

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 298**

51 Int. Cl.:

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/30 (2006.01)

G01N 13/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2017 PCT/EP2017/053021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2017 E 17703768 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3414568**

54 Título: **Procedimiento para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína**

30 Prioridad:

10.02.2016 EP 16305152

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

01.12.2020

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON FRANCE (100.0%)
11 Rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, FR**

72 Inventor/es:

**CHEVOLLEAU, TZVETELINA y
HAMEL, JEAN-BERNARD**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 797 298 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

Procedimiento para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína respecto a un lubricante de un recipiente lubricado en el que se pretende almacenar dicha formulación. La invención se refiere además a un procedimiento para adaptar una formulación a base de proteína a un lubricante de un recipiente lubricado y a un procedimiento para seleccionar un lubricante adaptado para lubricar un recipiente destinado a almacenar una formulación a base de proteína con el fin de mejorar la estabilidad de dicha formulación respecto al lubricante.

15 **Antecedentes de la técnica**

Los dispositivos de inyección prerellenos son recipientes habituales para administrar fármacos o vacunas en pacientes y entre ellos se incluyen jeringas, cartuchos y autoinyectores. Habitualmente comprenden un tapón sellante de acoplamiento deslizante en un recipiente, en el que el recipiente está lleno de una composición farmacéutica a fin de proporcionar al profesional sanitario un dispositivo de inyección listo para utilizar.

En comparación con dispositivos de inyección vacíos que están llenos de una composición farmacéutica almacenada en viales inmediatamente antes de la inyección, la utilización de dispositivos de inyección prerellenos comporta varias ventajas. En particular, mediante la limitación de la preparación previa a la inyección, los dispositivos de inyección prerellenos proporcionan una reducción de los errores de dosificación médica, un riesgo minimizado de contaminación microbiana y una mayor comodidad de uso para el profesional sanitario. Además, dichos recipientes prerellenos fomentan y simplifican la autoadministración por el paciente, permitiendo reducir el coste de la terapia e incrementando el cumplimiento por parte del paciente. Finalmente, los dispositivos de inyección prerellenos reducen la pérdida de valiosa composición farmacéutica que habitualmente se produce al transferir una composición farmacéutica de un vial a un dispositivo de inyección no prerrelleno. Esto da como resultado un gran número de posibles inyecciones para un lote de fabricación dado de producto farmacéutico, reduciendo de esta manera los costes de compra y de la cadena de suministro.

Sin embargo, junto con dichas mejoras, la comercialización de una composición farmacéutica en dispositivos de inyección prerellenos supone su propio grupo de retos, particularmente en el caso de compuestos biológicos sensibles. En efecto, algunos compuestos biológicos tales como citocinas, anticuerpos monoclonales, productos basados en ácidos nucleicos y vacunas son moléculas altamente complejas y están sometidas a una diversidad de rutas de degradación que pueden impactar sobre la eficacia de la terapia y la seguridad del paciente.

Por ejemplo, en el caso de una jeringa prerrellena, algunos componentes tales como tungsteno, lubricante a base de silicona y adhesivos han sido identificados todos como potenciales fuentes de incompatibilidad para los compuestos biológicos. Los lubricantes en general y más particularmente los aceites de silicona han recibido una atención creciente de los científicos de formulación a fin de entender su compatibilidad con proteínas y vacunas. Los aceites de silicona de grado médico, tales como poli-(dimetilsiloxano) (PDMS), se utilizan comúnmente en dispositivos de inyección por sus propiedades lubricantes: garantizan un deslizamiento eficiente del tapón a lo largo de todo el barril del dispositivo de inyección durante la inyección de la composición farmacéutica en el paciente. Sin embargo, se ha informado de que los aceites de silicona participan en la degradación de proteínas terapéuticas, tales como la formación de partículas en formulaciones farmacéuticas, incluyendo vacunas. Dichas partículas con frecuencia comprenden proteínas agregadas con adyuvantes y/o aceite de silicona.

Además de pérdidas significativas de actividad de las proteínas, pueden resultar efectos clínicos no deseados y problemas de seguridad de la administración parenteral de dichas proteínas agregadas. Además, los niveles de agregación, incluso a porcentaje muy bajo, tal como 1%, pueden convertir una composición farmacéutica en inaceptable con respecto a las mejoras prácticas y normas actuales. Sin embargo, la evaluación de la estabilidad de una formulación a base de proteína al almacenarla en un recipiente lubricado puede resultar difícil y requerir mucho tiempo. Además, la adaptación de una formulación a base de proteína a dichos recipientes con frecuencia es empírica y se lleva a cabo en una etapa tardía del desarrollo del producto. Algunas composiciones farmacéuticas basadas en proteínas pueden llevarse de esta manera a etapas posteriores de desarrollo antes de identificar los problemas de estabilidad principales de almacenarlas en un dispositivo de inyección. Esto puede dar como resultado costosas etapas de reformulación y la no disponibilidad de valiosas composiciones farmacéuticas para el paciente.

Finalmente, en el caso de que se encuentren disponibles varios lubricantes, no se encuentra disponible ningún procedimiento rápido para seleccionar el lubricante más apropiado para una composición dada basada en una proteína. De esta manera, deben llevarse a cabo laboriosos estudios de estabilidad por parte de las compañías médicas con diversos dispositivos de inyección y composiciones lubricantes sin ninguna posibilidad de seleccionar las soluciones más prometedoras.

Jinjiang Li et al.: "Mechanistic Understanding of Protein-Silicone Oil Interactions", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 29, nº 6, 14 de febrero de 2012 (2012-02-14), páginas 1689 a 1697, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-012-0696-6 dan a conocer la reducción de la tensión interfacial entre una formulación a base de proteína y un aceite de silicona, debido a la adsorción de las proteínas en la interfaz de aceite de silicona/formulación a base de proteínas. Dicho documento da a conocer, en particular, que la adición de aditivos puede reducir la adsorción de proteínas en la interfaz de aceite de silicona/formulación a base de proteínas mediante un mecanismo de adsorción competitiva entre dichos tensioactivos y aceite de silicona.

En consecuencia, existe una gran necesidad de un procedimiento rápido y eficiente para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína respecto a un lubricante de un recipiente lubricado en el que se pretende almacenar dicha formulación. Además, existe una necesidad de un procedimiento fiable de guiar la formulación de formulaciones basadas en proteínas destinadas al almacenamiento en recipientes lubricados. Finalmente, un procedimiento para seleccionar el lubricante más apropiado para un recipiente destinado al almacenamiento de una formulación a base de proteínas asimismo resulta deseable.

Breve descripción de la invención

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína que comprende una proteína, un péptido y/o un derivado de proteína y un amortiguador respecto a un lubricante de un recipiente lubricado en el que se pretende almacenar dicha formulación, que comprende:

- a) evaluar la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre el amortiguador y el lubricante,
- b) evaluar la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante,
- c) identificar por lo menos un componente de la formulación a base de proteína que interactúa con el lubricante mediante la comparación de la reducción evaluada en la etapa b) con la reducción evaluada en la etapa a).

Dicho procedimiento proporciona un muy buen conocimiento de la estabilidad de la formulación a base de proteína respecto a un lubricante de un recipiente lubricado con mediciones simples y económicas de la tensión interfacial. En particular, dicho procedimiento permite determinar si se produce una interacción entre la proteína y el lubricante, o entre el amortiguador y el lubricante. De esta manera, permite detectar problemas de estabilidad en una etapa muy temprana del desarrollo de la formulación y evitar caras etapas de reformulación durante las etapas posteriores del desarrollo de la formulación. De esta manera, dicho procedimiento resulta valioso para mitigar el riesgo de estabilidad durante el desarrollo de la formulación a base de proteína y ahorra tiempo y dinero a las compañías farmacéuticas.

En una forma de realización, dicho procedimiento comprende además evaluar la reducción de tensión interfacial entre cada componente del amortiguador y el lubricante en la etapa a). En efecto, la inestabilidad de la formulación a base de proteína y lubricante podría estar asociada a cualquier componente de la formulación y no sólo a la proteína. De esta manera, dicho procedimiento resulta útil para identificar el componente o componentes que interactúan de entre todos los componentes del amortiguador.

Un segundo aspecto de la presente invención es un procedimiento para mejorar la estabilidad de la formulación a base de proteína respecto al lubricante de dicho recipiente. En un primer enfoque, dicho procedimiento comprende:

- a) evaluar la estabilidad de la formulación a base de proteína según el primer aspecto de la presente invención,
- b) seleccionar un adyuvante que produce una mayor reducción en el tiempo de la tensión interfacial con el lubricante que la formulación a base de proteína,
- c) adaptar la formulación a base de proteína mediante la adición de dicho adyuvante seleccionado a la formulación a base de proteína.

Dicho adyuvante ya puede encontrarse presente en el amortiguador y su concentración de esta manera puede incrementarse de manera que compita con la interacción detectada en el primer aspecto de la presente invención, por ejemplo la interacción entre la proteína y el lubricante. Por lo tanto, la interacción no deseada se sustituye por una interacción no sensible que no perjudique a la estabilidad o a la potencia de la formulación a base de proteína. El adyuvante añadido asimismo puede ser un adyuvante no presente en la formulación a base de proteína antes de la adaptación de la formulación mediante el presente procedimiento. Por ejemplo, el adyuvante puede ser un tensioactivo, tal como polisorbato-80.

En un segundo enfoque, dicho procedimiento comprende:

- a) evaluar la estabilidad de la formulación a base de proteína según el primer aspecto de la presente invención,
- b) seleccionar un adyuvante capaz de formar complejos con la proteína de la formulación a base de proteína,
- c) adaptar la formulación a base de proteína mediante la adición de dicho adyuvante seleccionado de manera que se reduzca por lo menos parcialmente la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante.

En dicho segundo enfoque, la interacción no deseada identificada en el primer aspecto de la presente invención puede evitarse mediante el complejo formado entre la proteína y el adyuvante, y la formulación basada en la proteína adaptada no presenta ninguna reducción en el tiempo de la tensión interfacial con el lubricante. Por ejemplo, el adyuvante añadido puede ser una sal, tal como una sal de aluminio, por ejemplo hidróxido de aluminio.

Ambos enfoques del segundo aspecto de la presente invención proporcionan un procedimiento simple para reformular una formulación a base de proteína que se ha encontrado que es inestable respecto a un lubricante dado en un recipiente lubricado. Mediante la utilización de la tensión interfacial como guía, pueden anticiparse y reducirse caros y prolongados estudios de estabilidad.

Un tercer aspecto de la presente invención es un procedimiento para seleccionar un lubricante adaptado a un recipiente destinado a almacenar una formulación a base de proteína, que comprende:

- a) proporcionar por lo menos un lubricante que debe investigarse,
- b) evaluar la estabilidad de la formulación a base de proteína respecto a dicho lubricante o lubricantes mediante un procedimiento según el primer aspecto de la presente invención,
- c) determinar la sensibilidad de la formulación a base de proteína respecto a la interacción definida en la etapa b),
- d) seleccionar un lubricante que causa una interacción no sensible con la formulación a base de proteína o adaptar la formulación a base de proteína mediante un procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención.

Dicho procedimiento permite seleccionar el lubricante más adaptado a una formulación a base de proteína específica.

Más exactamente, la etapa b) permite la identificación de por lo menos un componente de la formulación a base de proteína que interactúa con por lo menos un lubricante que debe investigarse de la etapa a). Dicho componente se identifica mediante la comparación de la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante con la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre cada componente del amortiguador y el lubricante, según el primer aspecto de la invención.

Es decir, dicha última comparación de la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre cada componente del amortiguador y el lubricante sólo resulta necesaria en el caso de que todos los lubricantes interactúen con la formulación a base de proteína. De otra manera, debería seleccionarse el lubricante que no interactúa con la formulación a base de proteína.

