



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 132**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**C12N 9/96** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02738901 .4**  
96 Fecha de presentación : **02.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1418229**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Método de estabilización de fosfatasa alcalina.**

30 Prioridad: **02.07.2001 JP 2001-200612**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.06.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2009**

73 Titular/es: **Asahi Kasei Pharma Corporation**  
**9-1, Kanda Mitoshiro-cho**  
**Chiyoda-ku, Tokyo 101-8481, JP**

72 Inventor/es: **Ueda, Shigeru y**  
**Hirayama, Toshiaki**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 322 132 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).

# ES 2 322 132 T3

## DESCRIPCIÓN

Método de estabilización de fosfatasa alcalina.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación liofilizada que contiene fosfatasa alcalina para usar en exámenes clínicos. Específicamente, la presente invención se refiere a un método de estabilización de fosfatasa alcalina derivada de hígado humano, en una preparación liofilizada. Más específicamente, la presente invención se refiere a una preparación liofilizada que no muestra aumento de actividad después de reconstituir con agua y que puede ser almacenada durante un período de tiempo prolongado, y a un método para estabilizar la misma.

### **Técnica fundamental**

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima que se sabe que existe en plantas, animales, microorganismos o semejantes. Por ejemplo, sus orígenes animales varían ampliamente y son tales como los intestinos delgados de bovinos, cerdos, conejos y perros, y los riñones de bovinos y cerdos, placentas humanas, y sus orígenes de microorganismos incluyen enzimas que derivan de *E. coli*. Todas ellas se encuentran disponibles en el mercado. Estas enzimas son iguales en lo que respecta a la función pero se diferencian unas de otras en propiedades tales como la especificidad, la estabilidad térmica y la reactividad.

En una diagnosis clínica, se mide la actividad enzimática de un suero humano, lo que refleja una diversidad de estados mórbidos. Los orígenes de una enzima contenida en el suero varían ampliamente y son tales como el hígado, los riñones, los huesos, el intestino delgado y la placenta.

En general, la actividad enzimática está representada por un valor numérico relativo que cambia según condiciones tales como el pH y la temperatura medida. Por consiguiente, aun cuando se use la misma muestra, el valor de la actividad difiere según el reactivo usado. Factores tales como el deterioro del reactivo y el deterioro de la propia muestra, ejercen una gran influencia sobre el valor de la actividad. Por tanto, con objeto de medir con exactitud la actividad enzimática, debe emplearse un material de referencia que sea estable, sin variaciones, cada vez que se efectúa una medida para comparar los resultados de su medida con los resultados medidos de la muestra, o debe usarse un método estándar de medida.

En el campo de los exámenes clínicos, los productos de que se dispone en el comercio bajo el nombre común de suero testigo, calibrador o material de referencia, son distribuidos como materiales de referencia para la medida de la actividad enzimática conforme a su aplicación. De ellos, los sueros testigo son usados para el control de calidad interno, es decir, el control diario en una determinada instalación de medida, y los calibradores y los materiales de referencia se utilizan no solo para el control de calidad, si no también como sustancia testigo entre instalaciones, al tiempo que se tiene en cuenta la exactitud del valor de las medidas.

Sin embargo, la actividad enzimática de la ALP en el suero humano cambia con facilidad y el tanto por ciento de cambio de la actividad de la sangre recientemente obtenida al cabo de 96 horas es -4% a 10%, según las condiciones de almacenamiento. Se ha indicado que cuando un suero reunido congelado se disolvía y mantenía a temperatura ambiente, la actividad se elevaba 6,4% (Clin. Chem., vol. 18(4), 1972). Es sabido que la estabilidad térmica difiere según el tipo de una isozima (Akio Genba, Isoenzyme, Igaku-Shoin Ltd., páginas 10-16, 1978).

A todo esto, la liofilización es útil y se usa comúnmente para el almacenamiento durante largo tiempo de una sustancia térmicamente inestable y que se desnaturaliza fácilmente cuando se mantiene en forma de solución acuosa, tal como una proteína. Las enzimas se liofilizan con frecuencia para mantener sus actividades durante largo tiempo. Pero existe un gran número de enzimas que se desnaturalizan y se desactivan con facilidad durante el transcurso de la liofilización, dependiendo de su tipo y de su pureza. Por consiguiente, se añaden a la sustancia objetivo una proteína tal como albúmina y un sacárido tal como sacarosa o trehalosa, como estabilizante, con objeto de eliminar este problema. Por ejemplo, el documento JP-A 56-148201 describe estabilizantes para enzimas que incluyen sacarosa y albúmina de suero bovino o humano. No obstante, no existe estabilizante alguno que tenga efecto sobre todos los tipos de proteínas, ni están ahora en camino estudios sobre un estabilizante eficaz para cada proteína.

