanco.

1.2.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

- 25 El comportamiento termodinámico de las formulaciones se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC), un método que mide las temperaturas y el flujo de calor, asociado con las transiciones de fase en los materiales, en función del tiempo y la temperatura. Las formulaciones liofilizadas se llenaron en una bandeja DSC de aluminio y se sometieron a un programa de temperatura controlada en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA

Instruments). La muestra se calentó de 0°C a 150°C a una velocidad de calentamiento de 20°C / min y la cámara de muestra se purgó con gas nitrógeno (50 ml / min). Las temperaturas de transición vítrea (T_g) se determinaron como el punto medio de las discontinuidades en las curvas de flujo de calor utilizando un software (Universal Analysis 2000, TA Instruments).

5 2. Resultados

2.1 Estabilización de diferentes subtipos de IPV durante la liofilización

En el primer experimento (Experimento A), se evaluaron cuatro azúcares / polioles estabilizantes habituales (sacarosa, trehalosa, manitol y dextrano), así como cloruro de sodio para determinar su potencial estabilizante (Figura 1). El estudio se estableció con un enfoque de diseño de experimentos para obtener una formulación óptima para la liofilización de IPV.

Se liofilizaron diferentes formulaciones de IPV como se describe anteriormente (sección 1.2.3). Las tortas liofilizadas se reconstituyeron agregando una cantidad igual de agua como el volumen inicial y la recuperación del antígeno D se determinó mediante un ELISA (sección 1.2.4). Las recuperaciones se mostraron como los porcentajes del contenido de antígeno D en las formulaciones líquidas, que se midieron antes de la liofilización.

La formulación trivalente de IPV, sin ningún aditivo, IPV 1: 1 diluido con tampón McIlvaine, mostró recuperaciones <10% para todos los serotipos después de la liofilización (Figura 1; A1). El IPV tipo 2 demostró ser el serotipo más estable en todas las formulaciones con recuperaciones máximas de antígeno D de $\pm 80\%$. El dextrano parecía tener un efecto negativo en la recuperación del antígeno D de las formulaciones de IPV liofilizadas, especialmente para los tipos 1 y 3. Los mejores resultados, con recuperaciones máximas de $\pm 55\%$, $\pm 85\%$ y $\pm 50\%$ para los serotipos 1, 2 y 3 respectivamente, se obtuvieron con formulaciones que contenían sacarosa y / o trehalosa en combinación con manitol (Figura 1; formulaciones A3, A4, A12 y A16). La adición de NaCl no tuvo un efecto positivo en la recuperación de IPV después de la liofilización.

Este primer experimento piloto muestra claramente la complejidad de liofilizar una vacuna de la polio trivalente en la que cada serotipo de IPV prefiere sus propios agentes estabilizadores. En una formulación con 10% de manitol, el tipo 1 y el tipo 3 prefirieron la presencia de altas concentraciones de sacarosa sin trehalosa, mientras que el tipo 2 prefirió una alta concentración de trehalosa sin sacarosa (Figura 2).

En el siguiente experimento (Experimento B) se investigó el potencial estabilizador de una mezcla de glutamato, un sacárido y un polímero. Se investigaron diferentes combinaciones de los excipientes sacarosa, trehalosa, glutamato monosódico (MSG), hidroxietilalmidón (HES) y NaCl. La liofilización de IPV trivalente con formulaciones basadas en MSG junto con disacárido, sacarosa y / o trehalosa, mostró recuperaciones del antígeno D de 50-60%, 70-95% y 50-65% para los tres serotipos, respectivamente (Figura 3; formulaciones B4, B7, B9, B12, B13). Las formulaciones basadas solo en HES al 8% o NaCl 63 mM no protegieron el IPV durante la liofilización (Figura 3; B5 y B10). La adición de NaCl a una formulación con sacarosa mostró un aumento del 5-10% en la recuperación del antígeno D después de la liofilización (Figura 3; B2 y B16).

35 2.2 Impacto del procedimiento de secado y formulación.

En la siguiente prueba se muestran los resultados de las formulaciones típicas utilizadas para el secado de productos biofarmacéuticos en relación con el procedimiento de secado. Las formulaciones que contenían IPV trivalente se secaron al vacío (un método de secado sin congelación), liofilización utilizando una etapa de congelación rápida (colocación directa del producto en almacenamientos preenfriados de -50°C) y liofilización utilizando una etapa de congelación lenta (colocación del producto en almacenamiento a 4°C y congelación a -50°C). Como se muestra en la Figura 4, formulaciones estándar, p. ej., a base de sacarosa o trehalosa, protegen parcialmente el IPV después del secado al vacío. Sin embargo, estas formulaciones no protegen al liofilizar.

2.3 Cribado de excipientes

En el siguiente experimento (Experimento C) se probaron diferentes formulaciones que contenían sorbitol, manitol, sacarosa y / o MSG combinados con algunos aminoácidos, proteínas / péptidos u otros agentes estabilizantes (Tabla 2). Para investigar el efecto de la sal en la formulación de IPV liofilizada, las formulaciones en C también se probaron con la adición de NaCl 125 mM. No se observó ningún efecto claro del NaCl sobre las recuperaciones de antígeno D (datos no mostrados). Al observar por primera vez los resultados de antigenicidad directamente después de la liofilización, quedó claro que la formulación C13, que contenía 5% de sorbitol, 5% de peptona y 1% de cloruro de litio (LiCl), mostró las mayores recuperaciones para todos los serotipos; $\pm 85\%$, $\pm 100\%$ y $\pm 85\%$ para los tipos 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 5). La sustitución del compuesto de LiCl en MgCl₂ al 1,8% resultó en una disminución de $\pm 5\%$ $\pm 20\%$ y 15% en la recuperación del antígeno D para los tres serotipos. Sin embargo, estas formulaciones mostraron contenidos relativamente altos de humedad residual, 2,1% para la formulación que contiene MgCl₂ y 6,2% para la formulación con LiCl. La adición de una cantidad muy pequeña de tensioactivo Tween 80 a una formulación que contiene sacarosa, trehalosa y los aminoácidos glicina y lisina aumentó las recuperaciones de antígeno D en un 5-15% (Figura 5; C8, C9). Las formulaciones basadas en sorbitol, manitol y MSG (C2, C3, C4 y C7) mostraron recuperaciones de más del 65%, 80% y 70% para los tipos 1, 2 y 3, respectivamente.

En este estudio, la combinación de sorbitol, peptona y las sales LiCl o MgCl₂ parecía tener un efecto positivo en la recuperación del antígeno D directamente después de la liofilización de IPV. Otra formulación notable es la mezcla de sorbitol, manitol y MSG, que mostró que la presencia de polioles en combinación con MSG estabiliza el IPV durante la liofilización.

- 5 Se midió la temperatura de transición vítrea de las formulaciones liofilizadas (Tabla 2), pero no mostró ninguna relación clara con las recuperaciones del antígeno D. Las formulaciones que contenían ovoalbúmina y peptona mostraron las temperaturas de transición vítrea más altas.

Tabla 2. Composición de las formulaciones de IPV liofilizadas (Experimento C). El contenido de humedad residual (RMC) fue determinado por Karl Fischer y la T_g de la torta seca por DSC.

	SOR	MAN	SUC	MSG	Azúcares/polioles	Aminoácidos	Proteínas	Otros	RM C (%)	T _g (°C)
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	n.d.
C2	7%	7%	-	2%	-	2% de Glicina	7% de Ovoalbúmina	-	0,3	37,2
C3	7%	7%	-	2%	-	2% de Glicina	7% de Ovoalbúmina	EDTA 1 mM	nd	38,3
C4	7%	7%	-	2%	-	2% de Glicina	-	-	1,9	53,5
C5	-	-	3%	-	3% de Dextrano 3% de Mio-Inositol	-	3% de Ovoalbúmina	-	1,1	54,9
C6	5%	5%	5%	-	-	2% de Glicina 3% de Lisina 3% de L-Arg	-	-	1,0	37,1
C7	5%	5%	5%	3%	-	2% de Glicina 3% de Lisina	-	-	3,3	37,2
C8	-	-	5%	-	5% de Trehalosa	3% de Lisina 3% de Alanina	-	-	0,5	32,3
C9	-	-	5%	-	5% de Trehalosa	3% de Lisina 3% de Alanina	-	0,01% de Tween80	0,5	34,1
C10	-	-	5%	-	-	3% de Lisina 3% de Alanina	-	3% de Ca-Lactobionato	1,0	31,2
C11	-	-	5%	-	-	3% de Lisina 3% de Alanina	3% de Rec. de Gelatina	-	0,3	35,7
C12	5%	-	-	-	-	-	5% de peptona	1,8% de MgCl ₂	2,1	44,7
C13	5%	-	-	-	-	-	5% de peptona	1% de LiCl	6,2	nd
C14	-	-	5%	-	5% de Trehalosa	-	5% de Peptona	-	0,5	35,6

10

En base a estos hallazgos, se diseñó un nuevo experimento de detección (Experimento D). Dado que las recuperaciones más prometedoras se obtuvieron con formulaciones basadas en sorbitol, peptona y cloruro de Mg o

litio, se diseñó un experimento basado en sorbitol al 10%, peptona al 5% y NaCl 125 mM. La ovoalbúmina se desechó ya que es de origen animal, por lo tanto, un excipiente indeseable en una vacuna para uso humano. Para obtener más información sobre el mecanismo estabilizador de IPV de varios excipientes, las formulaciones que contenían 10% de sorbitol, 5% de peptona y NaCl 125 mM se combinaron con un azúcar / poliol, un aminoácido (en lugar de 5% de peptona), una sal u otros agentes estabilizantes, como tensioactivos o proteínas. La formulación con sorbitol, NaCl e histidina al 1% mostró recuperaciones del 90-100% directamente después del procedimiento de liofilización (Figura 6; D11). Como se observó anteriormente, la formulación que contenía $MgCl_2$ mostraba una capacidad estabilizadora propicia durante la liofilización, que fue similar para las formulaciones de IPV que contenían cloruro de calcio ($CaCl_2$) y cloruro de litio ($LiCl$) (Figura 6; D17-19). Durante la fase de selección, se evaluó la estabilidad acelerada para seleccionar los excipientes en función de su capacidad para proporcionar también un producto liofilizado estable, incluso después del almacenamiento posterior a altas temperaturas.

2.4 Prueba de estabilidad acelerada

Aunque algunas formulaciones mostraron recuperaciones aceptables del antígeno D directamente después de la liofilización, después de una semana de incubación a 45°C, las recuperaciones del antígeno D de estas cuatro formulaciones se redujeron hasta porcentajes inferiores al 30%, 60% y 10% para los serotipos 1, 2 y 3, respectivamente. (Figura 7). La formulación con 5% de mioinositol representó las mayores recuperaciones después de la incubación a 45°C, pero aún se observaba una disminución de $\pm 40\%$, 10% y 30% para los tres serotipos, que mostraron nuevamente que el IPV tipo 2 era el serotipo más estable (Figura 7; D5). Tras una semana de almacenamiento a 45°C, la formulación que contenía 1% de lactitol mostró una disminución de menos del 10% en la recuperación de antígeno D para el serotipo 2, desafortunadamente los serotipos 1 y 3 mostraron una disminución de $> 30\%$ (Figura 7; D7).

Para investigar más a fondo la combinación con sorbitol, manitol, MSG y el potencial estabilizador de la peptona y el $MgCl_2$, se realizó un nuevo diseño de configuración experimental para determinar la relación entre los diferentes excipientes y la recuperación del antígeno D después de la liofilización. Las siguientes variables se incluyeron en el Experimento E: 0/10% de sorbitol, 0/10% de sacarosa, 0/10% de manitol, 0/10% de MSG, 0/5% de peptona y / o 0/5% de $MgCl_2$ y la velocidad de congelación fue investigada en este experimento. Una congelación lenta significa que los viales se colocaron en almacenamientos a 4°C y que, posteriormente, se enfriaron hasta -50°C a una velocidad de 0,1°C / min, donde una congelación rápida significa que los viales se colocaban directamente en almacenamientos preenfriados a -50°C. Los resultados se muestran en la Figura 8A para una velocidad de congelación rápida y en la Figura 8B para una velocidad de congelación lenta.

Al echar un primer vistazo a las recuperaciones del antígeno D después de la liofilización, las formulaciones congeladas rápidamente que contenían MSG y $MgCl_2$ en combinación con un azúcar / poliol mostraron las recuperaciones más altas de $\pm 80 - 90\%$ para todos los serotipos (Figura 8A; E22-24, E29-32). Para las muestras congeladas lentamente, las formulaciones que contenían $MgCl_2$ mostraron recuperaciones del 75 - 90% para los tipos 1 y 3 (Figura 8B; E54-57, E63-66). Sin embargo, para el serotipo 2, solo las formulaciones de los azúcares en combinación con la peptona mostraron recuperaciones de $\pm 70\%$ (Figura 8B, E43-48). Para tener una indicación de la reproducibilidad de la formulación experimental H33 y H66 se probaron por triplicado y mostraron desviaciones estándar $<10\%$ para todos los serotipos. De la comparación de las recuperaciones del antígeno D de estas dos formulaciones, directamente después de la liofilización (Figura 8) o después de una semana de incubación a 45°C (Figura 9), está claro que la velocidad de congelación no influía significativamente en la recuperación de estas formulaciones IPV.

El experimento E se creó sobre la base de un "diseño del experimento" que utilizaba el software "Modde" de Umetrics. Además de la recuperación del antígeno D después de la liofilización, también se utilizaron recuperaciones después de una liofilización y un almacenamiento posterior a 37°C o 45°C como resultado en el diseño. El resultado en función de las formulaciones se moduló y se puso en un modelo usando Modde. Esto reveló qué los parámetros de formulación afectaban a la recuperación después de la liofilización y el almacenamiento (datos no mostrados).