Una vez se ha identificado el componente de la formulación a base de proteína que interactúa con el lubricante, según la etapa b), la etapa c) permite además la determinación de la sensibilidad de la formulación a base de proteína respecto a la interacción entre dicho componente y el lubricante. Entonces, en el caso en que por lo menos un lubricante cause una interacción no sensible con la formulación a base de proteína, se selecciona dicho lubricante. En el caso de que todos los lubricantes causen una interacción sensible con la formulación a base de proteína, la formulación a base de proteína se adapta mediante la adición de un adyuvante a la formulación que produce una mayor reducción en el tiempo de la tensión interfacial o la presente investigación puede perseguirse con otros lubricantes.

Las etapas a) y b) son rápidas y económicas. La determinación de la sensibilidad de una proteína basada en una proteína respecto a una interacción según las etapas c) y d) puede requerir, sin embargo, experimentos adicionales conocidos por el experto en la materia y seleccionados según la interacción particular que se investiga. Por ejemplo, en el caso de que se identifique una interacción entre un amortiguador y el lubricante, puede requerirse un control del pH. Sin embargo, en el caso de que se produzca una interacción limitada con la proteína, la investigación de la estructura y el plegamiento de dicha proteína interactuante puede requerir difracción circular, espectroscopia de infrarrojos y Raman o resonancia magnética nuclear.

De esta manera, se utiliza la tensión interfacial como potente herramienta para investigar la estabilidad de una formulación a base de proteína en un recipiente lubricado. En el caso de que se detecte una interacción, la tensión interfacial asimismo es una guía preciosa para la adaptación de la formulación a base de proteína al recipiente lubricado o para la selección de un lubricante compatible con la formulación a base de proteína.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que representa la reducción en el tiempo de la tensión interfacial de dos vacunas contra la meningitis: la vacuna A y la vacuna B, y su amortiguador respectivo, es decir, el amortiguador de la vacuna A y el amortiguador de la vacuna B, que son formulaciones de vacuna sin proteína de vacuna.

10

Las figuras 2A-2D son gráficos que representan la concentración de partículas medida mediante imágenes de microflujo para la vacuna A, el amortiguador de la vacuna A (figuras 2A y 2C), la vacuna B y el amortiguador de la vacuna B (figuras 2B y 2D), respectivamente. Las figuras 2A y 2B son concentraciones de partículas globulares y las figuras 2C y 2D son concentraciones de partículas no globulares.

15

Las figuras 3A-3D son gráficos que representan la concentración de partículas medida mediante medición de la masa por resonancia para la vacuna A, el amortiguador de la vacuna A (figuras 3A y 3C), la vacuna B y el amortiguador de la vacuna B (figuras 3B y 3D), respectivamente. Las figuras 3A y 3B son concentraciones de partículas positivas y las figuras 3C y 3D son concentraciones de partículas no negativas.

20

La figura 4 es un gráfico de flujo que resume el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

25

La figura 5 es un gráfico que representa la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre el aceite de silicona y polisorbato-80, respectivamente, a una concentración de 3×10^{-6} M (cruces), polisorbato-80 a una concentración de 3×10^{-4} M (triángulos), vacuna B (círculos blancos) y vacuna B con polisorbato-80 a una concentración de 3×10^{-4} M (círculos negros).

30

Las figuras 6A y 6B son gráficos que representan la concentración de partículas medida mediante imágenes de microflujo para vacuna B, amortiguador de vacuna B y vacuna B con polisorbato-80, respectivamente, a una concentración de 3×10^{-4} M y amortiguador de vacuna B con polisorbato-80 a una concentración de 3×10^{-4} M.

35

Las figuras 7A y 7B son gráficos que representan la concentración de partículas medida mediante imágenes de microflujo para vacuna B, amortiguador de vacuna B y vacuna B con polisorbato-80, respectivamente, a una concentración de 3×10^{-4} M y amortiguador de vacuna B con polisorbato-80 a una concentración de 3×10^{-4} M.

40

La figura 8 es un gráfico que representa la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre el aceite de silicona e insulina a una concentración de 1 g/l, polisorbato-80 a una concentración de 10^{-4} M (rombos), polisorbato-80 a una concentración de 3×10^{-4} M (triángulos) e insulina adaptada con polisorbato-80 a una concentración de 10^{-4} M (cuadrados), respectivamente.

45

La figura 9 es un gráfico que representa la reducción en el tiempo de la tensión interfacial en el tiempo entre aceite de silicona y amortiguador de vacuna A (círculos blancos), hidróxido de aluminio (triángulos blancos), vacuna A (círculos negros) y vacuna con hidróxido de aluminio (círculos negros), respectivamente.

La figura 10 es un gráfico de flujo que resume el procedimiento según el tercer aspecto de la presente invención.

Descripción detallada de formas de realización de la invención

En la presente memoria, un recipiente lubricado puede ser cualquier recipiente adaptado para almacenar una formulación a base de proteína y que comprende un tapón y un lubricante destinado a facilitar el deslizamiento del tapón dentro del recipiente. Dicho recipiente puede ser, por ejemplo, un vial, un cartucho o una jeringa. La expresión "formulación a base de proteína" se utiliza para cualquier formulación farmacéutica profiláctica o terapéutica que contiene un péptido, una proteína o un derivado de proteína. El término "vacuna" se utiliza para una formulación de vacuna que incluye la proteína de vacuna y todos los adyuvantes y solventes. Se utiliza "proteína de vacuna" para referirse a la proteína de vacuna sola, incluyendo los antígenos y la proteína portadora, aunque sin los adyuvantes y solventes. Se utiliza "amortiguador de vacuna" para referirse a una formulación de vacuna sin la proteína de vacuna, es decir sólo adyuvantes y solventes.

Se define la tensión interfacial como la tensión existente en la interfaz entre dos líquidos no miscibles que resulta de la diferencia entre las interacciones intermoleculares en dichos dos líquidos. En la masa de un líquido, cada molécula resulta igualmente atraída en cada dirección por las moléculas vecinas. Sin embargo, las moléculas situadas en la interfaz con un líquido no miscible no resultarán atraídas por las moléculas del otro líquido, sino sólo por sus vecinas similares. Esto da como resultado una tensión que induce la contracción de la superficie del líquido para minimizar la energía interfacial. La presente invención utiliza la tensión interfacial como herramienta innovadora en el campo de las formulaciones a base de proteína.

65

Un primer aspecto de la invención es utilizar la tensión interfacial en un procedimiento para evaluar la estabilidad de la formulación a base de proteína respecto a un lubricante de un recipiente lubricado. Se ha demostrado el interés de dicho procedimiento con dos vacunas policonjugadas contra la meningitis: las vacunas A y B, en presencia de un aceite de silicona utilizado comúnmente, es decir, poli-(dimetilsiloxano) - ver la sección de Materiales y procedimientos.

Se llevó a cabo el procedimiento siguiente para ambas vacunas, A y B:

En una primera etapa, se evaluó la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre el amortiguador de vacuna y el aceite de silicona (poli-(dimetilsiloxano), obteniendo una curva 1. Tal como se ha mencionado anteriormente, un amortiguador de vacuna corresponde a la formulación de vacuna sin la proteína de vacuna.

En una segunda etapa, se evaluó la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la vacuna y el aceite de silicona, obteniendo una curva 2.

Las curvas 1 y 2 se compararon en una tercera etapa, por ejemplo mediante superposición en el mismo gráfico, tal como se muestra en la figura 1.

En términos generales, tal como se muestra en la figura 1, tanto la vacuna A como la vacuna B condujeron a una reducción significativa de la tensión interfacial con el aceite de silicona en el tiempo. De esta manera, dichas reducciones obtenidas con ambas vacunas demuestran la existencia de una interacción entre el aceite de silicona y las vacunas, conduciendo dicha interacción a una estabilización de la interfaz y, de esta manera, a la reducción de la tensión entre la vacuna y el aceite de silicona no miscible.

Sin embargo, las curvas obtenidas para la vacuna A y la vacuna B presentan dos perfiles diferentes. En efecto, en el caso de la vacuna A, la curva (triángulos negros en la figura 1) se reduce constantemente con una pendiente moderada que conduce a una reducción de la tensión interfacial de aproximadamente 13% (de 41.6 a 36.2 mN/m) durante la duración del experimento (es decir, 500 segundos). En contraste, la curva de tensión interfacial obtenida con la vacuna B (círculos negros en la figura 1) muestra una pendiente significativa durante los primeros 15 segundos y alcanza una reducción superior a 20% al final del experimento (de 43.9 a 35.0 mN/m) durante el mismo periodo.

A continuación, respecto a las curvas obtenidas con los amortiguadores de las vacunas A (triángulos blancos en la figura 1) y B (círculos blancos en la figura 1), no se observó una reducción significativa de la tensión interfacial en el tiempo, lo que indica que ninguna interacción es capaz de estabilizar la interfaz, que se mantiene en un estado de alta tensión. Debido a que se observa una reducción de la tensión interfacial en el tiempo con las vacunas y no con los amortiguadores de vacuna (las formulaciones de vacuna sin las proteínas de vacuna), puede concluirse que las proteínas de vacuna son responsables de la reducción de la tensión interfacial en el tiempo. De esta manera, estos resultados demuestran una interacción significativa entre ambas proteínas de vacuna y el aceite de silicona, en los que la vacuna B presenta una interacción más elevada con el aceite de silicona que la vacuna A.

Sin restringirse a ninguna teoría, lo anterior puede explicarse por una migración de la proteína de vacuna B a la interfaz con el aceite de silicona, que conduce a una rápida reducción (en los primeros 15 segundos) de la tensión interfacial. Una vez en la interfaz, la proteína de la vacuna B puede desplegarse en conformaciones energéticamente más favorables, proporcionando una reducción adicional de la tensión interfacial. A continuación, las proteínas desplegadas pueden interactuar con la formulación de vacuna y producir agregados de proteína, proporcionando la interfaz entre el aceite de silicona y la vacuna B, de esta manera, sitios de nucleación para la agregación de las proteínas de vacuna.

En contraste, la vacuna A muestra una interacción más limitada con el aceite de silicona, indicando una lenta migración de las proteínas hacia la interfaz y una producción limitada de agregados de proteínas.

Este análisis resulta corroborado por los resultados obtenidos con dos técnicas analíticas diferentes: las imágenes de microflujo (MFI™) y las mediciones de masa por resonancia (RMM).

La MFI™ es una tecnología microscópica de flujo que captura imágenes de partículas en suspensión en una corriente de flujo. Se encuentran disponibles diferentes puntos prefijados de ampliación para adaptarse a los tamaños de partícula deseados y a la calidad de la imagen. Las imágenes de las partículas a continuación pueden analizarse adicionalmente para discriminar las partículas globulares respecto de las partículas no globulares. En el presente caso, las partículas globulares pueden atribuirse a partículas de silicona, mientras que las partículas no globulares pueden atribuirse a agregados de proteínas, es decir, proteínas desplegadas que se han agregado entre sí.

En el presente experimento, se llenaron jeringas lubricadas con aceite de silicona, con vacuna A, amortiguador de vacuna A, vacuna B y amortiguador de vacuna B, respectivamente. A continuación, se midieron las concentraciones

de partículas globulares y de partículas no globulares poco después del llenado (T0) y después de una incubación de 7 días a 25°C (T7).

5 Los datos obtenidos mediante MFI™ son visibles en las figuras 2A-2D, en donde las figuras 2A y 2B representan las concentraciones en número (partículas por centímetro cúbico) de partículas globulares y las figuras 2C y 2D representan las concentraciones de partículas no globulares. Las concentraciones de partículas medidas para la vacuna A y el amortiguador de vacuna A se representan en las figuras 2A y 2C, mientras que las figuras 2B y 2D representan la concentración medida para la vacuna B y el amortiguador de vacuna B.

10 Tal como se observa en la figura 2A, las concentraciones de partículas globulares se mantienen un valor limitado de 369 partes/cm³ para la vacuna A y de 1172 part./cm³ para el amortiguador de vacuna A después del almacenamiento. A continuación, en referencia a la vacuna B, en la figura 2B resulta visible una concentración muy elevada de partículas globulares, de hasta 7543 part./cm³ después del llenado y de 13959 part./cm³ después de una incubación de 7 días, mientras que el amortiguador de vacuna B produjo concentraciones de partículas inferiores a 1800 part./cm³.