Para control de calidad y otros fines, se han emitido diversos informes sobre la liofilización de ALP. Por ejemplo, en cuanto al efecto de adición a la ALP de un sacárido que afecta a la liofilización, se han comparado la trehalosa, el manitol y la lactosa (J. Pharm Pharmacol., 45 (10), páginas 86-93, 1993). Según este informe, la trehalosa posee un efecto mayor de estabilización que la lactosa, y la lactosa posee un efecto mayor de estabilización que el manitol. La enzima utilizada es solamente una enzima escasamente purificada, derivada de la membrana mucosa del intestino delgado de ganado bovino y no se ha estudiado una enzima derivada de un ser humano. Se ha descrito en la referencia J. Pharm. Pharmacol., 45 (10), páginas 900-906, 1993, que cuando se lleva a cabo la liofilización usando una enzima purificada derivada de la membrana mucosa del intestino delgado bovino y albúmina de suero humano glicatada como aditivo, se produce un efecto negativo. Dado que la albúmina sacarificada se obtiene combinando un sacárido reducido con albúmina, no se prefiere usar esta combinación como aditivo. Se ha indicado que cuando se usa 15% de trehalosa como el único aditivo, la actividad de la ALP se pierde en el proceso de liofilización y que solamente se obtiene una actividad residual de 40%, aproximadamente, después de secar como Ejemplo Comparativo.

Según se ha descrito anteriormente, el material de referencia debe ser estable durante un periodo de garantía, generalmente 1 año o más, y mostrar un cierto comportamiento cuando esté en uso. Hasta ahora, se ha apuntado que cuando se reconstituye un suero testigo liofilizado de que se dispone en el comercio, la ALP muestra un aumento gradual de su actividad (Clin. Chem. Vol. 18(4), páginas 366-377, 1972).

No puede decirse que se prefiera esto cuando se usa después de reconstituir. Para establecer una comparación entre sustancias utilizadas como control de calidad obtenidas congelando suero humano y liofilizando suero humano, se ha indicado, en el caso de ALP y creatina quinasa (CK), que los productos congelados son superiores como sueros testigo (Clin. Biochem., 29 (2), páginas. 183-185, 1996). Estos sueros testigo se preparan en su mayor parte añadiendo a un suero una enzima derivada de un animal, como adición a ALP intrínseca derivada de un ser humano (Clin. Chem., 35 (3), página 510, 1989).

Aun cuando han debido ser utilizadas enzimas derivadas de un ser humano, en la actualidad se ha empleado con frecuencia una diversidad de enzimas derivadas de animales, que se diferencian unas de otras en sus propiedades, tomando en consideración características éticas, de infección y de facilidad de adquisición. (Clin. Chem., 33 (11), páginas 1971-1977, 1987).

En estos últimos años ha sido fácil extraer enzimas desde células animales establecidas y células recombinantes obtenidas usando ingeniería genética sin usar materiales biológicos, y se encuentran disponibles en la actualidad productos comerciales que incluyen una enzima derivada de seres humanos. Por ejemplo, un suero testigo que contiene muchas enzimas liofilizadas y que incluye ALP obtenida partiendo de una línea celular amniótica humana, muestra aumento de actividad después de reconstituir (Analysis of Bio Specimens, 14 (2), páginas 81-89, 1991: Clinical examination/equipment/reagent, 15(4), páginas 615-623, 1992).

El desarrollo de sustancias de control de calidad que incluyen ALP derivada de seres humanos, está siendo acelerado desde ahora en adelante. Sin embargo, no se ha informado todavía de un producto liofilizado que incluya ALP derivada de seres humanos, que no muestre aumento de actividad después de reconstituir con agua, y que sea estable durante largo tiempo de almacenamiento.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una preparación liofilizada que incluye ALP derivada de hígado humano, que no pone de manifiesto aumento de actividad después de reconstituir con agua y que es estable durante largo tiempo, y un método de estabilización de ALP de hígado humano en la preparación.

### 35 Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo estudios intensos para resolver el problema anterior y han encontrado que puede obtenerse, inesperadamente, una composición que pone de manifiesto pequeñas variaciones de actividad antes y después de liofilizar y que es estable durante largo tiempo, mediante la adición de un sacárido seleccionado entre el grupo que consiste en galactosa, lactosa y fructosa, y albúmina o dextrano, en el momento de la liofilización de ALP derivada de hígado humano. La presente invención ha sido conseguida basándose en este descubrimiento. Es decir, según la presente invención, se proporciona una preparación de estabilización de ALP de hígado humano, que puede ser preservada durante largo tiempo, es altamente estable en el uso práctico y no muestra variaciones tales como aumento de actividad cuando se usa, es decir, se reconstituye, mediante liofilización de ALP de hígado humano en presencia de un sacárido seleccionado entre el grupo que consiste en galactosa, lactosa y fructosa, y albúmina o dextrano.