Los parámetros de formulación más importantes para cada uno de los subtipos virales se resumen en las Tablas 3 - 5.

Tabla 3	Recuperación del antígeno D tipo 1		
Parámetro de formulación	% después de la liofilización	% después del almacenamiento a 37°C	% después del almacenamiento a 45°C
MSG	9	10	7
Sorbitol	8	6	4
$MgCl_2$	7	6	3
Peptona		6	4

Manitol	4	6	
MSG* MgCl ₂	4		

Tabla 4	Recuperación del antígeno D tipo 2		
Parámetro de formulación	% después de la liofilización	% después del almacenamiento a 37°C	% después del almacenamiento a 45°C
MSG	7	9	9
Sorbitol	7	7	5
MgCl ₂			
Peptona		10	10
Manitol	3	4	4
Sacarosa			2

Tabla 5	Recuperación del antígeno D tipo 3		
Parámetro de formulación	% después de la liofilización	% después del almacenamiento a 37°C	% después del almacenamiento a 45°C
MSG	14	10	10
Sorbitol	8	7	7
MgCl ₂	4	4	4
Peptona	4	12	12
Manitol	6	5	5
Sacarosa	4	1	1
MSG* MgCl ₂	5	5	

2.5 Sustitución de la peptona

- 5 Dado que la peptona parecía estabilizar el IPV liofilizado durante el almacenamiento posterior a una temperatura de 45°C, se realizó un experimento para investigar el papel de la peptona en una formulación con 10% de sorbitol, 5% de MSG y 5% de MgCl₂ y la misma formulación combinada con 10% de manitol. No se encontraron diferencias significativas con la adición de 10% de manitol a la formulación que contenía sorbitol, MSG y MgCl₂. Agregar peptona al 5% no afectó a la antigenicidad de ambas formulaciones (Figura 10).
- 10 Para averiguar si la adición de aminoácidos individuales podía comportar el papel estabilizador de la peptona durante el almacenamiento posterior del IPV liofilizado, se agregaron aminoácidos a la formulación que contenía sorbitol, MSG y MgCl₂ con o sin manitol. Después de una semana de incubación a 45°C, ni la peptona ni ninguno de los aminoácidos añadidos mostraron una estabilidad mejorada de la recuperación del antígeno D en comparación con la formulación de control, que contenía 10% de sorbitol, 10% de MSG y 5% de MgCl₂ (Figura 11, F1.0-F1.5). En
- 15 presencia de manitol, la capacidad estabilizadora de la peptona solo se mostró para el tipo 3, mientras que la recuperación del antígeno D mejoró con $\pm 15\%$ en comparación con la muestra de control. Sin embargo, se encontró una disminución significativa de la recuperación ($p < 0,001$) para el tipo 1 y, aunque no fue significativa, el tipo 2 también mostró una recuperación menor de $\pm 10\%$ (Figura 11; F2.0, F2.1). Para todas las formulaciones que
- 20 contenían sorbitol, MSG y MgCl₂, se mostró una disminución de $\pm 10\%$ del contenido del antígeno D tipo 2 después de una semana a 45°C, en la que se encontró que la adición de manitol era estable para el tipo 2 durante una estabilidad acelerada. La arginina pareció tener un potencial estabilizador en una formulación (Figura 11, F2.3) con sorbitol, MSG, MgCl₂ y manitol, y mostró solo una disminución de $\pm 15\%$ y $\pm 30\%$ en la recuperación del antígeno D para los tipos 1 y 3, respectivamente, después de la incubación a 45°C. Esto fue comparable a la estabilización por casi la misma formulación con peptona en lugar de arginina (Figura 11, F2.1).

Debido al hecho de que un excipiente indefinido, como la peptona, no se prefiere en una vacuna humana, se investigó un posible sustituto de la peptona, que podría estabilizar el IPV durante el almacenamiento. El análisis por espectrometría de masas y HPLC mostró los aminoácidos más abundantes presentes en la peptona (datos no mostrados). La adición de varios aminoácidos individuales a la formulación que contenía sorbitol, MSG y MgCl_2 no mejoró la estabilidad a 45°C en comparación con la formulación de control. Cuando la peptona parecía estabilizar el serotipo 3 en la formulación con sorbitol, MSG, MgCl_2 y manitol, la arginina podía mejorar la estabilidad de los serotipos 1 y 3. El serotipo 2 ya mostró en la formulación de control el mantenimiento completo de la recuperación del antígeno D durante la estabilidad acelerada. Aunque la composición exacta de la peptona es difícil de determinar, la cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase inversa con peptona no hidrolizada versus la hidrolizada químicamente mostró que la peptona consistía en aminoácidos y péptidos individuales, sin embargo > 90% p / p de la peptona permaneció indefinido. Dado que la peptona parecía aumentar la temperatura de transición vítrea de las formulaciones de IPV estudiadas, sería posible reemplazar la peptona por un excipiente con una T_g alta, como la sacarosa o la trehalosa.

Tabla 7. Las temperaturas de transición vítrea (T_g' y T_g) de las formulaciones de IPV que contenían sorbitol, MSG y MgCl_2 con / sin manitol se determinaron por DSC. Se investigó el efecto de la peptona sobre la transición vítrea de estas formulaciones. Se muestran mediciones individuales.

	10% de sorbitol +10% de MSG + 5% de MgCl_2		10% de sorbitol +10% de MSG + 5% de MgCl_2 + 10% de manitol	
	T_g' (°C)	T_g (°C)	T_g' (°C)	T_g (°C)
Control	-47,9	35,2	-44,4	38,8
+ 5% de peptona	-44,1	39,8	-42,8	48,7

El experimento anterior no produjo ningún sustituyente apropiado para sustituir a la peptona y mostró que las formulaciones con sorbitol, MSG, MgCl_2 con o sin manitol daban los mejores resultados, incluso después de realizar pruebas de estabilidad aceleradas. Durante este estudio, todas las formulaciones se prepararon con tampón McIlvaine, que se sabe que es un tampón adecuado para la liofilización de IPV [52]. Con el fin de optimizar aún más la formulación, se realizó un cribado de tampones con tampones que se utilizaban con frecuencia para la liofilización de productos biofarmacéuticos [18]. Los lotes de IPV en cada tampón se prepararon por diálisis y el IPV no dializado actuó como control.

La formulación con sorbitol, MSG y MgCl_2 mostró recuperaciones de $\pm 95\%$, $\pm 85\%$ y $\pm 90\%$ para los tres serotipos directamente después de la liofilización (Figura 12A; G1.0-G1.5). Después de la adición de peptona, las recuperaciones del antígeno D tipo 1 y 3 se redujeron con 10-15%, donde el tipo 2 mostró recuperaciones similares en comparación con la formulación sin peptona (Figura 12B). El tampón McIlvaine mostró recuperaciones 10-15% menores para el serotipo 2 en comparación con los otros componentes del tampón. El tampón de histidina pareció aumentar el rendimiento del antígeno D de IPV después de la liofilización de la formulación de IPV con sorbitol, MSG y MgCl_2 (recuperaciones > 95% para los tipos 1 y 3; Figura 12A, G1.3). Después de la liofilización, se alcanzó una recuperación del antígeno D del 88% para el tipo 2 con el tampón fosfato, donde el tampón McIlvaine mostró una recuperación del 73% para el tipo 2 (Figura 12A, G1.5).

La adición de manitol a las formulaciones de sorbitol, MSG, MgCl_2 sin peptona reveló que el serotipo 2 prefiere la presencia de manitol en la formulación durante la liofilización, ya que se encontraron recuperaciones del 85-100% para el tipo 2 (Figura 12C). Para el tipo 1 se encontraron recuperaciones del 80-90% y para el tipo 3 $\pm 80\%$ para las formulaciones de IPV que contenían sorbitol, MSG, MgCl_2 y manitol. La adición de peptona mostró una reducción de $\pm 10\%$ en la recuperación de los tipos 1 y 3 y contenidos de antígeno D similares para el tipo 2 después de la liofilización (Figura 12D).

2.6. El efecto de los componentes del tampón

Un experimento de estabilidad acelerada mostró diferencias dependientes de la formulación entre los tampones usados. Mientras que las formulaciones de control mostraban altas recuperaciones directamente después de la liofilización, se encontraron recuperaciones de $\pm 40\%$, $\pm 50\%$ y $<15\%$ para los serotipos 1, 2 y 3, respectivamente, para las formulaciones de control sin peptona después de una semana de incubación a 45°C (Figura 13; G1.0 y G3.0). Para las formulaciones de control, la peptona mostraba una clara mejoría en la estabilidad de los tipos 1 y 2 cuando el tipo 3 mostraba una disminución de $\pm 25\%$ y $\pm 15\%$ en la recuperación del antígeno D, en lugar de > 90% y 80%, respectivamente para las formulaciones sin y con manitol después del almacenamiento a 45°C (Figura 13; G2.0 y G4.0). Para la formulación con sorbitol, MSG y MgCl_2 , las mayores recuperaciones se observaron con tampón HEPES, contenido de antígeno D de $\pm 80\%$, $\pm 85\%$ y $\pm 60\%$ para los tres serotipos después de la liofilización y el almacenamiento. Esto significa que solo se produce una reducción del 10%, 0% y $\pm 30\%$ en la recuperación del antígeno D durante las pruebas de estabilidad acelerada para los tipos 1, 2 y 3, respectivamente. Solo para el tipo 3

se observaba un mejor resultado con el tampón citrato; una reducción de $\pm 20\%$ y se mantenía la recuperación del 79% (Figura 13A; G1.2). La adición de peptona mostró recuperaciones generales de 15-25% más bajas para todos los serotipos en comparación con la misma formulación y tampón sin peptona (Figura 13A). La estabilidad mejorada obvia se mostró con la adición de peptona a la formulación con sorbitol, MSG, MgCl_2 y manitol. Cuando las diferentes formulaciones de tampones sin peptona mostraban recuperaciones máximas de $\pm 55\%$, $\pm 75\%$ y $\pm 45\%$, los mismos tampones con peptona mostraban recuperaciones de $\pm 50\%$, $\pm 80\%$ y $\pm 55\%$ (Figura 13B). La formulación basada en tampón fosfato con los excipientes sorbitol, MSG, MgCl_2 , manitol y peptona demostró ser la formulación más estable con recuperaciones reducidas a $\pm 30\%$ para el tipo 1 y solo $\pm 10\%$ para el tipo 2 y 3 después de la incubación a 45°C.

2.7. Formulaciones adecuadas para la estabilización independientemente del método de secado

La Figura 14 muestra que solo las formulaciones que contenían sorbitol pueden resistir las tensiones causadas por los diferentes métodos de secado. Esto podría mejorarse aún más mediante la inclusión de MSG y MgCl_2 (especialmente el tipo 3), dando como resultado formulaciones que proporcionan recuperaciones comparables o incluso mayores que el secado al vacío con trehalosa o sacarosa. De los resultados anteriores (Experimento E) se concluye que las formulaciones basadas en sorbitol, MSG y MgCl_2 poseen la mejor recuperación después de las pruebas de estabilidad aceleradas.

2.8. Formulaciones sin peptona

Una de las mejores formulaciones sin peptona que se encontró en los experimentos anteriores es una formulación que contenía 10% de sorbitol + 10% de MSG + 5% de MgCl_2 . En un experimento adicional se evaluó cuál era el impacto de los excipientes primarios en esta formulación. Los resultados se compararon con 2 formulaciones estándar basadas en sacarosa y trehalosa. Los resultados directos después de la liofilización se muestran en la Figura 15. De la Figura 15 se concluye que, principalmente, el sorbitol es el responsable de la recuperación de IPV después de la liofilización, especialmente para los subtipos 1 y 2. La combinación de MSG y MgCl_2 muestra una estabilización significativa de los tres subtipos de IPV. En comparación con el sorbitol solamente, la combinación de sorbitol, MSG y MgCl_2 mostró las mejores recuperaciones después de la liofilización, especialmente para el tipo 3.

Tras la evaluación acelerada de la estabilidad como se muestra en la Figura 16, la mayoría de las formulaciones mostró una enorme disminución en la recuperación, también la formulación con solo sorbitol. Sin embargo, las formulaciones que contenían 10% de sorbitol + 10% de MSG + 5% de MgCl_2 (con / sin manitol) mostraron altas recuperaciones después del almacenamiento a 45°C durante una semana.

Referencias

1. Bonnet, M.C. and A. Dutta, World wide experience with inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 2008. 26(4978): p. 4983.
2. Minor, P., Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine*, 2009. 27(20): p. 2649-2652.
3. Shahzad, A. and G. Kohler, Inactivated Polio Vaccine (IPV): A strong candidate vaccine for achieving global polio eradication program. *Vaccine*, 2009. 27: p. 5293- 5294.
4. Ehrenfeld, E., J. Modlin, and K. Chumakov, Future of polio vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2009. 8(7): p. 899-905.
5. John, J., Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication. *Expert Rev Vaccines*, 2009. 8(1): p. 5-8.
6. Westdijk, J., et al., Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine*, 2011. 29(18): p. 3390-7.
7. Clements, C.J., G. Larsen, and L. Jodar, Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine*, 2004. 22(15-16): p. 2054-2058.
8. Friede, M. and M.T. Aguado, Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(3): p. 325-331.
9. Moynihan, M. and I. Petersen, The durability of inactivated poliovirus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. *J Biol Stand*, 1982. 10(3): p. 261-8.
10. WHO, Temperature sensitivity of vaccines. 2006.
11. Sawyer, L. A., et al, Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 1994. 12(9): p. 851-6.
12. Vidor, The place of DTP/eIPV vaccine in routine paediatric vaccination. *Rev Med Virol*, 1994. 4: p. 261-77.