15 Se obtuvo un resultado similar con partículas no globulares, atribuidas a agregados de proteínas, tal como se observa en las figuras 2C y 2D. En efecto, se midieron concentraciones limitadas de 673 partículas por cm³ para las jeringas lubricadas llenas de vacuna A y de 283 part./cm³ para el amortiguador de vacuna A, tras 7 días (figura 2C), aunque se alcanzó una concentración muy elevada de partículas no globulares en las jeringas lubricadas llenas con vacuna B (figura 2D), superior a 21000 part./cm³ tras 7 días. Nuevamente, el amortiguador de vacuna B sólo produce una cantidad limitada de 444 part./cm³ de partículas no globulares al incubarla durante 7 días en un recipiente lubricado.

20 Estos resultados demuestran una fuerte interacción entre la proteína de la vacuna B y el aceite de silicona, de acuerdo con los resultados obtenidos con el procedimiento según el primer aspecto de la invención, basados en la reducción de la tensión interfacial.

25 Además de MFI™, se recogieron datos mediante la utilización de las mediciones de masa por resonancia (RMM). La RMM se basa en un circuito de microfluidos vibratorio que permite la determinación del número y tamaño de partículas que circulan por el mismo, mediante la medición del desplazamiento de las frecuencias de vibración. Dicho experimento permite medir partículas de tamaño más pequeño que MFI™, así como discriminar las gotas de aceite de silicona respecto de los agregados de proteínas, ya que el desplazamiento de la frecuencia de vibración depende de la masa de las partículas. En consecuencia, las partículas con una densidad más baja que el medio de análisis (el amortiguador de vacuna correspondiente en el presente experimento) proporcionan un desplazamiento positivo y pueden atribuirse al aceite de silicona. En contraste, las partículas con una densidad más alta que el medio de análisis proporcionan un desplazamiento negativo y pueden atribuirse a agregados de proteínas.

30 Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 3A-3D: las figuras 3A y 3B corresponden a la concentración de partículas positivas, mientras que las figuras 3C y 3D proporcionan la concentración de las partículas negativas. Los datos obtenidos muestran concentraciones bajas de partículas positivas, de 79,933 part./cm³ (atribuidas al aceite de silicona) para la vacuna A y de 25,867 part./cm³ para el amortiguador de vacuna A, después de la mezcla (T0), e incluso concentraciones más bajas después de un almacenamiento de 7 días (T7, ver la figura 3A). En contraste, tal como se observa en la figura 3B, la vacuna B produce una concentración elevada de partículas positivas (superior a 1x10⁶ partículas por cm³) durante la incubación en un recipiente lubricado, mientras que el amortiguador de la vacuna A o B no produce una concentración de partículas significativa, inferior a 95,000 part./cm³. A continuación, en referencia a las mediciones de partículas negativas, atribuidas a agregados de proteínas (figuras 3C y 3D): la vacuna A y el amortiguador de vacuna A no producen una concentración significativa de partículas, inferior a 100,000 part./cm³, al igual que el amortiguador de vacuna B, inferior a 170,000 part./cm³. Por el contrario, las jeringas lubricadas llenas de vacuna B producen una concentración significativa, superior a 460,000 partículas negativas por centímetro cúbico tras la mezcla (T0); esta concentración muestra una elevación drástica tras siete días (T7), superior al 600%, alcanzando 3.1x10⁶ partículas por cm³.

35 De esta manera, resulta posible concluir a partir de dichos diferentes experimentos que se produce una interacción significativa entre la vacuna B y el aceite de silicona. Dicha interacción puede atribuirse a la naturaleza de la proteína de vacuna presente en la vacuna B, ya que el amortiguador de vacuna B no produce una concentración significativa de partículas en presencia de aceite de silicona.

40 Por lo tanto, los resultados de los experimentos tanto de MFI™ como de RMM proporcionan una fuerte corroboración de la conclusión alcanzada mediante el procedimiento según la presente invención con la medición de la tensión interfacial: la vacuna B es incompatible con el aceite de silicona, y la formulación de la vacuna B o el aceite de silicona como lubricante deben cambiarse a fin de proporcionar una vacuna B estable en un recipiente prerrelleno lubricado con aceite de silicona. Lo anterior asimismo valida la tensión interfacial como una herramienta rápida y potente para obtener un conocimiento de la estabilidad de una formulación a base de proteína en un recipiente lubricado. En efecto, la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre un lubricante y una

formulación a base de proteína, tal como una vacuna, se correlaciona con una baja estabilidad y la generación de una fuerte concentración de agregados de proteínas.

5 Con respecto a las partículas atribuidas al aceite de silicona, los diferentes resultados obtenidos entre la concentración moderada de partículas globulares medida mediante MFI™ y la elevada concentración de partículas positivas medida mediante RMM podría estar asociada a los diferentes tamaños de partícula observados mediante dichas técnicas. En particular, MFI™ observa partículas con diámetros de entre 1 y 100 micras, mientras que la RMM detecta partículas de diámetros entre 0,05 y 5,00 micras. Asimismo es conocido que el polisorbato-80 es capaz de estabilizar las burbujas de aire en forma de partículas de tamaño pequeño, lo que se observa eficazmente mediante RMM en forma de partículas positivas.

10 En los ejemplos de las vacunas A y B, sólo se evaluó la dependencia del tiempo de la tensión interfacial entre el amortiguador de vacuna y el lubricante en la primera etapa del procedimiento, ya que se produjo una interacción entre el lubricante y la proteína de la vacuna. Sin embargo, otros componentes del amortiguador pueden interactuar con el aceite de silicona, conduciendo este caso a evaluar la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre los componentes de la formulación y el lubricante a fin de identificar, en la tercera etapa, qué componentes son responsables de la interacción. En efecto, algunos componentes del amortiguador asimismo pueden producir una fuerte interacción con el lubricante, resultando en la producción de partículas, la degradación de la proteína terapéutica o como mínimo la desestabilización de la formulación a base de proteína.

15 El gráfico de flujo presentado en la figura 4 resume las diferentes etapas de un procedimiento general para evaluar la estabilidad de cualquier formulación a base de proteína respecto a un lubricante en un recipiente lubricado. En la etapa 100, se evalúa la tensión interfacial entre el amortiguador y el lubricante.

20 Por ejemplo, en el caso de que la tensión interfacial entre el amortiguador y el lubricante se reduzca en el tiempo en la primera etapa del procedimiento (rama d), entonces se requiere una etapa intermedia 101 para evaluar la tensión interfacial entre cada componente del amortiguador de la formulación y el lubricante. Alternativamente, en el caso de que la tensión interfacial entre el amortiguador y el lubricante se encuentre que es estable (rama s), puede llevarse a cabo directamente la segunda etapa 102. En dicha segunda etapa 102 del procedimiento, se evalúa la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante. En el caso de que se observe estabilidad en dicha etapa, podría concluirse que la formulación a base de proteína es estable en el recipiente lubricado a estudio ('rama s') y que puede llevarse a cabo la siguiente etapa de desarrollo, P.

25 Sin embargo, en caso de que se detecte cualquier interacción a partir de una reducción de la tensión interfacial ('rama d'), entonces se requerirá la identificación de qué componente interactúa de hecho, en una tercera etapa 103 del presente procedimiento. Lo anterior permite, en una cuarta etapa 104, investigar la sensibilidad de la formulación a base de proteína respecto a la interacción identificada en la tercera etapa. En efecto, puede resultar aceptable una interacción limitada de un componente de la formulación con el lubricante, por ejemplo en el caso de que dicho componente se introduzca en una concentración significativa y/o en el caso de que su función no resulte impedida por la interacción. De esta manera, pueden resultar necesarios otros experimentos para determinar si la interacción afecta de hecho la estabilidad o la potencia de la formulación a base de proteína. Por ejemplo, en el caso de que se identifique una interacción entre el agente tamponador del pH y el lubricante en la tercera etapa 103 del procedimiento, puede resultar necesario comprobar el pH de la formulación a base de proteína después del envejecimiento, a fin de determinar si la formulación a base de proteína todavía se encuentra al pH requerido. De manera similar, en el caso de que se encuentre que un secuestrante de oxígeno interactúa con el lubricante, puede resultar necesario investigar la oxidación de la proteína después del envejecimiento, ya que el oxígeno puede competir con el lubricante y cancelar la interacción con el secuestrante. En el caso de que la formulación a base de proteína no sea sensible a la interacción (rama NS), entonces puede resultar posible continuar con la siguiente etapa de desarrollo P de la formulación a base de proteína. Sin embargo, en el caso de que se encuentre que la formulación a base de proteína es sensible a la interacción particular (rama S), podría resultar necesaria una adaptación de la formulación a base de proteína o del lubricante (etapa 105).

30 En términos generales, una interacción entre la proteína y algunos componentes críticos, tales como el escualeno en el caso de una vacuna en emulsión adyuvante, puede no requerir experimentos adicionales ya que la elevada sensibilidad de la formulación a base de proteína respecto a dichas interacciones resulta evidente o está bien documentada. En estos casos, puede resultar necesario adaptar la formulación a base de proteína o el lubricante, sin determinar la sensibilidad de la formulación a base de proteína, en la cuarta etapa opcional 104.

35 Según un segundo aspecto de la invención, se utiliza la tensión interfacial en un procedimiento para adaptar una formulación a base de proteína a un recipiente lubricado. Tal como se ha indicado anteriormente, una manera de superar dicha incompatibilidad entre una formulación a base de proteína y un lubricante podría ser adaptar la formulación a base de proteína a fin de evitar la interacción no deseada determinada en el procedimiento según el primer aspecto de la invención.

40 La adaptación de una formulación a base de proteína a un recipiente lubricado puede conseguirse mediante la adición de un componente de formulación que establece una interacción competitiva, es decir, cinética o

termodinámicamente más favorable que la interacción entre el componente interactuante identificado y el lubricante. La interacción competitiva puede producirse entre el componente adicional y el lubricante, o entre el componente adicional y la formulación a base de proteína.

5 De esta manera, un primer enfoque es evitar la interacción entre la formulación a base de proteína y el lubricante mediante la creación de una interacción competitiva más fuerte entre un componente adicional del amortiguador y el lubricante. Dicho componente adicional puede ser un nuevo componente de la formulación a base de proteína o un componente ya presente, con la condición de que la concentración del componente pueda modificarse significativamente sin afectar a la estabilidad de la formulación a base de proteína.

10 Dicho primer enfoque ha sido investigado por el solicitante en el ejemplo de la vacuna B. En efecto, el procedimiento según el primer aspecto de la invención demuestra una incompatibilidad entre la proteína de la vacuna B y el aceite de silicona. Sin embargo, la vacuna B comprende polisorbato-80 como tensioactivo no iónico (ver la sección de Materiales y procedimientos) y este componente es capaz de competir con la proteína de la vacuna B en la interacción con el aceite de silicona.

15 Con el fin de determinar la concentración apropiada de polisorbato-80, se ha evaluado la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre diferentes concentraciones de polisorbato-80 y el aceite de silicona, y se ha comparado con la reducción producida por la vacuna B.

20 En la figura 5, la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre polisorbato-80 a concentraciones de 3×10^{-6} M y 3×10^{-4} M y el aceite de silicona está superpuesta a la reducción de la tensión interfacial entre la vacuna B y el aceite de silicona. En el caso de que una concentración de polisorbato-80 de 3×10^{-6} M sólo produzca una reducción limitada de 41 a 36 mN/m, una concentración de 3×10^{-4} M produce una reducción drástica de la tensión interfacial que alcanza un mínimo de 14 mN/m, muy inferior al mínimo obtenido con la vacuna B con 36 mN/m. Este resultado indica que la vacuna B puede adaptarse para ser estable con el aceite de silicona mediante fijación de la concentración del polisorbato-80 en 3×10^{-4} M. Esta formulación adaptada a continuación se ha denominado vacuna B + PS80 en los siguientes estudios, y el amortiguador correspondiente, amortiguador de vacuna B + PS80.