La presente invención será descrita en detalle más adelante en esta memoria. El sacárido que puede ser usado en la preparación liofilizada de la presente invención, está seleccionado, preferiblemente, entre el grupo que consiste en galactosa, lactosa y fructosa, y la concentración del sacárido es, preferiblemente, 0,5 a 20% (p/v), más preferiblemente 1 a 10% (p/v). Estos sacáridos pueden ser utilizados solos o en forma de mezcla de dos o tres.

La albúmina puede ser albúmina de mamífero tal como albúmina de suero humano o albúmina de suero bovino (BSA), o albúmina de aves tal como albúmina de suero de pollo, y la concentración de la albúmina es, preferiblemente, 0,3 a 7% (p/v), más preferiblemente, 1 a 5% (p/v). Además, puede usarse también la que se obtiene cultivando una célula recombinante con un gen que codifica los aminoácidos de cada albúmina y que ha sido purificada. La albúmina se utiliza como excipiente. Otras proteínas y otros polisacáridos tales como dextrano, que muestran el mismo efecto que la albúmina, pueden ser usados apropiadamente solos o en combinación. La cantidad de dextrano es, preferiblemente, 0,3 a 7% (p/v), más preferiblemente, 1 a 5% (p/V), cuando se usa.

La fosfatasa alcalina que puede ser usada en la presente invención es una enzima derivada de hígado humano. El hígado, los riñones, los huesos, el intestino delgado, y la placenta, se conocen como los orígenes de ALP derivada de seres humanos y puede obtenerse la enzima partiendo de estos materiales biológicos. La enzima que deriva de la placenta está disponible en el mercado aun cuando no se prefiere la obtención de la enzima a partir de esos materiales biológicos al tomar en consideración características éticas y de infección. La enzima puede ser obtenida a partir de productos cultivados de líneas celulares tales como líneas de células HeLa y líneas celulares amnióticas. Además, son conocidos genes que codifican la proteína de ALP derivada de seres humanos, por progresos recientes llevados a cabo por tecnología de ingeniería genética, y la enzima puede ser obtenida a partir de células transformadas que incluyen

## ES 2 322 132 T3

esos genes. Por ejemplo., se obtiene ALP de tipo hepático a partir de una célula animal transformada, purificada y comercializada por Asahi Kasei Co., Ltd. (catálogo de enzimas de diagnóstico de Asahi Kasei Co., Ltd.).

5 Aquí, el gen de la ALP del tipo de hígado humano es idéntico al denominado gen de ALP inespecífico de órganos humanos. Asimismo, en este caso, como célula transformada pueden usarse no solo células humanas sino también células animales distintas de células humanas tales como células CHO derivadas del hámster Chino y células microbianas tales como *E. coli*, levaduras y hongos. También puede usarse un gen transformado para codificar un derivado de ALP obtenido por delección o sustitución parcial de la secuencia de aminoácidos de ALP y adición de otros restos de aminoácidos u otras secuencias de aminoácidos. Las enzimas producidas, excepto las que se encuentran disponibles en el comercio, pueden ser usadas para este fin una vez que sus purezas hayan sido mejoradas hasta un nivel práctico, combinando métodos de purificación de conocimiento general, tales como cromatografía en columna.

15 La cantidad de ALP a añadir en la preparación liofilizada de la presente invención, no está limitada especialmente, pero es, preferiblemente, de 9 a 6500 U/L, más preferiblemente, de 45 a 1300 U/L.

20 El pH de la solución acuosa antes de liofilizar está alrededor del neutro, específicamente, en el entorno de 6,5 a 8,5. Dado que el pH de la solución en la que es reconstituido el producto liofilizado está, deseablemente, dentro del mismo intervalo, puede usarse un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón de Good tal como PIPES, HEPES o BES, un tampón fosfato, o un tampón Tris, en una concentración de 5 a 200 mM, específicamente 10 a 100 mM. Diversos aditivos pueden ser empleados para mejorar la forma de una preparación liofilizada, tales como dextrano o sulfato de dextrano, y puede usarse adecuadamente un azúcar-alcohol tal como el manitol.

25 Dado que es sabido que la ALP tiene cinc en su molécula, se añade, por ejemplo, cloruro de cinc, o puede añadirse adecuadamente cloruro de magnesio conocido como agente de activación.. Puede añadirse adecuadamente un aminoácido que se sepa que posee el efecto de estabilización de enzimas, tal como la valina.