13. Bruce Aylward, R., et al., Risk management in a polio-free world. *Risk Anal*, 2006. 26(6): p. 1441-8.
14. Sutter, R.W., V.M. Caceres, and P. Mas Lago, The role of routine polio immunization in the post-certification era. *Bull World Health Organ*, 2004. 82(1): p. 31-9.
- 5 15. Thompson, K.M. and R.J. Duintjer Tebbens, The case for cooperation in managing and maintaining the end of poliomyelitis: stockpile needs and coordinated OPV cessation. *Medscape J Med*, 2008. 10(8): p. 190.
16. Tebbens, R.J., et al., Optimal vaccine stockpile design for an eradicated disease: application to polio. *Vaccine*, 2010. 28(26): p. 4312-27.
17. Amorij, J.P., et al., Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm Res*, 2008. 25(6): p. 1256-73.
- 10 18. Wang, W., Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J of Pharm*, 2000. 203 : p. 1-60.
19. Chang, L. and M.J. Pikal, Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *J of Pharm Sc*, 2009. 98(9): p. 2886-2908.
20. Arakawa, T., et al., Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. 46(1-3): p. 307-26.
- 15 21. Bhatnagar, B.S., R.H. Bogner, and M.J. Pikal, Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol*, 2007. 12(5): p. 505-23.
22. Skrabanja, A.T., et al, Lyophilization of biotechnology products. *PDA J Pharm Sci Technol*, 1994. 48(6): p. 311-7.
23. Dias, C.L., et al, The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology*, 2010. 60(1): p. 91-9.
24. Carpenter, J.F. and J.H. Crowe, The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 1988.
- 20 25(3): p. 244-55.
25. Chang, B.S., B.S. Kendrick, and J.F. Carpenter, Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci*, 1996. 85: p. 1325-1330.
26. Tang, X.C. and M.J. Pikal, Measurement of the kinetics of protein unfolding in viscous systems and implications for protein stability in freeze-drying. *Pharm Res*, 2005. 22(7): p. 1176-85.
- 25 27. Webb, S.D., et al, A new mechanism for decreasing aggregation of recombinant human interferon-gamma by a surfactant: Slowed dissolution of lyophilized formulations in a solution containing 0.03% polysorbate 20. *J Pharm Sci*, 2002. 91 : p. 543-558.
28. Rupley, J. A. and G. Careri, Protein hydration and function. *Adv Protein Chem*, 1991. 41 : p. 37-172.
29. Carpenter, J.F., T. Arakawa, and J.H. Crowe, Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Dev Biol Stand*, 1992. 74: p. 225-38; discussion 238-9.
- 30 30. Carpenter, J.F. and J.H. Crowe, An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 1989. 28(9): p. 3916- 22.
31. Tian, F., S. Sane, and J.H. Rytting, Calorimetric investigation of protein/amino acid interactions in the solid state. *Int J Pharm*, 2006. 310: p. 175-186.
- 35 32. Akers, M.J., et al., Glycine crystallization during freezing: the effects of salt form, pH, and ionic strength. *Pharm Res*, 1995. 12(10): p. 1457-61.
33. Mattern, M., et al, Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. II. Process and storage stability in sugar-free amino acid systems. *Pharm Dev Technol*, 1999. 4(2): p. 199-208.
34. Costantino, H.R., et al, Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins. *Biochemistry (Mosc)*, 1998. 63(3): p. 357-63.
- 40 35. Kadoya, S., et al., Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide- derived sugar alcohols. *Int J Pharm*, 2010. 389(1-2): p. 107-13.
36. Li, S., et al, Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J Pharm Sci*, 1996. 85(8): p. 873-7.
- 45 37. Franks, F., Long-term stabilization of biologicals. *Biotechnology (N Y)*, 1994. 12(3): p. 253-6.

38. Yu, L., et al, Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *J Pharm Sci*, 1999. 88(2): p. 196-8.
39. Hancock, B.C. and G. Zografi, Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci*, 1997. 86(1): p. 1-12.
- 5 40. Schmitt, E.A., D. Law, and G.G. Zhang, Nucleation and crystallization kinetics of hydrated amorphous lactose above the glass transition temperature. *J Pharm Sci*, 1999. 88(3): p. 291-6.
41. Fox, K.C., Biopreservation. Putting proteins under glass. *Science*, 1995. 267(5206): p. 1922-3.
42. Crowe, J.H., J.F. Carpenter, and L.M. Crowe, The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 1998. 60: p. 73-103.
- 10 43. van Ingen, C. and C.S. Tan, Preservation mixture and use thereof, W.I.P. Organization, Editor. 2010, De Staat Der Nederlanden, vert. door de minister van VWS. 44. Bam, N.B., et al., Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J Pharm Sci*, 1998. 87(12): p. 1554-9.
45. Christensen, D., et al., Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1768(9): p. 2120-2129.
- 15 46. Izutsu, K., S. Yoshioka, and T. Terao, Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1994. 42(1): p. 5-8.
47. Kim, A.I., M.J. Akers, and S.L. Nail, The physical state of mannitol after freeze- drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J Pharm Sci*, 1998. 87(8): p. 931-5.
- 20 48. Kreilgaard, L., et al, Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid. *Arch Biochem Biophys*, 1998. 360(1): p. 121-34.
49. Leal, M.L., et al, Study on thermostabilizers for trivalent oral poliomyelitis vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1990. 85(3): p. 329-38.
50. Liska, V., et al, Evaluation of a recombinant human gelatin as a substitute for a hydrolyzed porcine gelatin in a refrigerator-stable Oka/Merck live varicella vaccine. *J Immune Based Ther Vaccines*, 2007. 5: p. 4.
- 25 51. Melnick, J.L., Thermostability of poliovirus and measles vaccines. *Dev Biol Stand*, 1996. 87: p. 155-60.
52. Nagel, J., et al., Some experiments on freezedrying of inactivated poliomyelitis- vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1963. 12: p. 718-20.
53. Ohtake, S., et al, Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine*, 2010. 28(5): p. 1275-84.
- 30 54. Sood, D.K., et al., Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. *Vaccine*, 1993. 11(11): p. 1124-8.
55. Ungar, J., et al, Preparation and properties of a freeze-dried B.C.G. vaccine of increased stability. *Br Med J*, 1962. 2(5312): p. 1086-9.
- 35 56. Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 1999. 185(2): p. 129-88. 57. Wright, D., P.W. Muggleton, and M.I. Griffiths, Evaluation of the stability of dried BCG vaccine. *Tubercle*, 1972. 53(2): p. 92-9.
58. Izutsu, K., C. Yomota, and N. Aoyagi, Inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium phosphates and citrates. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2007. 55(4): p. 565-70.
59. Shiomi, H., T. Urasawa, and S. Urasawa, Heat stability of the lyophilized Sabin poliovaccine. *Jpn J Infect Dis*, 2003. 56(2): p. 70-2.
- 40 60. Burke, C.J., et al., The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992. 86(1): p. 89-93.
61. Kersten, G., T. Hazendonk, and C. Beuvery, Antigenic and immunogenic properties of inactivated polio vaccine made from Sabin strains. *Vaccine*, 1999. 17(15- 16): p. 2059-2066.
- 45 62. Doel, T.R., et al, The evaluation of a physical method for the quantification of inactivated poliovirus particles and its relationship to D-antigenicity and potency testing in rats. *J Biol Stand*, 1984. 12(1): p. 93-9.
63. Ivanov, A.P. and E.M. Dragunsky, ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2005. 4(2): p. 167-72.

64. van Steenis, G., A.L. van Wezel, and V.M. Sekhuis, Potency testing of killed polio vaccine in rats. Dev Biol Stand, 1981. 47: p. 119-28.

65. Wood, D.J. and A.B. Heath, A WHO collaborative study of immunogenicity assays of inactivated poliovirus vaccines. Biologicals, 1995. 23(4): p. 301-11.

5 Abreviaturas

	BCG	-	Bacillus Calmette-Guérin
	DoE	-	Diseño de experimentos
	DSC	-	Calorimetría diferencial de barrido
	DU/D-Ag	-	Unidad D / D-antigenicidad
10	ELISA	-	Ensayo de inmunoabsorción enzimática
	HES	-	Hidroxietilalmidón
	HRP	-	peroxidasa de rábano picante
	IgG	-	Inmunoglobulina G
	IPV	-	Vacuna de la poliomielitis inactivada
15	MAN	-	manitol
	MS	-	espectrometría de masas
	MSG	-	glutamato monosódico
	OPV	-	vacuna oral contra la poliomielitis
	PEP	-	peptona
20	QC	-	Control de calidad (departamento de RIVM)
	RIVM	-	Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente
	RMC	-	Contenido de humedad residual
	RP-HPLC	-	Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa
	sIPV	-	Vacuna de la polio inactivada con sabina (basada en cepas de Sabina)
25	SOR	-	Sorbitol
	SUC	-	Sacarosa
	T _g	-	Temperatura de transición vítrea
	TREH	-	Trehalosa
	VAPP	-	Poliomielitis paralítica asociada a la vacuna
30	VDPV	-	Virus de la polio derivado de la vacuna
	OMS	-	Organización Mundial de la Salud

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una formulación seca de un agente biofarmacéutico, en el que el método comprende secar una solución que comprende un agente biofarmacéutico, un aminoácido, al menos 2,0% (p/v) de al menos uno entre un azúcar y un alcohol de azúcar, o una mezcla de los mismos, al menos 0,2% (p/v) de una sal metálica y agua, en el que dicha sal metálica es una sal metálica de un catión divalente, Li^+ , o una mezcla de los mismos, en el que el aminoácido es glutamato, arginina, histidina, asparagina, lisina, leucina, glicina o una mezcla de los mismos y en el que dicho agente biofarmacéutico es un virus.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución consiste esencialmente en 1 pg - 10 g por ml del agente biofarmacéutico, 0,01 - 20% (p/v) del aminoácido, 2,0 - 20% (p/v) de como mínimo uno entre un azúcar y un alcohol de azúcar, o una mezcla de los mismos, 0,2 - 10% (p/v) de la sal metálica y el agua.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que:
 - a) el alcohol de azúcar es sorbitol, manitol, maltitol o una mezcla de los mismos,
 - b) la sal metálica es una sal de Mg^{++} , Ca^{++} o Li^+ o una mezcla de los mismos, preferiblemente una sal de Cl^- o SO_4^{2-} o una mezcla de los mismos.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el glutamato se disuelve en la solución en forma de glutamato monosódico, y / o en el que la arginina está en forma de poli-L-arginina y / o en el que la lisina está en forma de poli-L-lisina.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la solución consiste esencialmente en 1 pg - 10 g por ml del agente biofarmacéutico, 5 - 20% (p/v) de sorbitol, 5 - 20% (p/v) de glutamato monosódico, 2 - 10% (p/v) de una sal de magnesio, preferiblemente MgCl_2 y / o MgSO_4 y, opcionalmente, 5 - 20% (p/v) de manitol.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución comprende un tampón farmacéuticamente aceptable y se tampona a un pH neutro.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución se seca mediante secado al aire, secado al vacío, secado por pulverización o por liofilización.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente biofarmacéutico es un enterovirus o un neumovirus.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el agente biofarmacéutico comprende el virus de la polio de los serotipos 1, 2 y 3, virus de la polio inactivado preferible de los serotipos 1, 2 y 3, o en el que el agente biofarmacéutico es un RSV humano o bovino, preferiblemente un RSV que comprende un genoma viral que tiene un gen de una proteína de unión G eliminado o inactivado.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación seca, tras la reconstitución después del secado, retiene al menos el 50% de la actividad del agente biofarmacéutico presente en la solución antes del secado.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la solución a secar comprende más de un agente biofarmacéutico diferente y en el que la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes preferiblemente es inferior al 50%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida en actividad se expresa como porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, que se establece en 100%.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación seca, tras la reconstitución después del almacenamiento durante al menos una semana a 45°C, retiene al menos el 50% de la actividad del agente biofarmacéutico presente en la solución antes del secado.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la formulación seca comprende más de un agente biofarmacéutico diferente y en el que la diferencia en la pérdida de actividades para los diferentes agentes es preferiblemente menor del 50%, por lo que la actividad retenida del agente con la mayor pérdida de actividad se expresa como porcentaje de la actividad retenida del agente con la menor pérdida, que se establece en 100%.
14. Una formulación de un agente biofarmacéutico obtenible en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13.
15. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 14 para usar en la inducción de una respuesta inmune en un individuo contra una enfermedad infecciosa o un tumor.