30 A continuación, se evaluó la estabilidad de vacuna B + PS80 mediante experimentos de imágenes de microflujo (MFI™) y medición de masas por resonancia (RMM).

35 Las figuras 6A y 6B muestran la concentración de partículas producidas por vacuna B y por vacuna B + PS80 medida mediante MFI™, así como la concentración de partículas para el amortiguador de vacuna B y amortiguador de vacuna B + PS80, en todos los casos después de siete días de incubación en una jeringa lubricada con aceite de silicona. La figura 6A presenta la concentración de partículas globulares (atribuidas al aceite de silicona), mientras que la figura 6B presenta la concentración de partículas no globulares (atribuidas a agregados de proteínas). En el presente experimento, se descubrió que la concentración de partículas globulares (figura 6A) producidas mediante la formulación adaptada, es decir vacuna B+PS80, era prácticamente la mitad de la concentración producida mediante la fórmula original (vacuna B), de 13959 a 7533 part./cm³. Con respecto a las partículas no globulares, atribuidas a agregados de proteínas (ver la figura 6B), la formulación modificada de vacuna B+PS80 únicamente producía una concentración de 1887 part./cm³, que es aproximadamente 9% de la concentración de 21826 part./cm³ producida por la vacuna B.

45 Los resultados de RMM se muestran en las figuras 7A y 7B, donde la figura 7A muestra la concentración de partículas positivas (atribuidas a partículas de silicona) y la figura 7B, la concentración de partículas negativas (atribuidas a agregados de proteínas). Tras 7 días de incubación, la formulación adaptada (vacuna B+PS80) producía una concentración más elevada de partículas positivas que la vacuna B, superior a 2×10^6 part./cm³. Sin embargo, la concentración de partículas negativas producida por vacuna B+PS80 se redujo a 72667 part./cm³, que es aproximadamente 3.3% de la concentración producida por la vacuna B.

50 Estos resultados experimentales proporcionan una corroboración de la fuerte reducción de la interacción entre la vacuna B y el lubricante de aceite de silicona tras la adición de polisorbato-80, según el procedimiento del segundo aspecto de la invención. El polisorbato-80 compite con éxito con la proteína de vacuna B en la interacción con la proteína, bloqueando eficientemente el polisorbato-80 la interacción entre la proteína de vacuna B y el aceite de silicona. De esta manera, dicho procedimiento permite la adaptación de una formulación a base de proteína a un lubricante dado y en este caso permite el almacenamiento seguro de la vacuna B en un recipiente lubricado, tal como una jeringa prerrellena. Aunque se ha utilizado el polisorbato-80 para adaptar la vacuna B, pueden resultar apropiados otros tensioactivos no iónicos, con la condición de que resulten compatibles con la proteína y los demás componentes de la formulación.

Se ha investigado un enfoque similar con la insulina, que es otra formulación común basada en una proteína.

65 A continuación, en referencia a la figura 8, la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre una formulación de insulina y el aceite de silicona demuestra una interacción significativa. La formulación de insulina se ha adaptado con éxito al aceite de silicona mediante la adición de polisorbato-80 a una concentración de 1×10^{-4} M y se denomina

“insulina+PS80” en la figura 8. La formulación de insulina+PS80 produce una mayor reducción de la tensión interfacial en el tiempo con aceite de silicona, hasta 17 mN/m, que la reducción observada con la formulación de insulina original (23 mN/m en 100 s). Sin embargo, la superposición de las curvas de tensión interfacial del polisorbato-80 y la formulación de insulina adaptada permite concluir que únicamente el polisorbato-80 interactúa con el aceite de silicona, enmascarando eficientemente la interacción no deseada con la insulina.

Un segundo enfoque investigado por el solicitante fue añadir un componente adicional que interactuaba con la proteína de una formulación inestable basada en una proteína. En efecto, la carga neta de la proteína de la vacuna A es negativa y puede formarse un complejo con cationes de aluminio. De esta manera, se adaptó la vacuna A mediante la introducción de 2 g/dm³ de hidróxido de aluminio, denominando a la formulación adaptada, “vacuna A+HA”).

La figura 9 sigue la reducción de la tensión interfacial en el tiempo entre el aceite de silicona y el amortiguador de vacuna A, la vacuna A y vacuna A+HA (la formulación adaptada), respectivamente. Aunque se observa una reducción de la tensión interfacial de 43 a 36 mN/m entre la vacuna A y el aceite de silicona como resultado de la interacción anteriormente demostrada, tal como anteriormente, vacuna A+HA únicamente produce una reducción limitada de la tensión interfacial a 42 mN/m. Dicha reducción es similar a la reducción producida por el amortiguador de la vacuna A durante el mismo periodo. Por lo tanto, se infiere que vacuna A+HA almacenada en un recipiente lubricado con aceite de silicona producirá una concentración limitada de partículas, de manera similar a la obtenida para el amortiguador de vacuna A y tal como se muestra en las figuras 2A, 2C, 3A y 3C. Al contrario que el primer enfoque, en que el polisorbato-80 competía con éxito con la proteína de vacuna B interactuando con el aceite de silicona, la interacción entre la proteína de vacuna A y el aceite de silicona en dicho segundo enfoque se ha bloqueado mediante la formación de un complejo de proteína de vacuna. Dicho complejo de proteína de vacuna no puede interactuar con el aceite de silicona y vacuna A+HA es tan estable como el amortiguador de vacuna A. Por lo tanto, este resultado demuestra una adaptación eficiente de la vacuna A mediante la adición de una sal acomplejante. En el ejemplo, posteriormente, se utilizó hidróxido de aluminio, aunque podría haberse seleccionado otra sal, tal como fosfato de aluminio.

Según un tercer aspecto de la invención, se utiliza la tensión interfacial en un procedimiento para seleccionar un lubricante adaptado a un recipiente destinado a almacenar una formulación a base de proteína.

En referencia a la figura 10, la reducción de la tensión interfacial en el tiempo entre la formulación a base de proteína y cada lubricante investigado se evalúa en una primera etapa 201. En el caso de que se identifique un lubricante no produce una reducción significativa, es decir, que no produce ninguna interacción con la formulación a base de proteína (rama s), entonces resulta posible seleccionarlo y seguir con la siguiente etapa P del procedimiento de formulación.

Sin embargo, en el caso de que todos los lubricantes interactúen con la formulación a base de proteína (rama d), la reducción de la tensión interfacial en el tiempo entre cada componente del amortiguador y cada lubricante investigado debe evaluarse en una segunda etapa 202. Dicha etapa permite determinar en una tercera etapa 203 qué componente o componentes de la formulación a base de proteína interactúan realmente con qué lubricantes. En la presente etapa, puede seleccionarse un lubricante que no interactúe con la proteína de la formulación a base de proteína, para la investigación posterior, mientras que puede descartarse un lubricante que interactúe con la proteína.

Con estos datos, puede determinarse en una cuarta etapa 204 si la formulación a base de proteína es sensible a la interacción con el lubricante seleccionado, mediante la realización de experimentos adicionales. Dichos experimentos pueden implicar procedimientos de recuento de partículas, tales como MFITM o RMM (medición de la masa por resonancia), técnicas estructurales, tales como la resonancia magnética nuclear o el difracción circular, y otras técnicas, tales como la cromatografía líquida, la cromatografía de exclusión por tamaño, la pH-ímetría, los inmunoensayos o los experimentos in vivo, dependiendo del componente de la formulación a base de proteína que interactúa con el lubricante. En efecto, algunas interacciones podrían resultar aceptables, ya que no perjudican la potencia o la estabilidad de la formulación a base de proteína. En el caso de que se encuentre un lubricante que produce una interacción no sensible con la formulación a base de proteína en dicha cuarta etapa 204 (rama NS), podrá seleccionarse antes de continuar a la siguiente etapa de desarrollo P de la formulación a base de proteína. Sin embargo, en el caso de que todos los lubricantes produzcan interacciones sensibles con la formulación a base de proteína (rama S), puede resultar necesario, en una quinta etapa 205, adaptar la formulación a base de proteína tal como se ha indicado en el segundo aspecto de la presente invención, o continuar la presente investigación con otros lubricantes.

Materiales y procedimientos

Soluciones

Los procedimientos de la presente invención se investigaron con dos vacunas de la meningitis poli-conjugadas diferentes: la vacuna A y la vacuna B, ambas con únicamente un serotipo. Estas vacunas se adquirieron

comercialmente. El amortiguador de la vacuna A contenía 7 mg/ml de NaCl, 0.184 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.96 mg/ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 14.6 mg/ml de manitol. El amortiguador de la vacuna B contenía 9 mg/ml de NaCl; 1.335 mg/ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.345 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.68 mg/ml de KH_2PO_4 y 25 mg/ml de sacarosa. Todos los compuestos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich. La solución de hidróxido de aluminio (HA) se suministró en el kit de vacuna A adquirido, a una concentración de 2 mg/ml y, de esta manera, cumplía con los grados USP y EP.

El monooleado de polioxietilén-sorbitán, denominado polisorbato-80, o PS80, se adquirió en grado de biología molecular de Sigma-Aldrich bajo el nombre comercial TWEEN® 80. Se prepararon soluciones de PS80 con una concentración final de 3×10^{-4} M, 3×10^{-5} M y 3×10^{-6} M respectivamente. Se preparó vacuna B+PS80 a una concentración final de PS80 de 3×10^{-4} M.

El aceite de silicona era un poli-(dimetilsiloxano) (PDMS) de grado médico adquirido de Dow Corning bajo el nombre DC 360. Se investigó tanto 20 cSt como 1000 cSt en un estudio preliminar y se obtuvieron idénticas curvas de tensión interfacial con aire o solución amortiguador de fosfato, respectivamente. En consecuencia, se utilizó PDMS menos viscoso, de 20 cSt, proporcionando una curvatura de mayor pendiente para las mediciones de tensión interfacial (ver la sección de Material y procedimientos de mediciones de tensión interfacial).

Mediciones de tensión interfacial

La reducción de la tensión interfacial en el tiempo se midió utilizando un tensiómetro de análisis del perfil (tensiómetro PAT-1M, SINTERFACE Technologies, Berlin, Alemania) basado en la técnica de la gota colgante. El tensiómetro PAT-1M genera gotas en aire o líquido con un sistema de dosificación controlada, capturando la formación de gotas mediante una videocámara de alta definición. El software del tensiómetro Sinterface PAT-1M permite la adquisición de imágenes, la detección de contornos y la utilización de la ecuación de Young-Laplace para determinar la tensión interfacial. La temperatura de la medición en la celda de vidrio de 20 ml se controló en $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. La celda se cerró con una tapa con un capilar sumergido de poli-(tetrafluoroetileno) (PTFE) que presentaba un diámetro externo de 1.0 mm. Se formó una gota de la solución estudiada en el extremo sumergido del capilar. En los presentes procedimientos, se formó una gota de vacuna, amortiguador de vacuna o formulación modificada en el medio de PDMS (20 cSt). Se controló la superficie de la gota en un valor constante durante todo el experimento mediante regulación automática. El volumen añadido a la gota durante el experimento asimismo se monitorizó continuamente. Se ajustaron las superficies de gota para cada experimento para permitir la monitorización de la curvatura de gota, de acuerdo con la ecuación de Young-Laplace. Como resultado, se utilizó una superficie de gota de 70 mm^2 para la solución sin PS80 o PS80 bajo el CMC (1×10^{-5} M), y 40 mm^3 para las demás soluciones.

Estudio de estabilidad

Se investigó la estabilidad de las formulaciones de vacuna A y de vacuna B en recipientes lubricados a fin de confirmar la correlación con las mediciones de tensión interfacial. Los recipientes eran jeringas de vidrio (Hypak™, 29G½, RNS BD260 Black, ultrabajo en tungsteno, BD - Pharmaceutical Systems, Le Pont-de-Claix, Francia) lubricadas con 0,4 mg de silicona con una boquilla sumergida. Todas las jeringas se taparon con tapones recubiertos no lubricados de 1 ml Hypak SCF.