Fig. 1

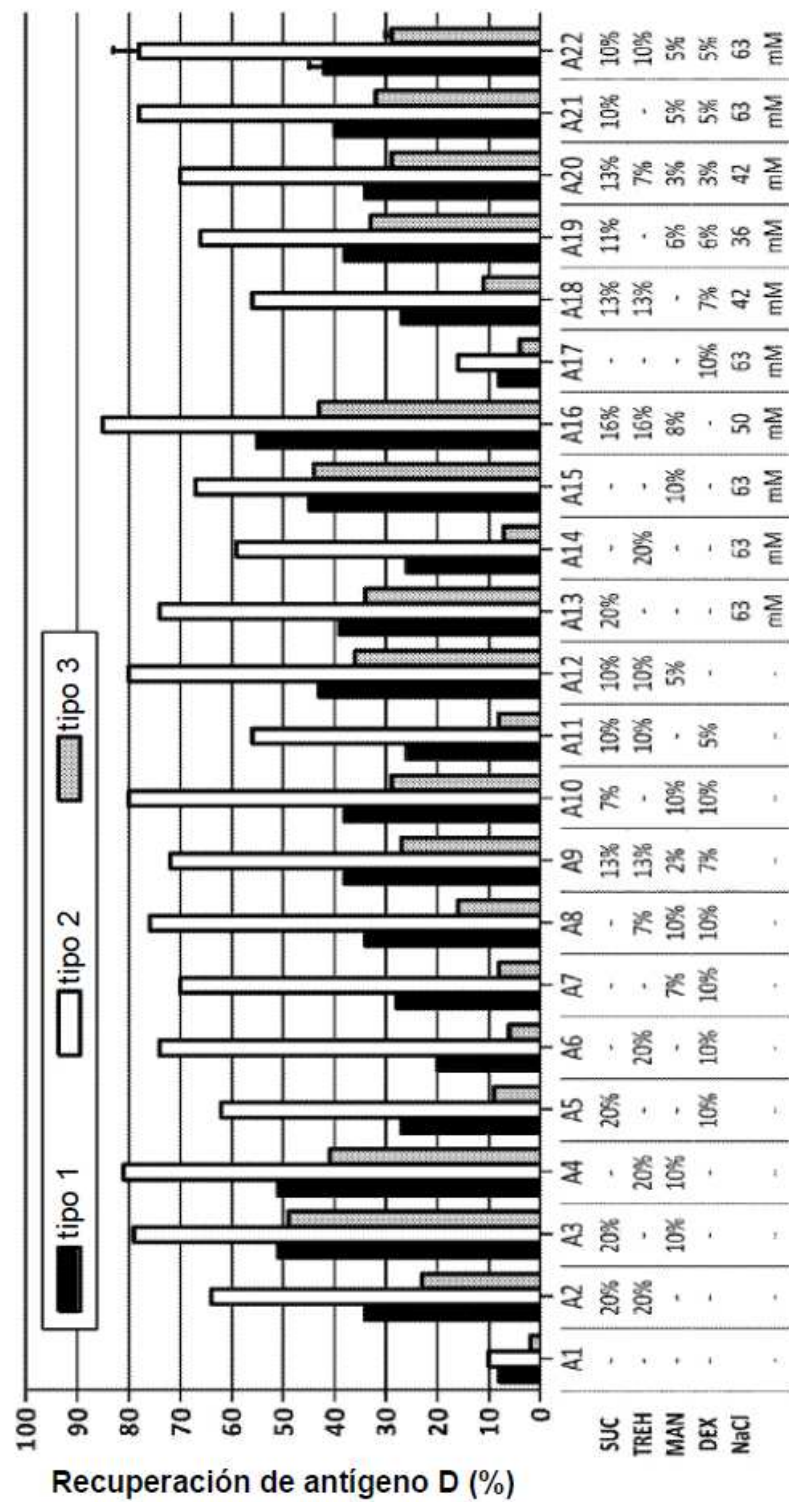


Fig. 2

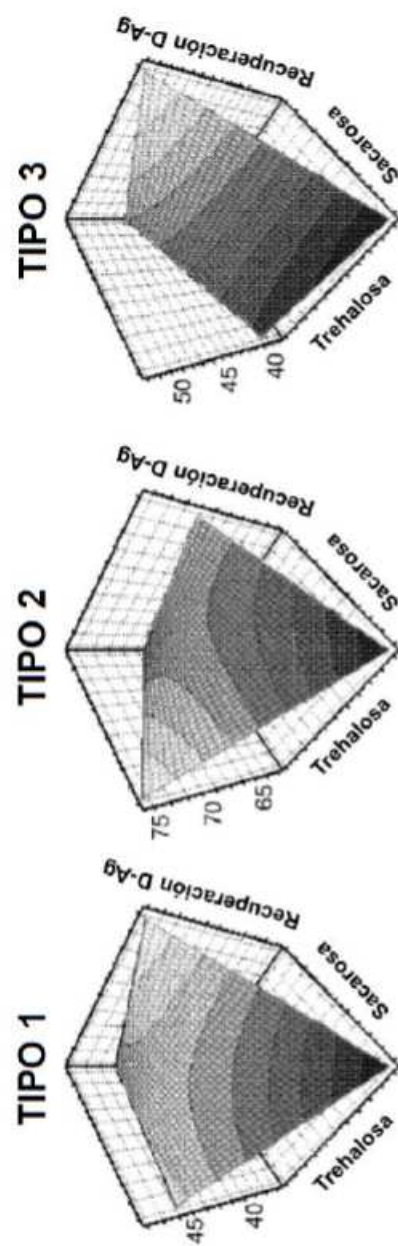


Fig. 3

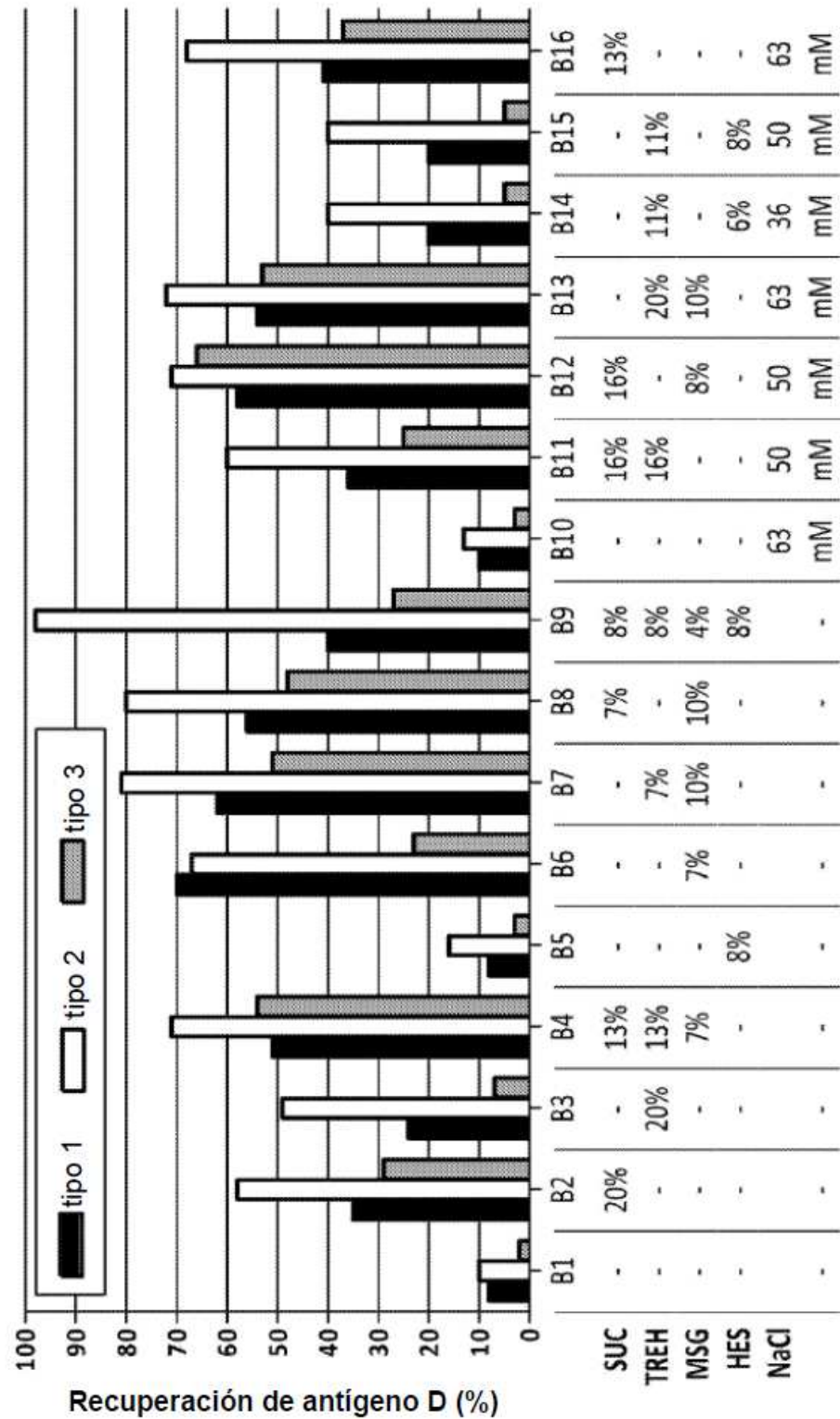
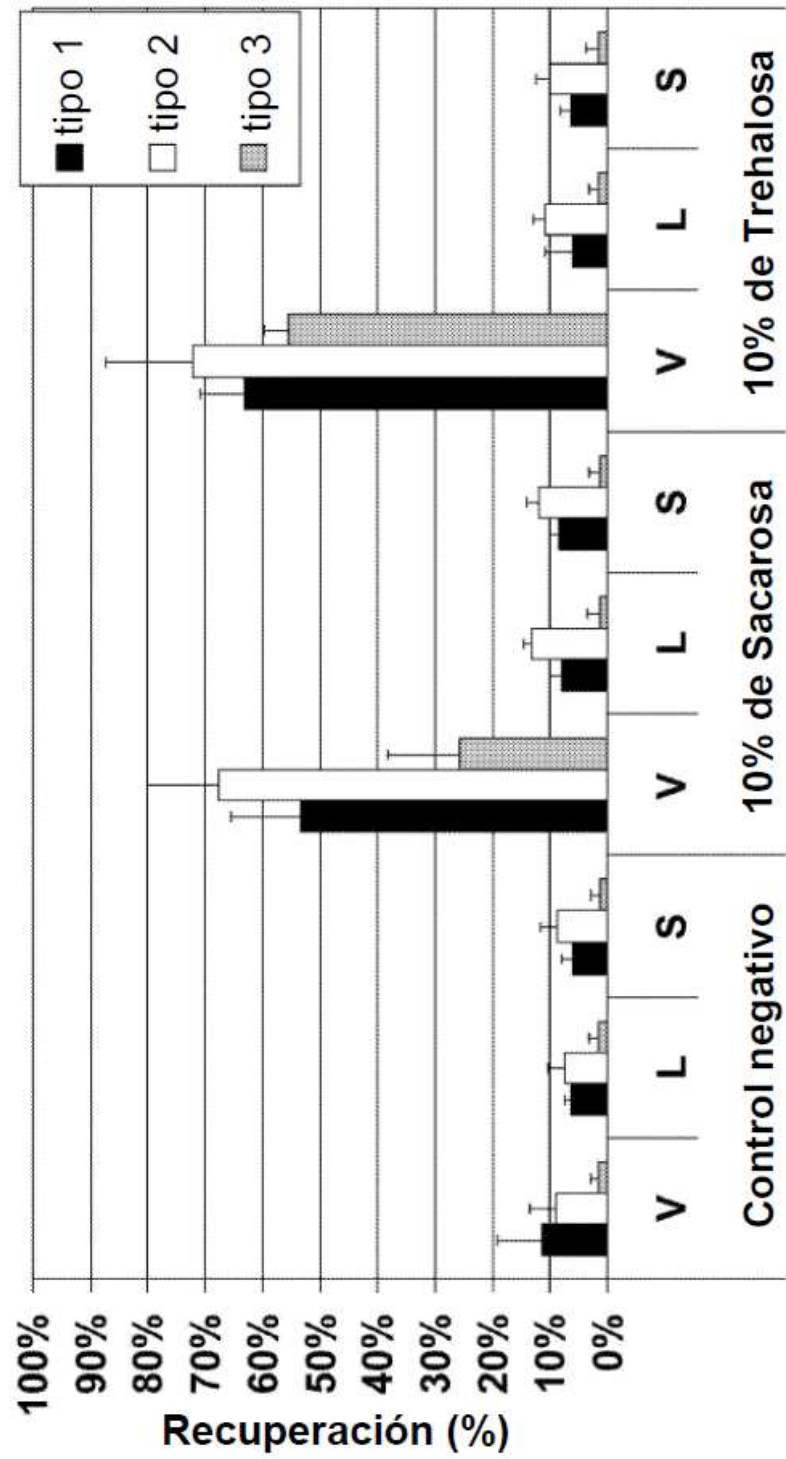


Fig. 4



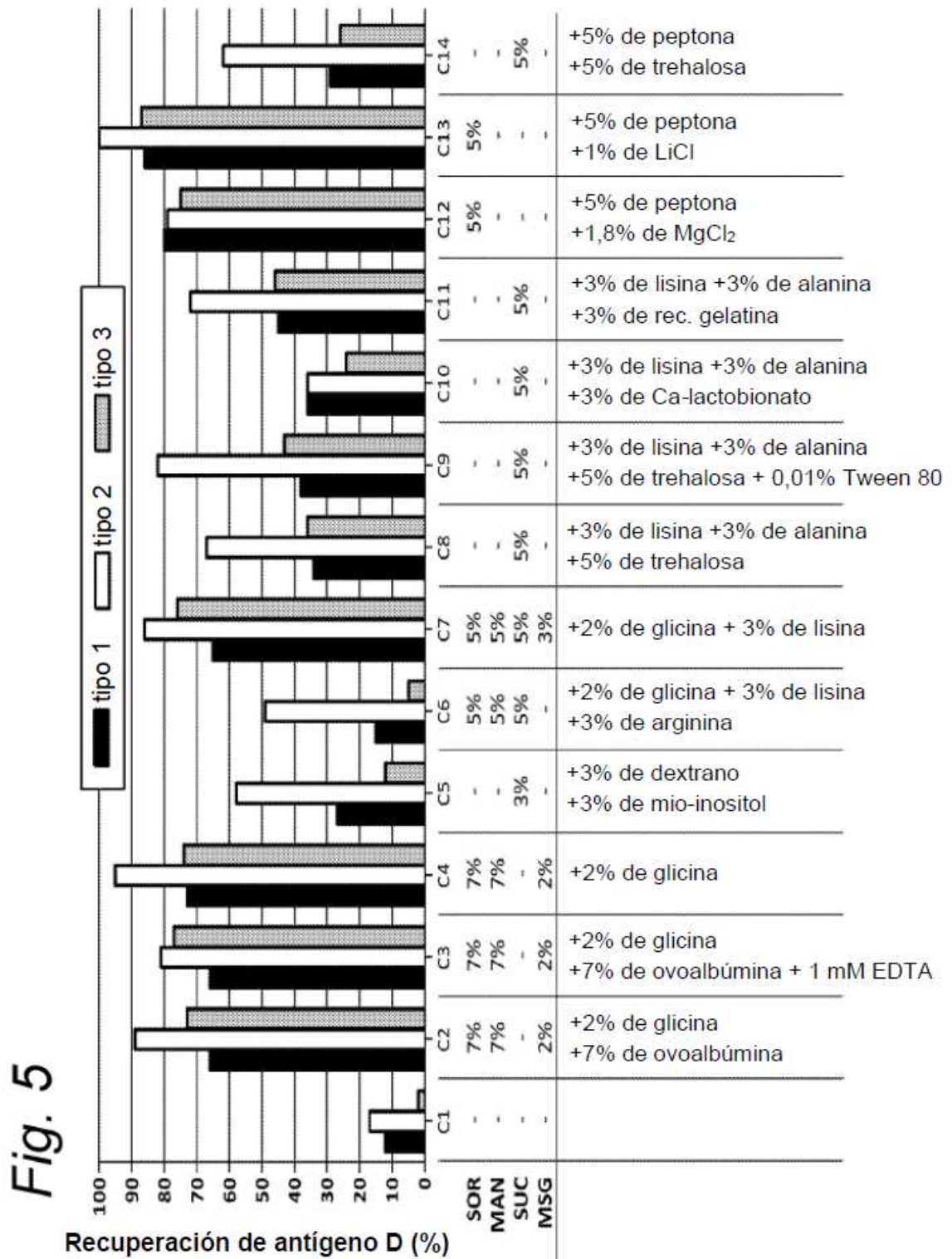


Fig. 6

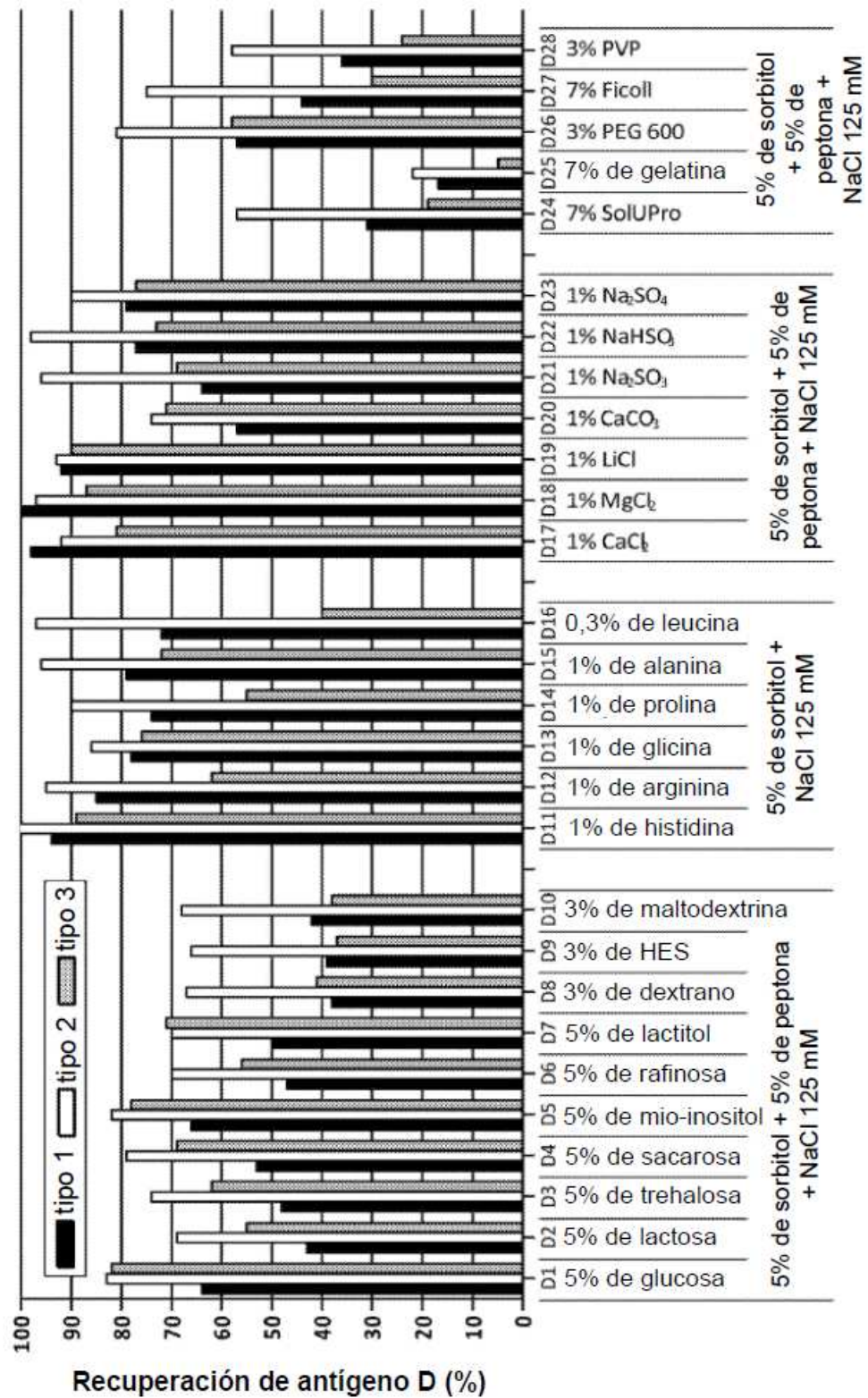


Fig. 7

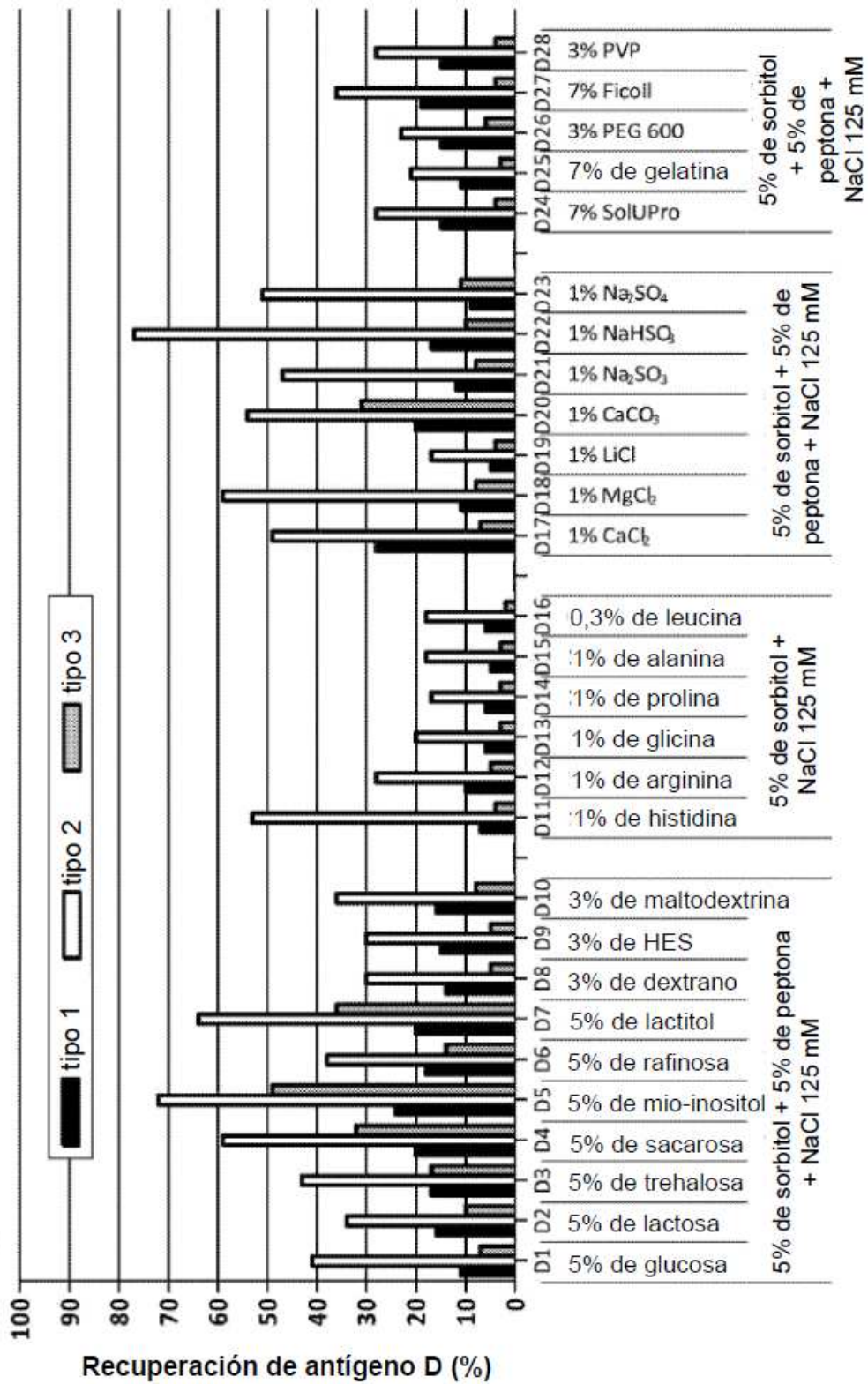


Fig. 8a

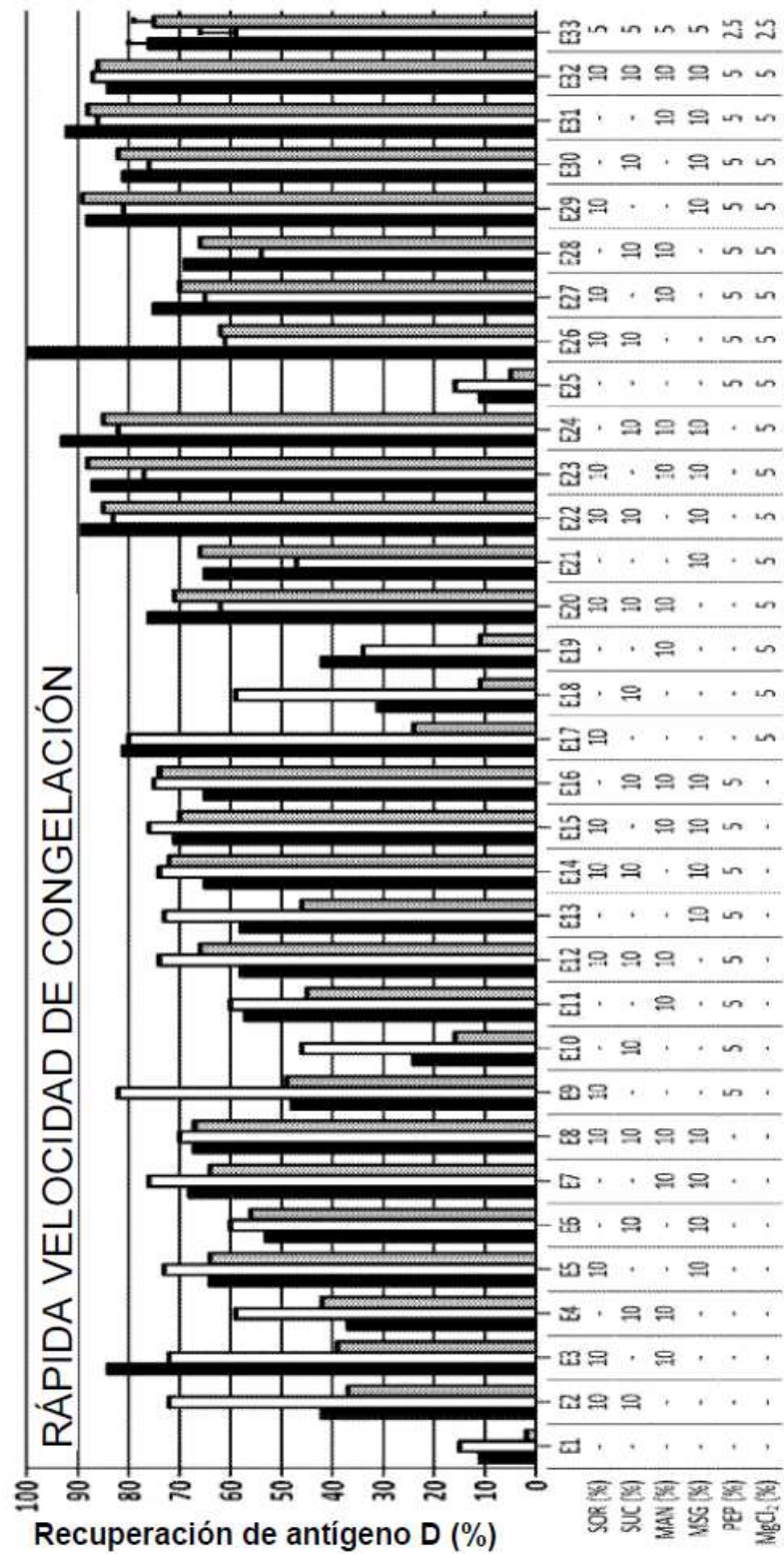


Fig. 8b

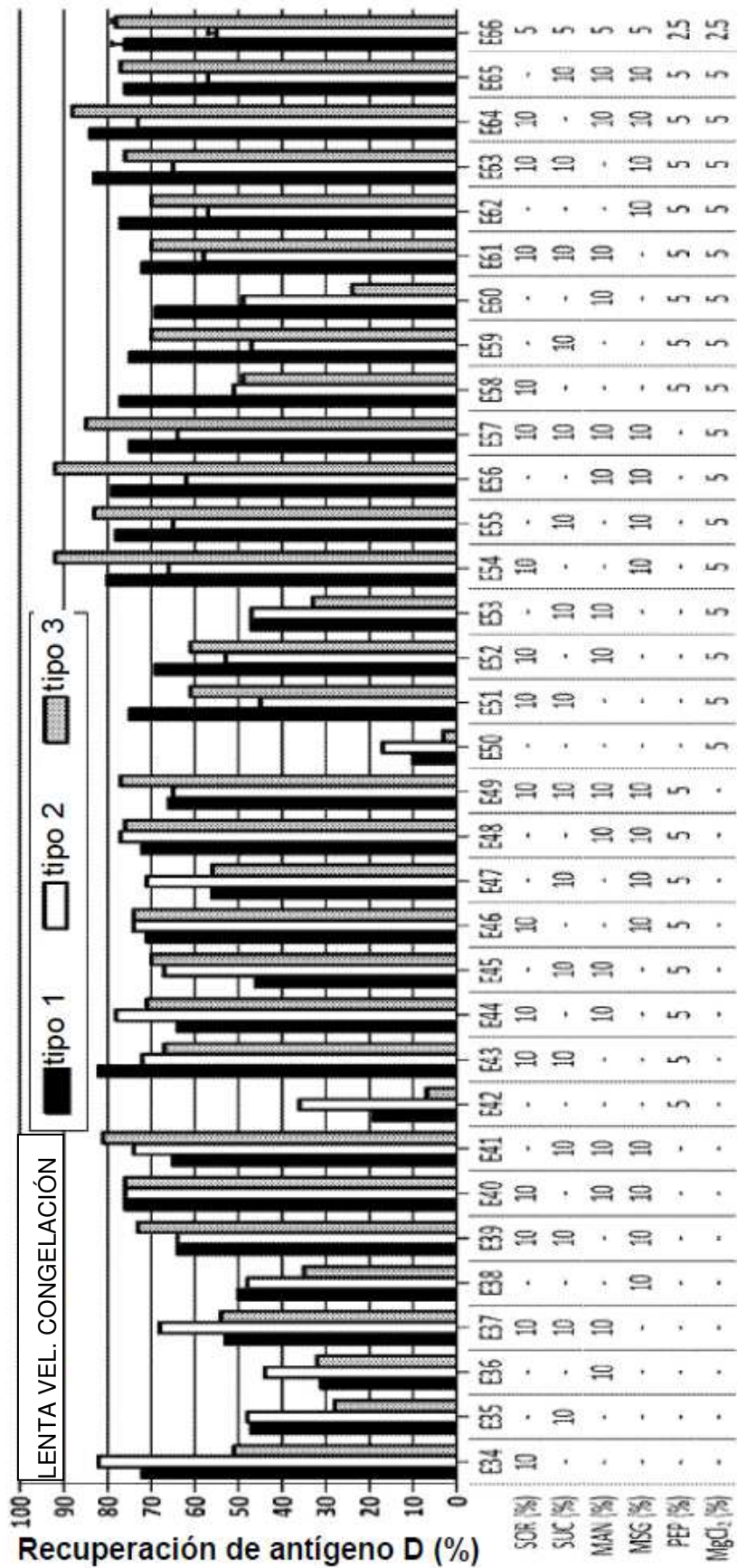