Las jeringas se llenaron con la solución apropiada (vacuna o amortiguador) y se almacenaron en posición vertical (punta hacia arriba) a una temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad de $60\% \text{ HR} \pm 5\%$. Las jeringas se abrieron retirando cuidadosamente el tapón del émbolo y se transfirió la solución desde el apoyo de émbolo al interior de material de vidrio limpio. Se llevó a cabo el recuento de partículas en un MicroFluid Imaging™ (MFI™) y mediante un equipo Archimedes de medición de masas por resonancia (RMM) poco tiempo después del llenado y tras un almacenamiento de 7 días.

Procedimientos de recuento de partículas utilizados durante el estudio de estabilidad

Con el fin de estimar la concentración y tamaño de las partículas creadas durante el estudio de estabilidad, se utilizó un MFI™-DPA5200 serie A de Brightwell Technologies y un sistema Archimedes de medición de masas por resonancia (RMM) (Affinity Biosensors, Santa Barbara, California).

El instrumento MFI™-5200 estaba dotado de una celda de flujo de $100 \mu\text{m}$, operada a alta magnificación. Se utilizó el software MVSS versión 2.R3 y MVAS versión 1 (Protein-Simple) de MFI™ View para el análisis. Los equipos se calibraron inicialmente utilizando los estándares de tamaño de partícula trazable NIST de poliestireno de $10 \mu\text{m}$ (Duke Scientific Corp., Fremont, CA). Antes de cada muestreo, se lavó el sistema con líquido libre de partículas para proporcionar una línea base limpia y para optimizar la iluminación. A continuación, se insertaron cuidadosamente las muestras en la celda de flujo utilizando una bomba peristáltica. Se llevaron a cabo tres análisis individuales con 0,5 ml de volumen de flujo. Se construyeron filtros adaptados gracias al software MVAS del sistema MFI™. En concordancia con Sharma et al., PharmTech. 33:74-9, 2009, las gotas de aceite de silicona presentaban una relación de aspecto consistentemente más elevada en comparación con las partículas de proteínas agregadas

del mismo tamaño, lo que permite el uso de un filtro de software simple con una relación de aspecto (RA) >0.85 el valor de corte. Dicho filtro separa las poblaciones globulares de las no globulares y captura aproximadamente 95% a 98% de las partículas con morfología visiblemente fibrilar.

- 5 El sistema Archimedes se dotó de un microsensar Hi-Q (Affinity Biosensors) y se controló con el software ParticleLab versión 1.8. El sensor se enjuagó durante 60 s con agua purificada antes del análisis. Después, se eliminaron las posibles impurezas mediante por lo menos cinco operaciones “de estornudo” (se empujó el líquido en el sensor en ambas direcciones) y el sistema se enjuagó nuevamente durante 60 s con agua purificada. A
- 10 continuación, se cargó la solución de muestra durante 45 s tal como se indica en D. Weinbuch et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102:2152-65, 2013. Se configuró el análisis durante un periodo de 10 min. Se cargó una solución de muestra nueva para cada una de las mediciones por triplicado. La determinación del tamaño y la separación de las partículas por RMM se basa en el desplazamiento de la frecuencia y se explica en P. Dextras et al., *Analytical Chemistry* 81:4517-23, 2009.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína que comprende una proteína, un péptido y/o un derivado de proteína y un amortiguador con relación a un lubricante de un recipiente lubricado en el que dicha formulación está destinada a ser almacenada, que comprende:
- 10 a) evaluar una reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre el amortiguador y el lubricante,
- b) evaluar una reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante,
- 15 c) identificar por lo menos un componente de la formulación a base de proteína que interactúa con el lubricante comparando la reducción evaluada en la etapa b) con la reducción evaluada en la etapa a).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además evaluar una reducción de la tensión interfacial entre cada componente del amortiguador y el lubricante de la etapa a).
- 20 3. Procedimiento para mejorar la estabilidad de una formulación a base de proteína con relación a un lubricante de un recipiente lubricado en el que debe almacenarse dicha formulación, que comprende:
- 25 a) evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína con relación a dicho lubricante mediante un procedimiento según la reivindicación 1 o 2,
- b) seleccionar un adyuvante que produce una reducción más elevada en el tiempo de la tensión interfacial con el lubricante que la formulación a base de proteína,
- 30 c) adaptar la formulación a base de proteína añadiendo dicho adyuvante seleccionado a la formulación.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el adyuvante es un tensioactivo.
- 35 5. Procedimiento para mejorar la estabilidad de una formulación a base de proteína con relación a un lubricante de un recipiente lubricado en el que debe almacenarse dicha formulación, que comprende:
- a) evaluar la estabilidad de una formulación a base de proteína mediante un procedimiento según la reivindicación 1 o 2,
- 40 b) seleccionar un adyuvante apto para formar complejos con la proteína de la formulación a base de proteína,
- c) adaptar la formulación a base de proteína añadiendo dicho adyuvante a la formulación a base de proteína para reducir por lo menos parcialmente la reducción en el tiempo de la tensión interfacial entre la formulación a base de proteína y el lubricante.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el adyuvante añadido es una sal.
7. Procedimiento para seleccionar un lubricante adaptado a un recipiente destinado a almacenar una formulación a base de proteína, que comprende:
- 50 a) proporcionar por lo menos un lubricante que debe investigarse,
- b) evaluar la estabilidad de la formulación a base de proteína respecto a dicho por lo menos un lubricante mediante un procedimiento según la reivindicación 2,
- 55 c) determinar la sensibilidad de la formulación a base de proteína respecto a la interacción definida en la etapa b),
- d) seleccionar un lubricante que causa una interacción no sensible con la formulación a base de proteína o adaptar la formulación a base de proteína mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 6.