Fig. 9a

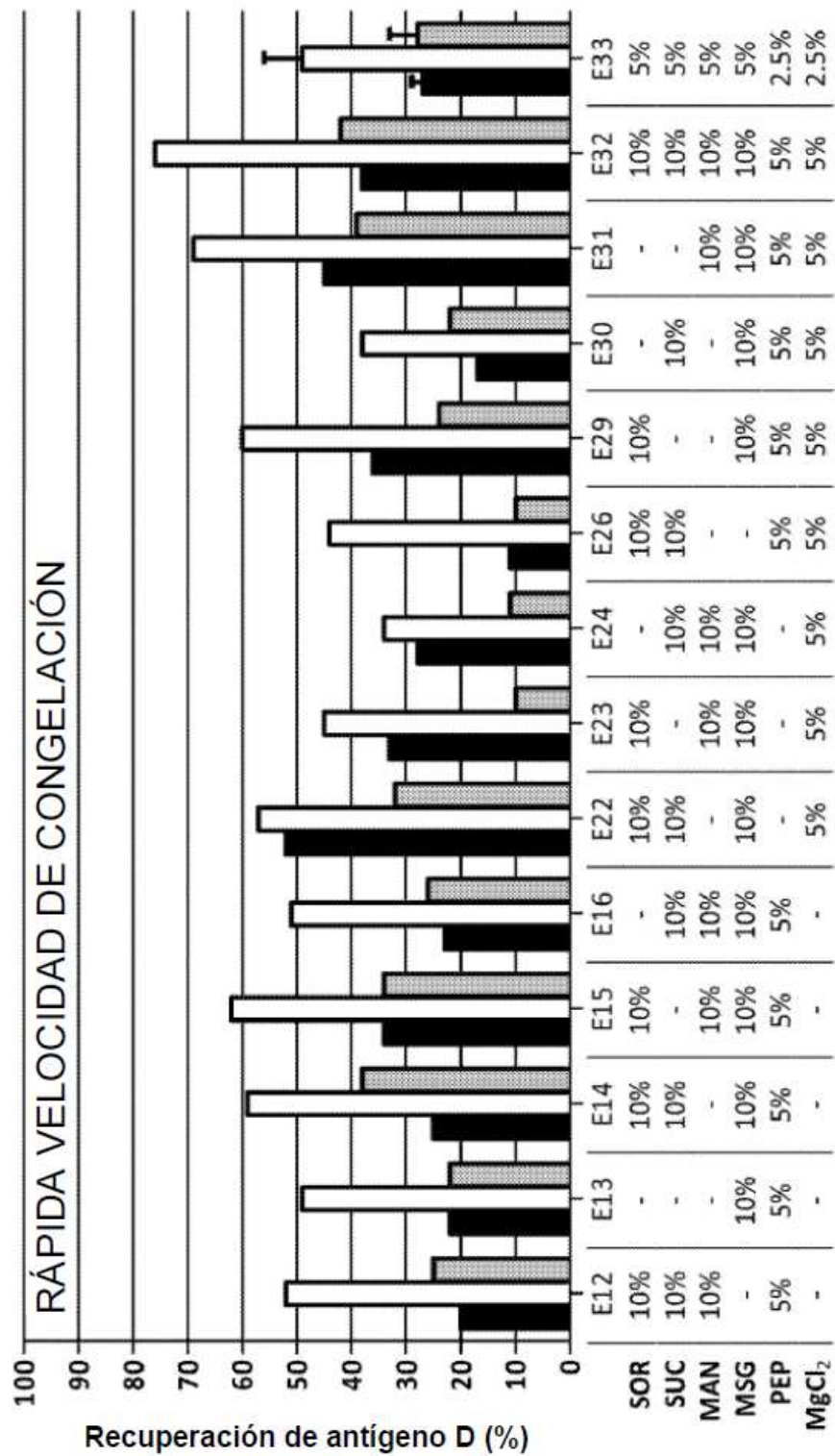


Fig. 9b

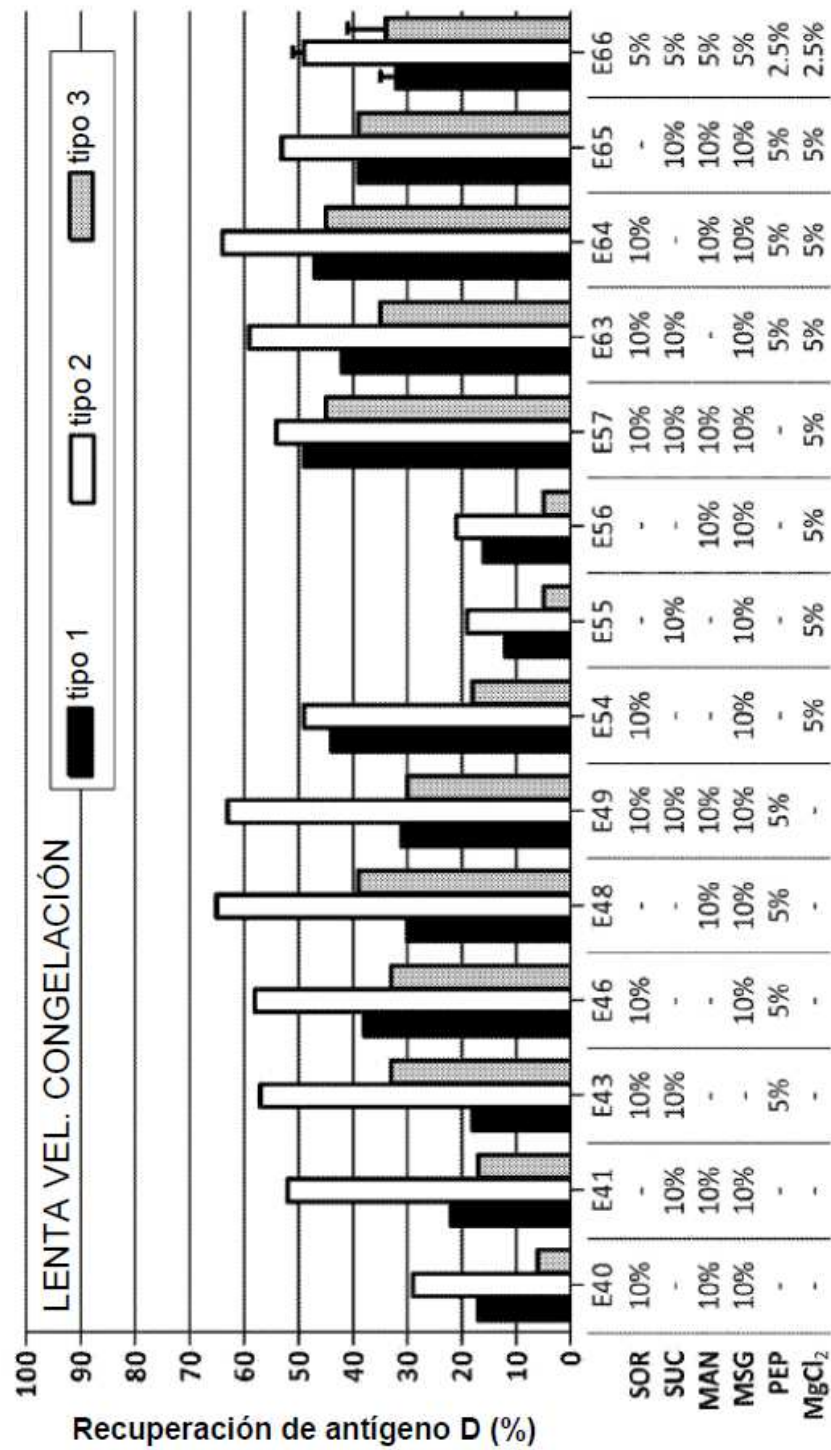


Fig. 10

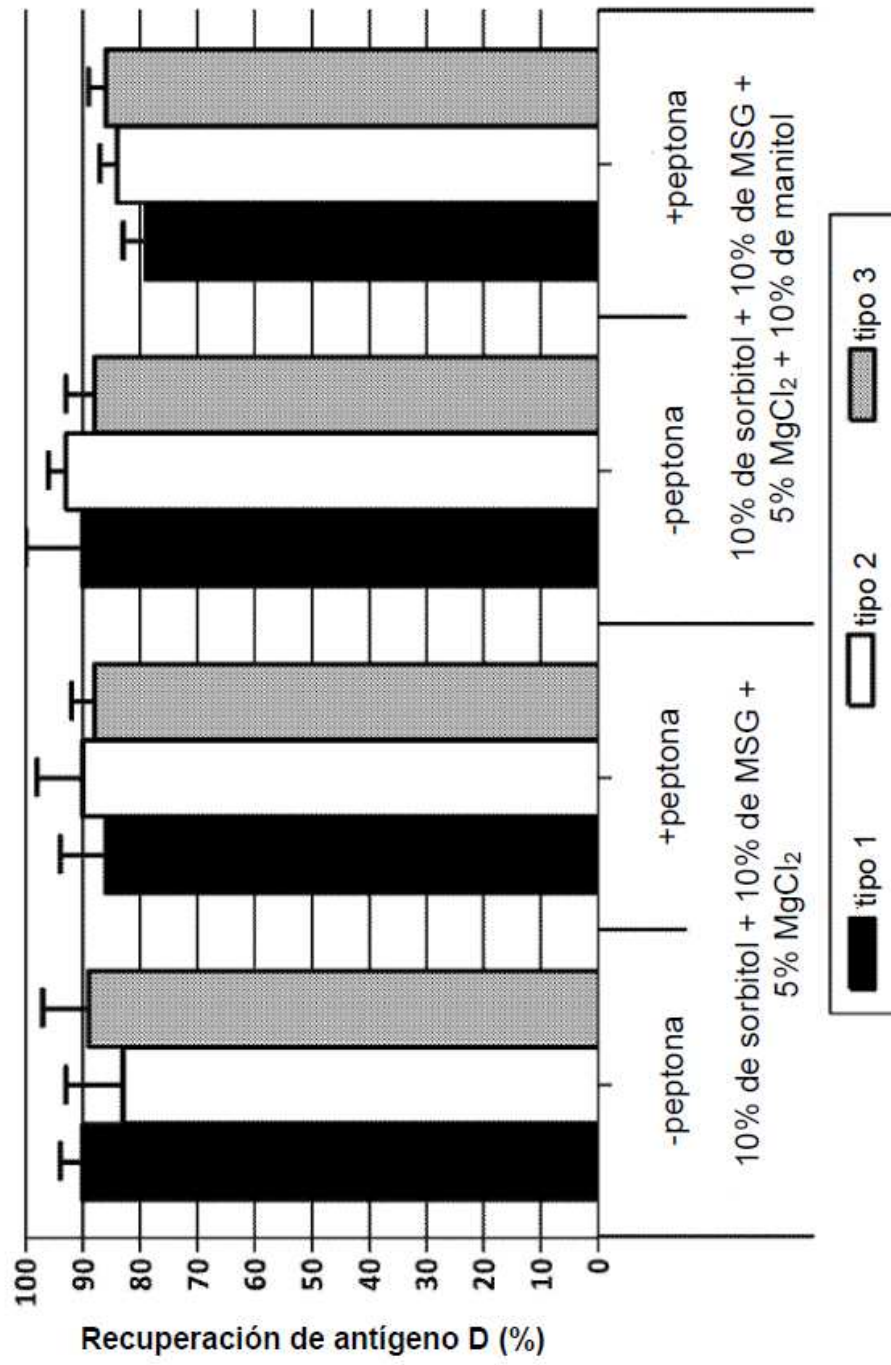


Fig. 11

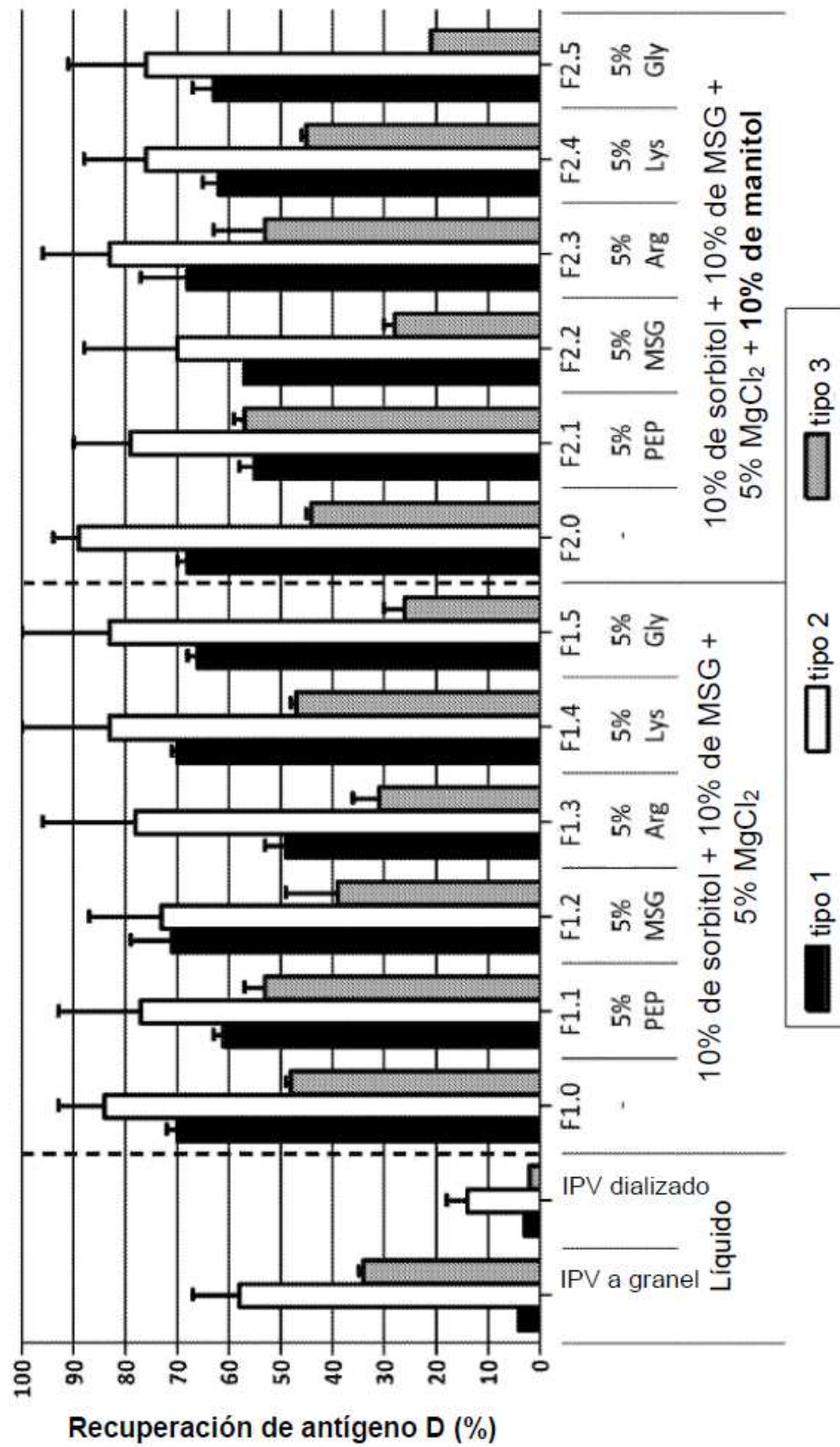


Fig. 12a

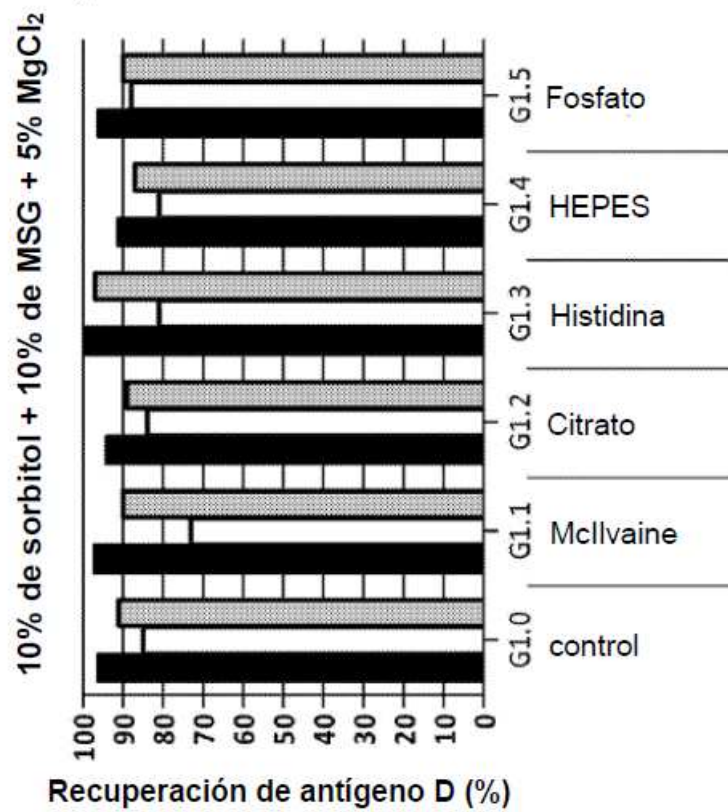