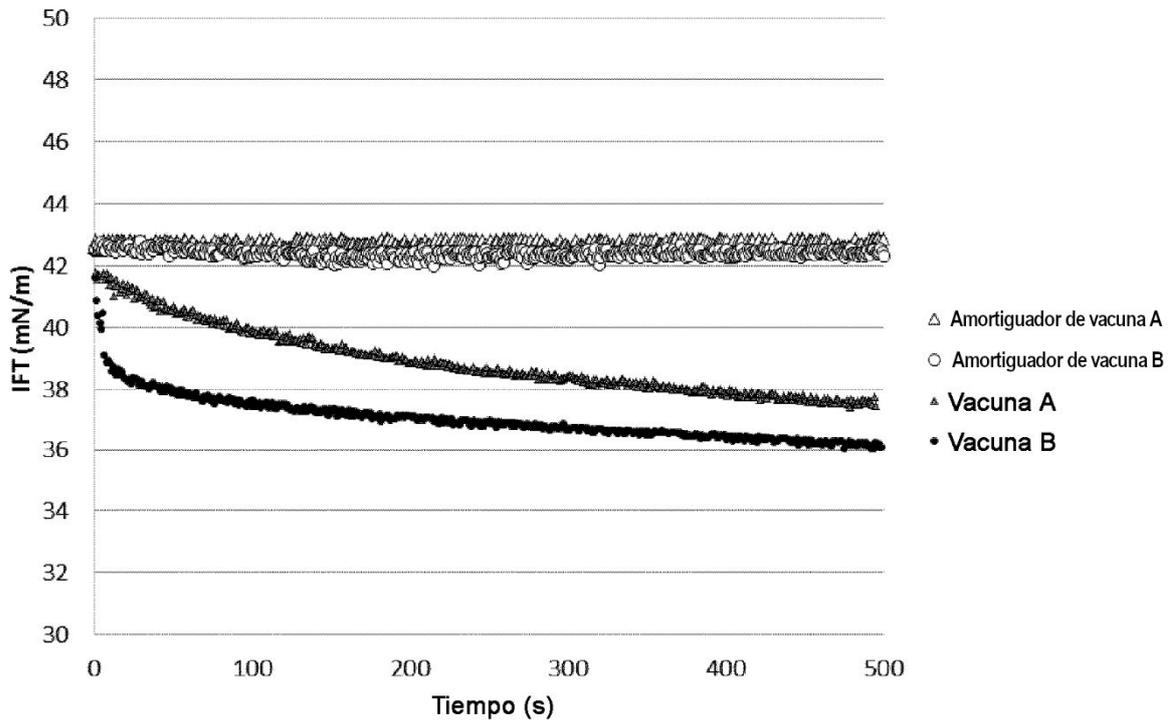


FIGURA 1

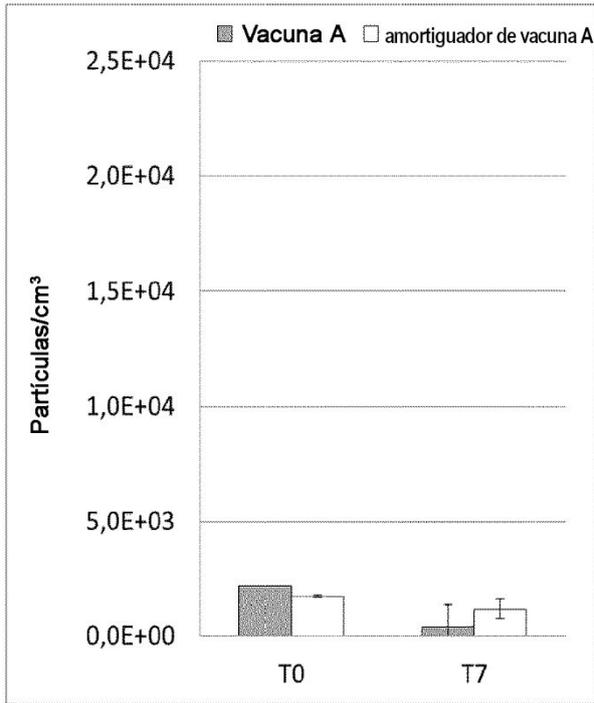


FIGURA 2A

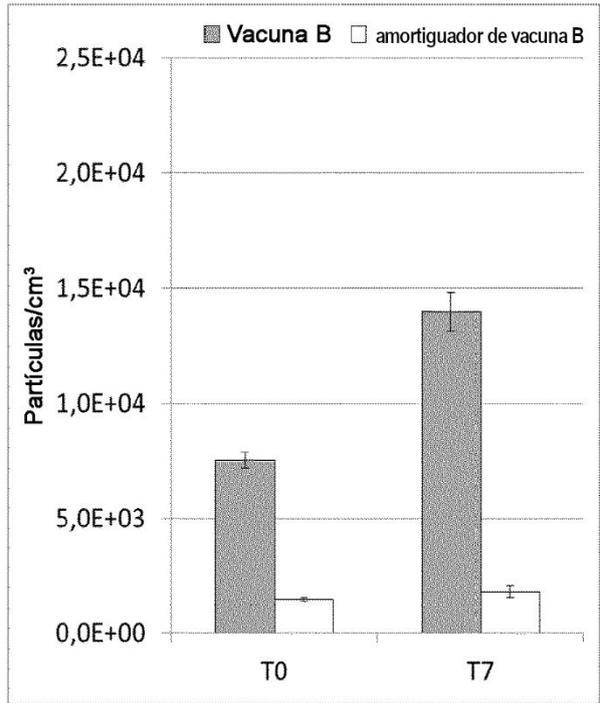


FIGURA 2B

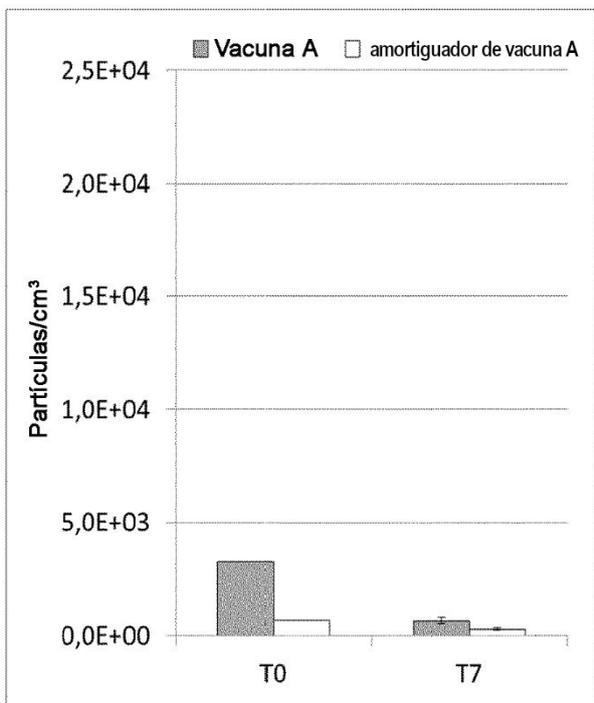


FIGURA 2C

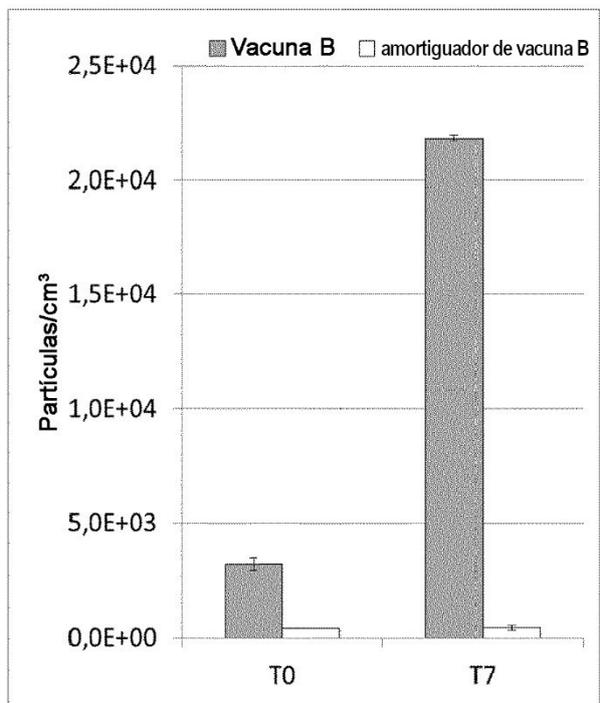


FIGURA 2D

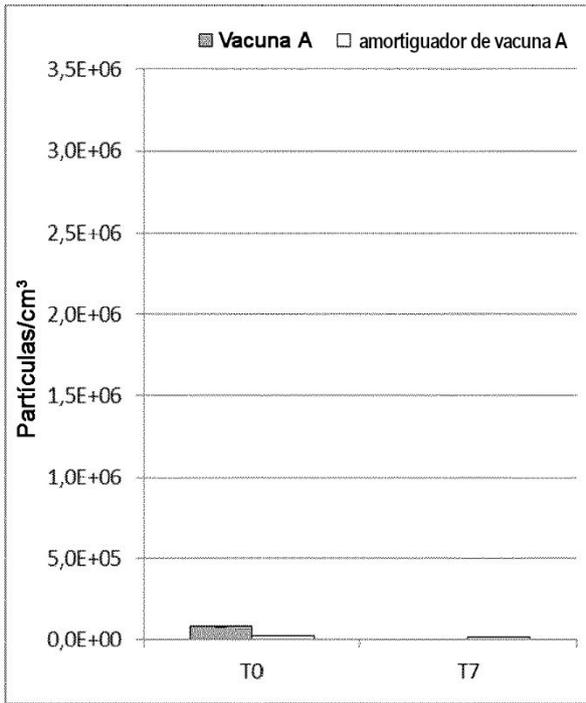


FIGURA 3A