Fig. 12b

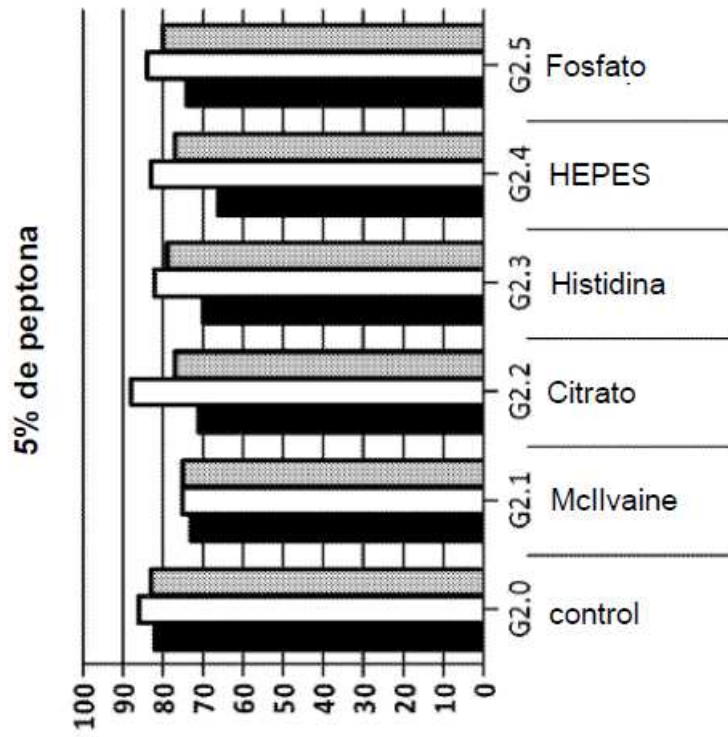


Fig. 12c

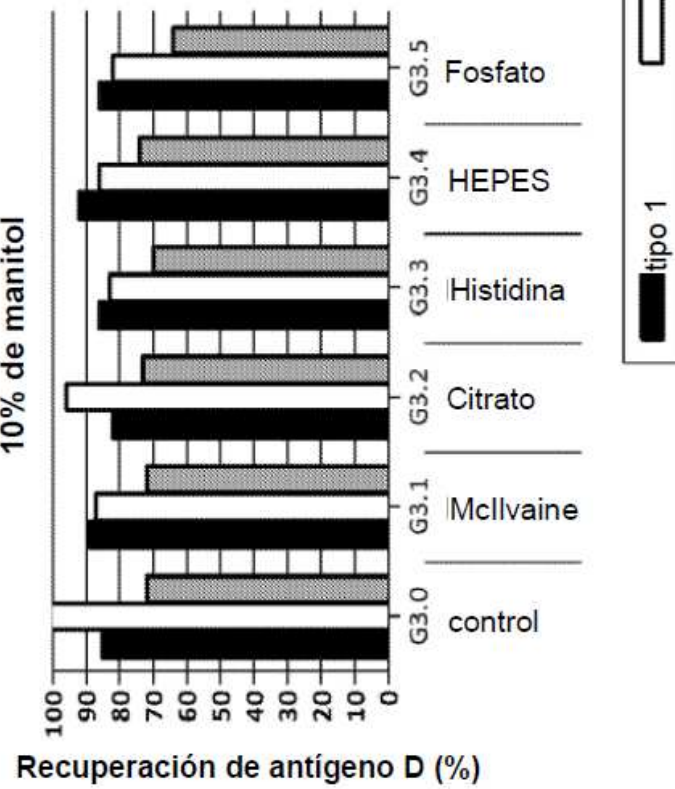


Fig. 12d

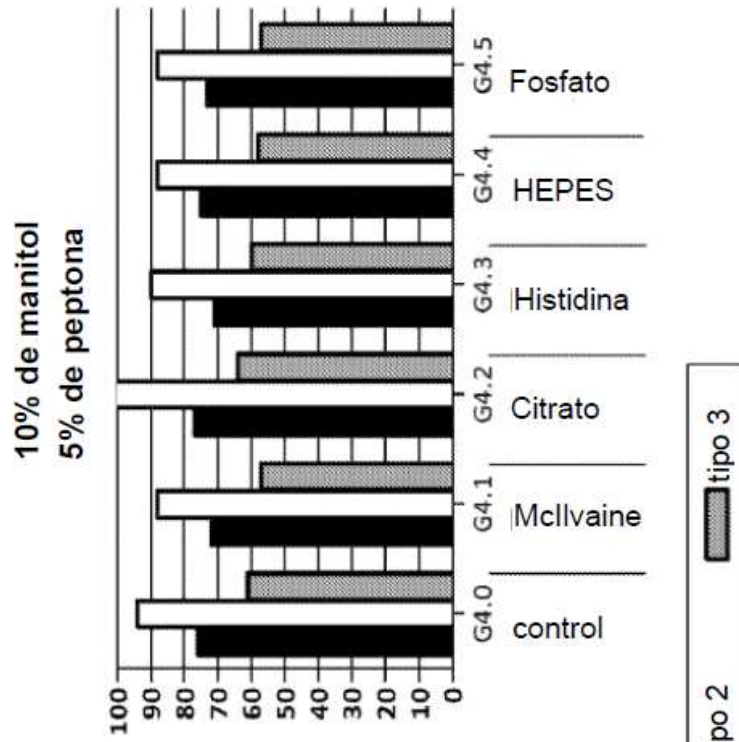


Fig. 13a

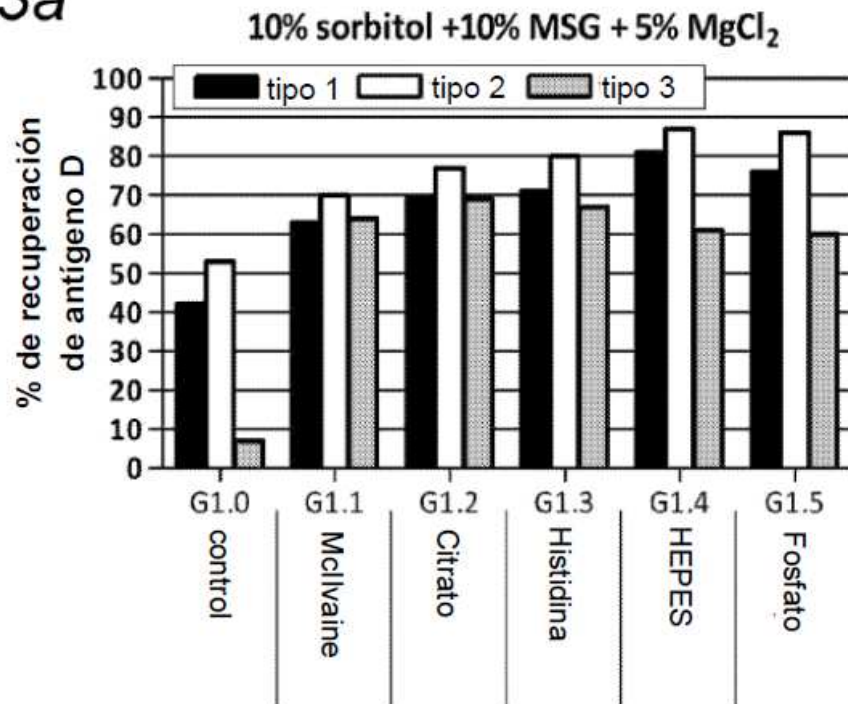


Fig. 13b