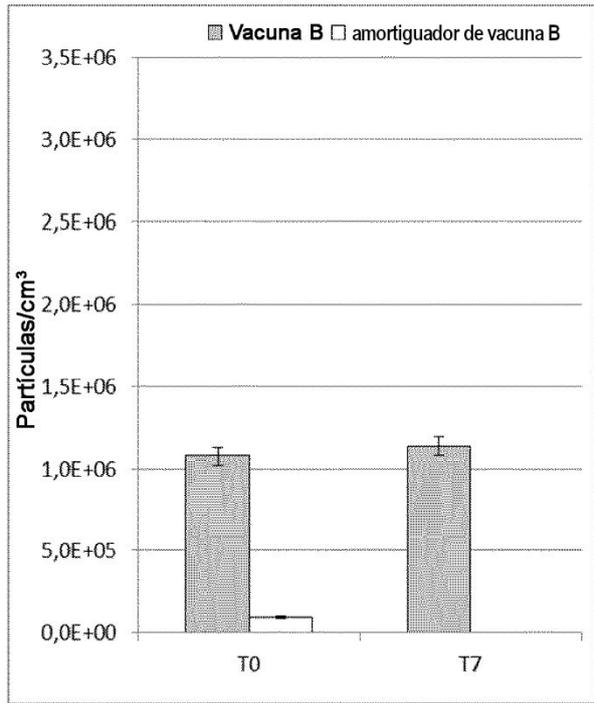


FIGURA 3B

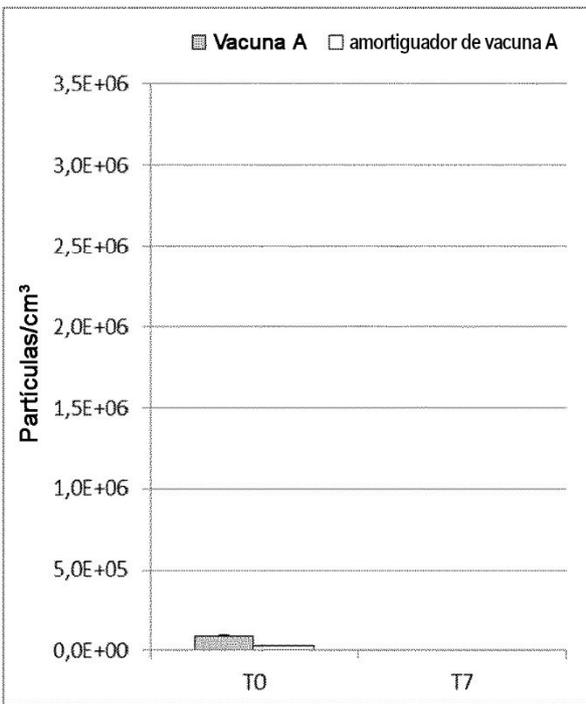


FIGURA 3C

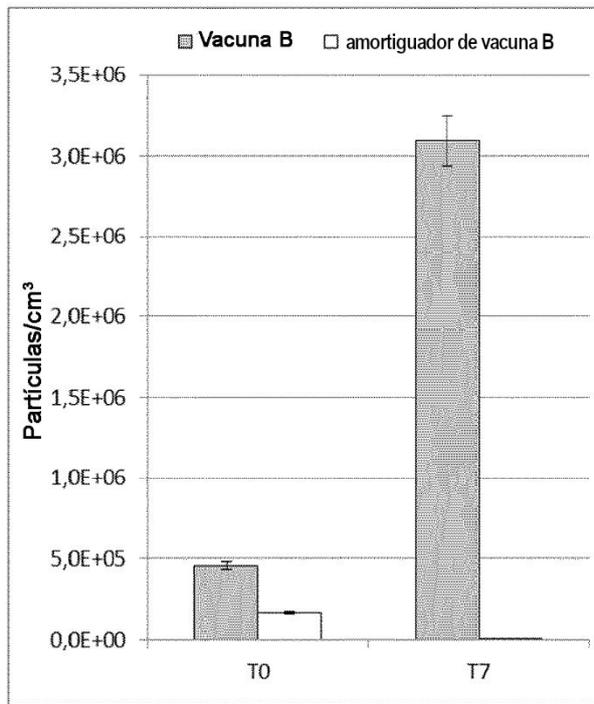


FIGURA 3D

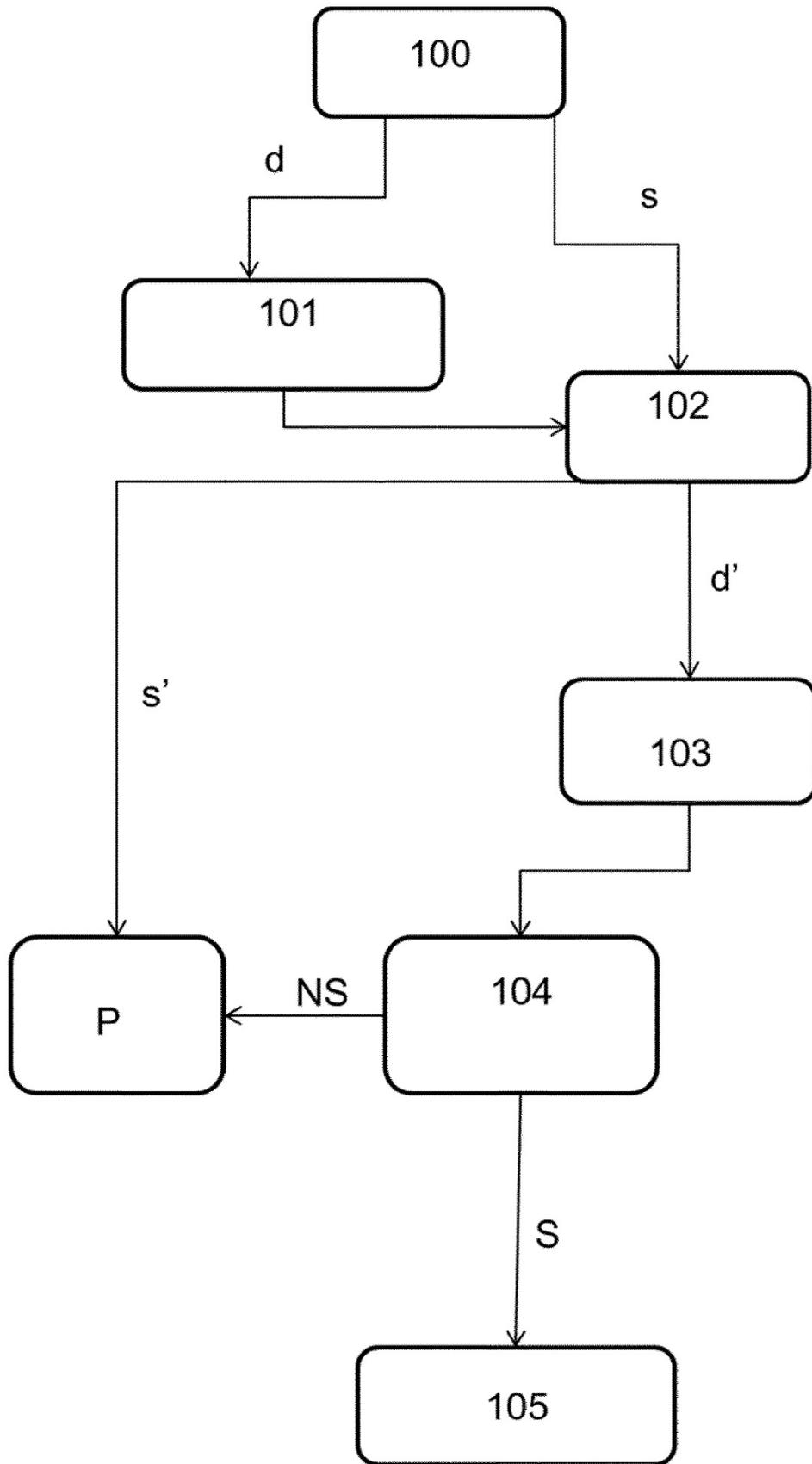


FIGURA 4

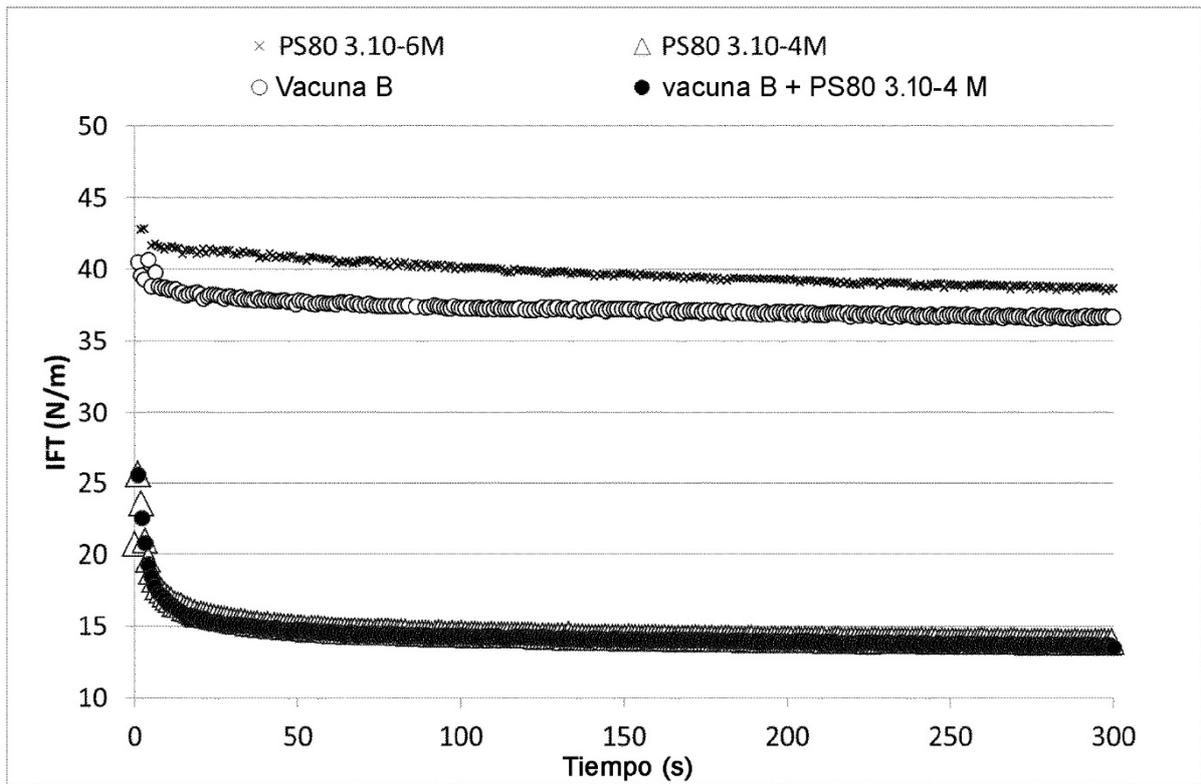


FIGURA 5

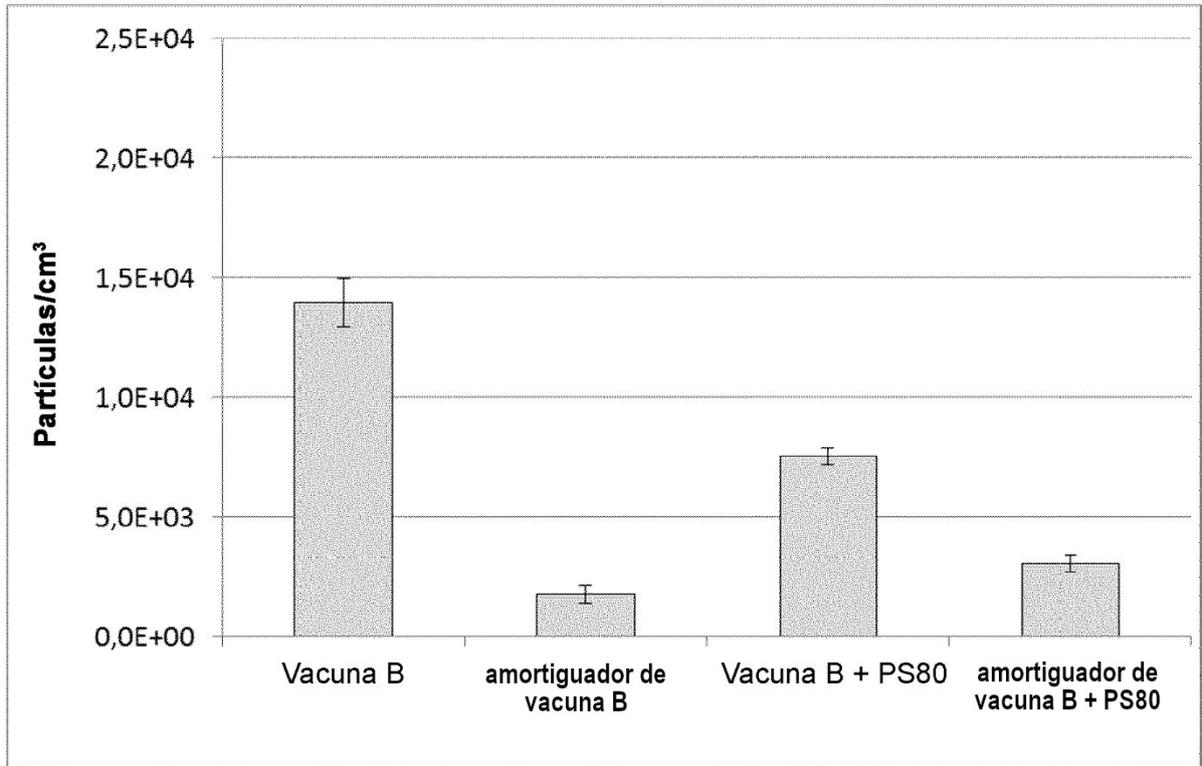


FIGURA 6A

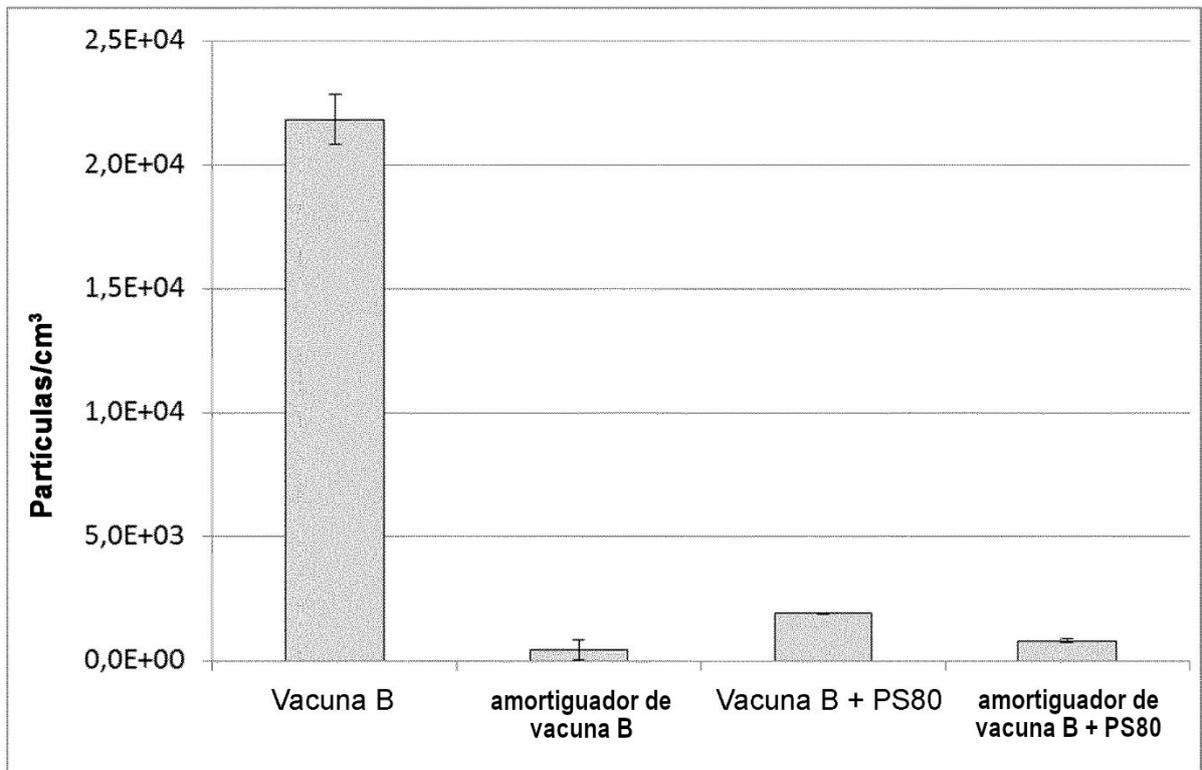


FIGURA 6B

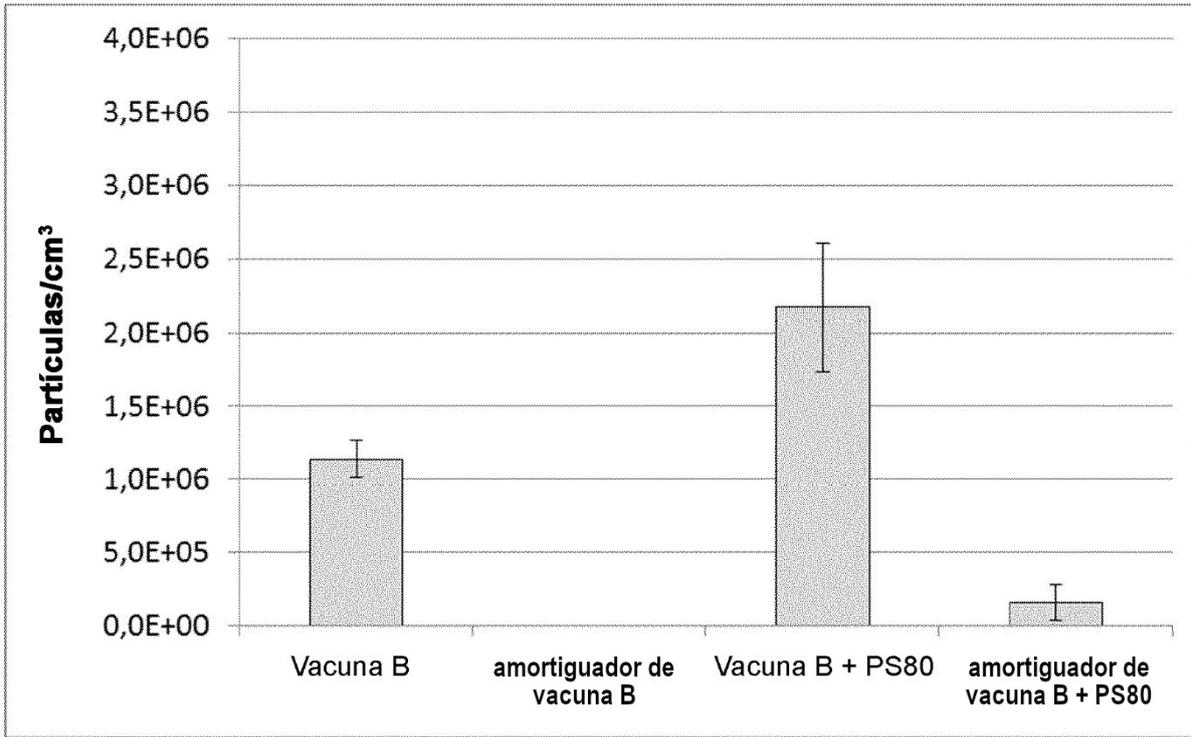


FIGURA 7A

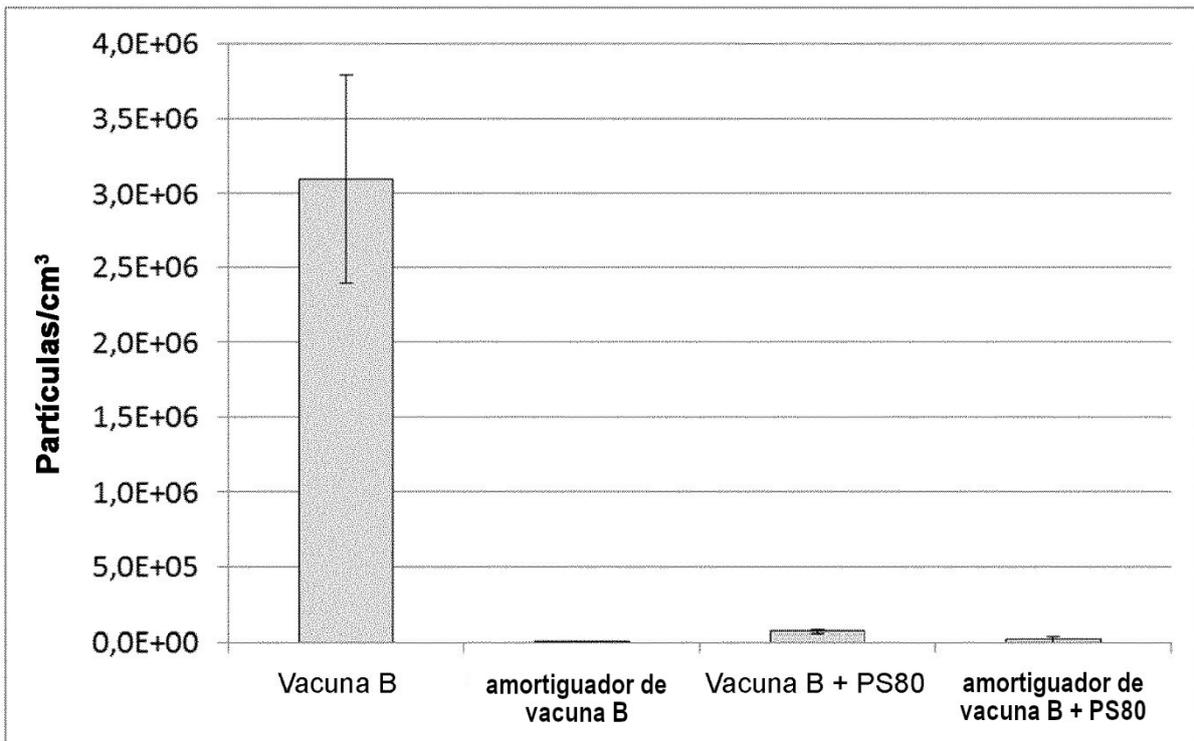


FIGURA 7B

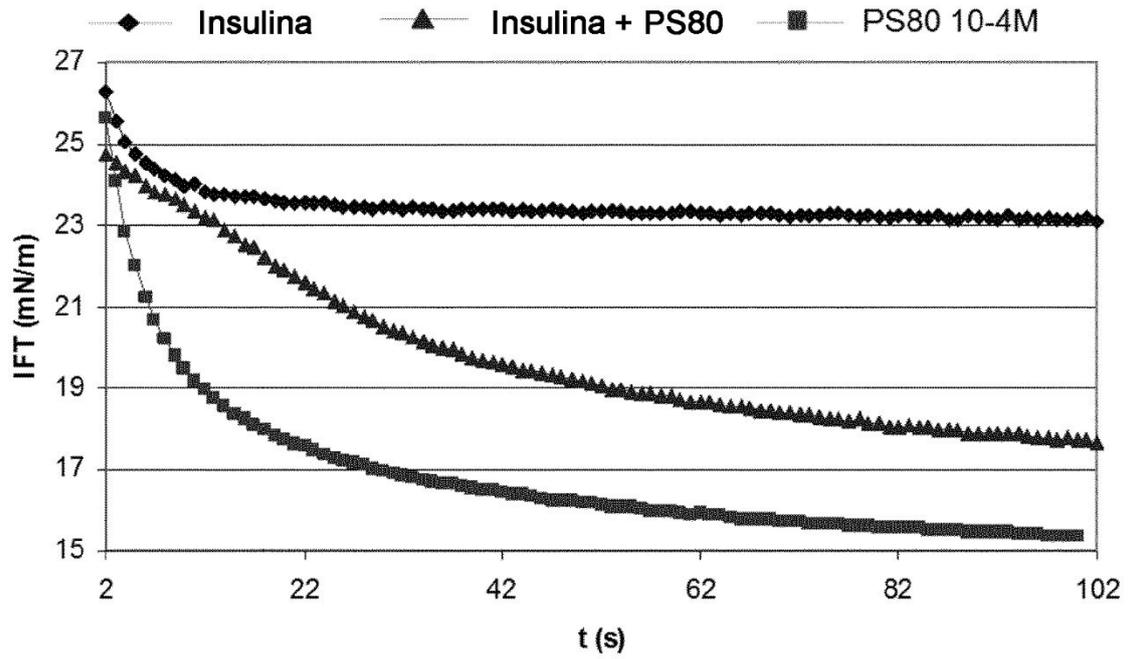


FIGURA 8

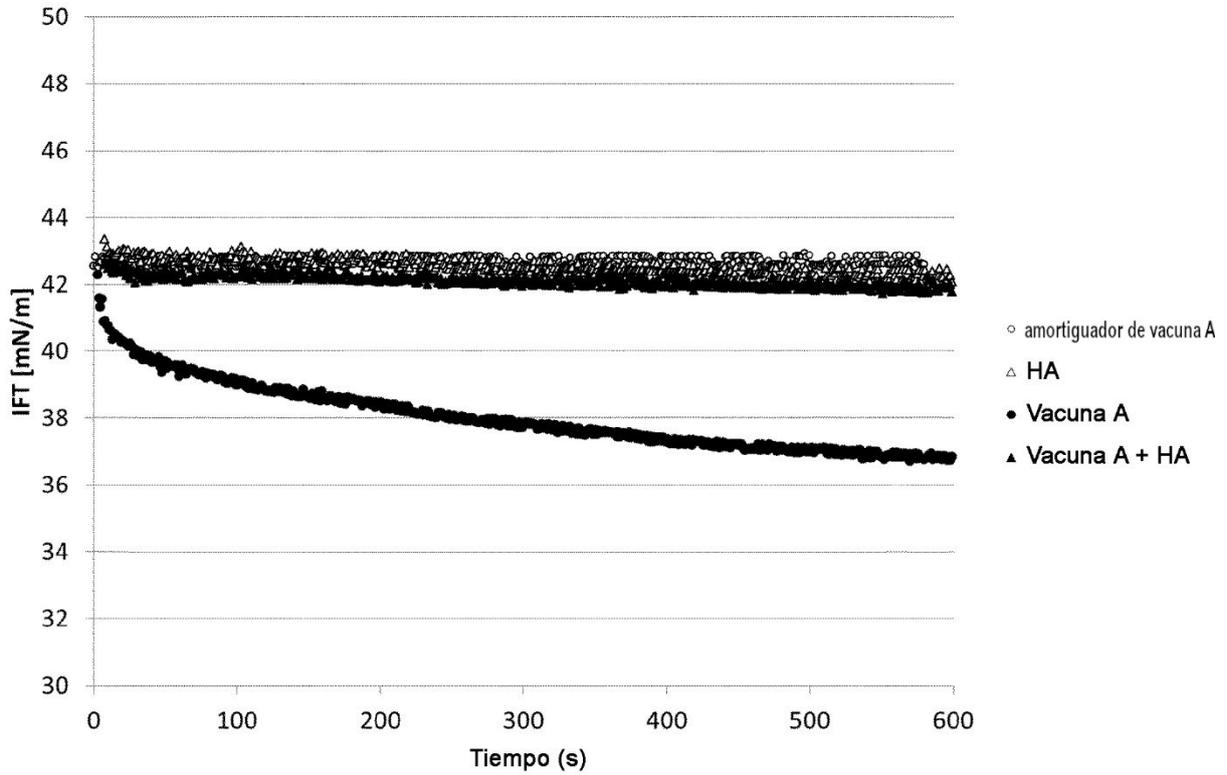


FIGURA 9

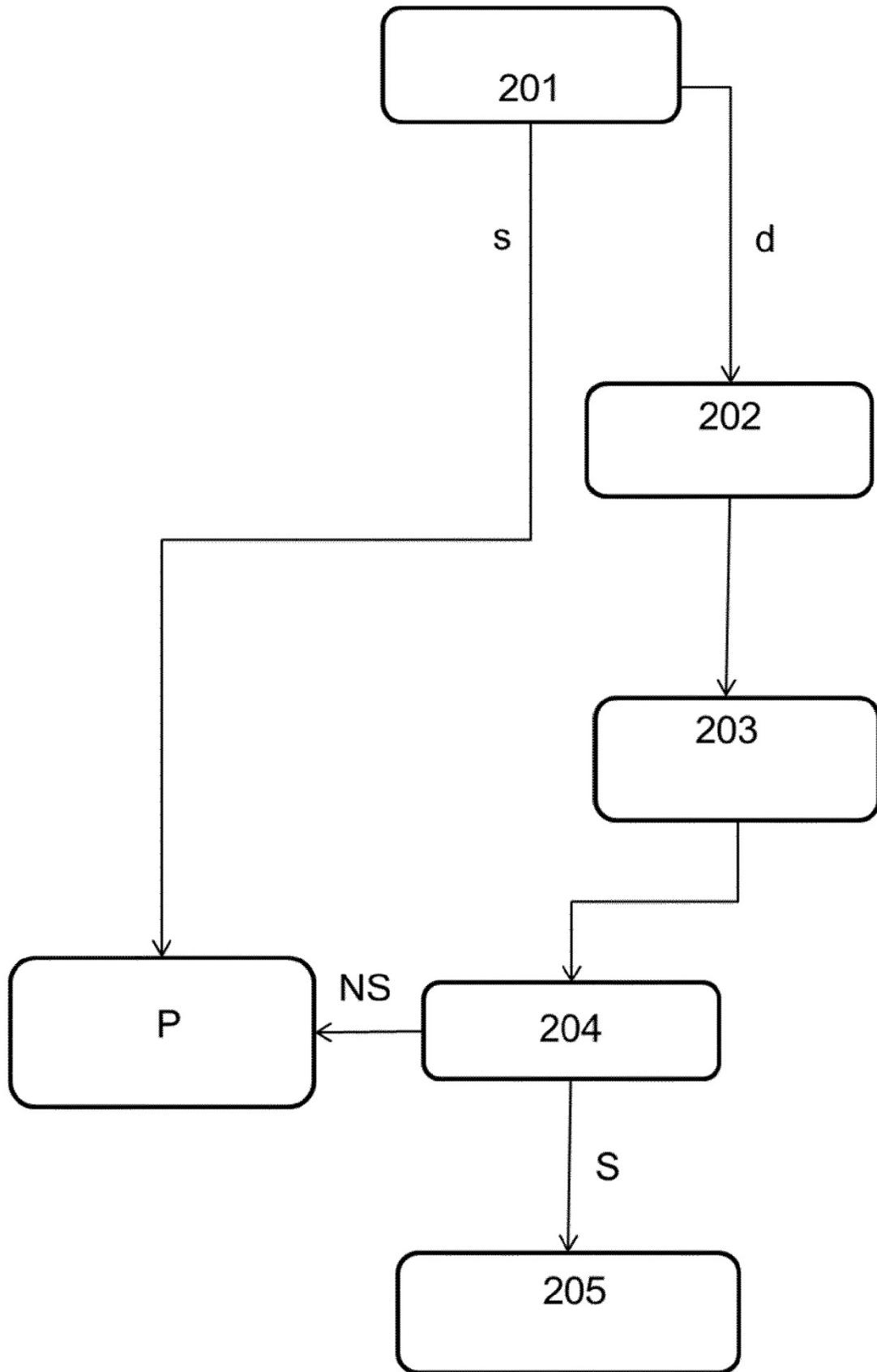


FIGURA 10