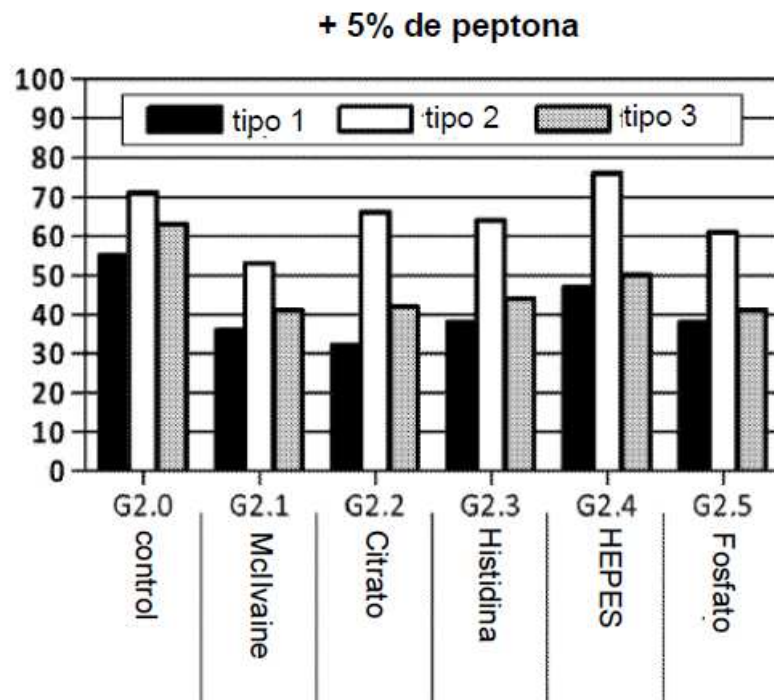


Fig. 13c

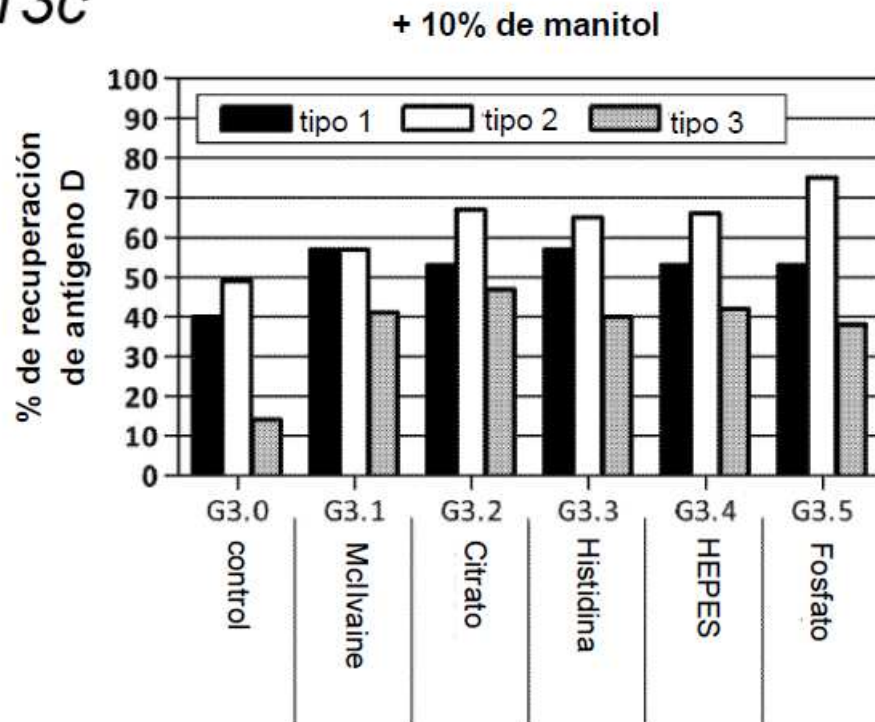


Fig. 13d

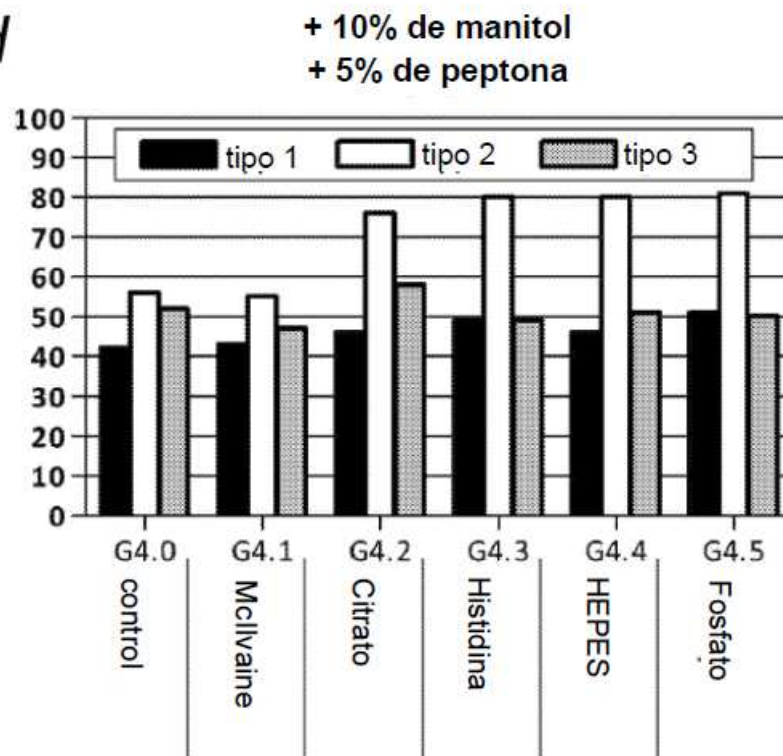


Fig. 14

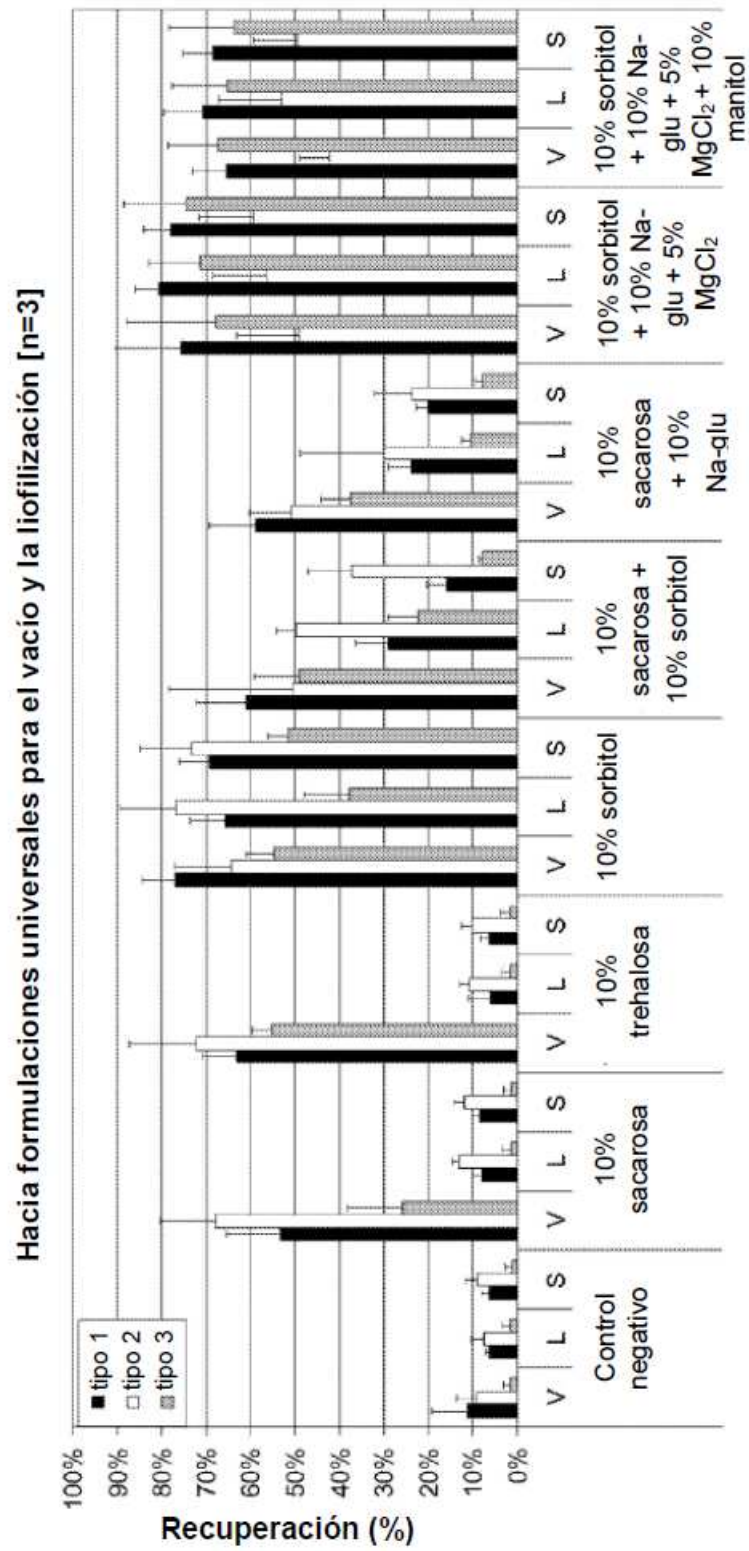


Fig. 15

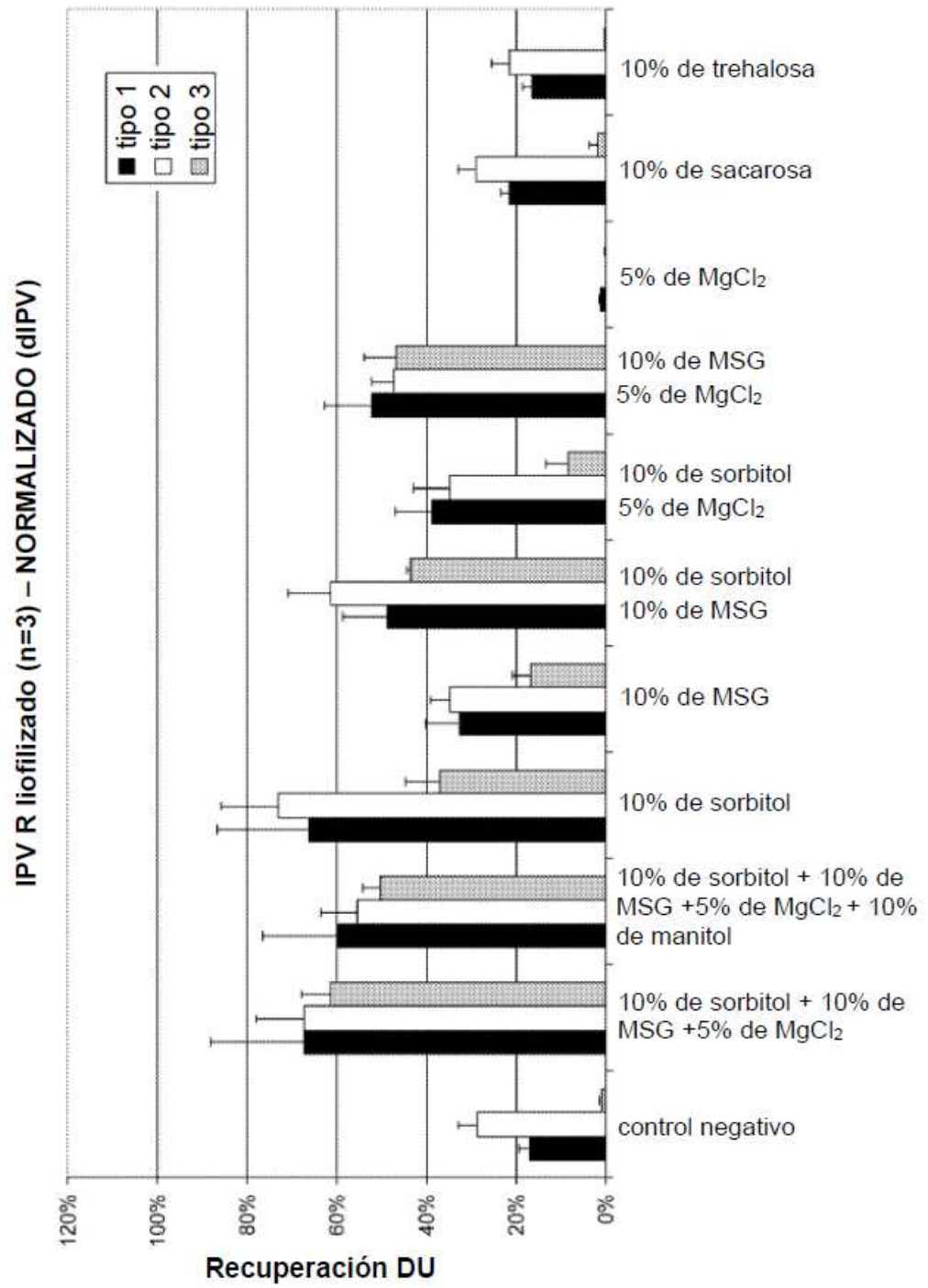


Fig. 16