### Modo mejor de llevar a cabo la invención

La presente invención será descrita basada en Ejemplos.

#### 30 Ejemplo 1

35 (1) No se añadió BSA, (2) se añadió BSA al 1% (p/v), y (3) se añadió BSA al 3% (p/v), a una solución tampón 20 mM de POPSO-NaOH (pH 7,5) que contenía lactosa al 5%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co., Ltd.), y 2 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en un vial y liofilizados. En las condiciones respectivas anteriores, se llevó a cabo un ensayo de aceleración de temperatura sobre cada uno de los productos liofilizados, a 37°C, que luego se reconstituyó con 2 ml de agua destilada cada semana durante hasta 4 semanas, en el momento de realizar la medida, para medir la actividad de ALP. En la Tabla 1 se muestran los cambios de la actividad residual de cada una de las muestras. Se observó estabilización significativa en los sistemas a los que se había añadido BSA en comparación con los sistemas sin BSA.

45 TABLA 1  
Actividad residual (%)

	Sin BSA	1% de BSA	3% de BSA
50 1 semana	91,2	92,0	91,4
2 semanas	84,8	86,4	86,6
55 3 semanas	76,7	82,6	84,1
4 semanas	66,2	80,4	82,7

#### 60 Ejemplo 2

65 3% de sacarosa, 3% de galactosa y 3% de lactosa fueron añadidos, cada uno, a una solución tampón 20 mM de BES-NaOH (pH 7,5) que contenía BSA al 3%, cloruro de cinc 0,1 mM, valina 30 mM y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano, y 3 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en dos viales y liofilizados. Se añadió a cada uno de los productos liofilizados 3 ml de agua destilada, para reconstituir, con objeto de medir la actividad de ALP El vial restante se colocó en un incubador a 37°C y se dejó estar durante una semana. Después de esto, se midió la actividad de ALP del mismo modo. Como indica la Tabla 2, los productos a los que se había añadido

## ES 2 322 132 T3

galactosa y lactosa, de la presente invención, mostraban, significativamente, una mayor actividad residual que la del sistema al que se había añadido sacarosa.

5

TABLA 2

*Actividad residual (%)*

10

	3% de sacarosa	3% de galactosa	3% de lactosa
<b>1 semana</b>	<b>75</b>	<b>85,2</b>	<b>84,7</b>

15

### Ejemplo 3

20

25

30

5% (p/v) de galactosa, 5% (p/v) de fructosa y 5% (p/v) de lactosa, fueron añadidos, cada uno, a una solución tampón 40 mM de PIPES-NaOH que contenía BSA al 3%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co., Ltd.), y 2 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en un vial y liofilizados. En cuanto a las condiciones de liofilización, después de evacuación a una temperatura de congelación de -50°C, la desecación primaria se llevó a cabo a -10°C durante 12 horas, la desecación secundaria se llevó a cabo a 20°C durante 24 horas, y se efectuó el taponamiento de los viales en vacío. Se añadió a cada uno de los productos liofilizados 2 ml de agua destilada con objeto de medir la actividad de ALP de cada sacárido añadido. Los viales restantes se colocaron en un incubador a 37°C y se disolvieron en 2 ml de agua destilada, uno por semana, para medir la actividad de ALP durante hasta 3 semanas. La actividad residual se muestra en la Tabla 3 cuando la actividad enzimática correcta después de liofilizar es del 100%. La actividad residual de ALP cuando se añadieron, cada una, galactosa, fructosa y lactosa, fue significativamente alta en comparación con la obtenida cuando no se había añadido sacárido.

35

TABLA 3

*Actividad residual (%)*

40

45

	Sin sacárido	5% de galactosa	5% de fructosa	5% de lactosa
<b>1 semana</b>	<b>68,5</b>	<b>93,9</b>	<b>92,4</b>	<b>88,9</b>
<b>2 semanas</b>	<b>66,2</b>	<b>92,4</b>	<b>90,1</b>	<b>86,1</b>
<b>3 semanas</b>	<b>59,3</b>	<b>90,7</b>	<b>88,6</b>	<b>87,1</b>

50

### Ejemplo 4

55

60

(1) No se añadió sacárido, (2) se añadió 1% (p/v) de galactosa, y (3) se añadió 3% (p/v) de galactosa, (4) se añadió 5% (p/v) de galactosa, y (5) se añadió 3% (p/v) de manosa, a una solución tampón 40 mM de BES-NaOH que contenía BSA al 3%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co., Ltd.), y 2 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en viales y liofilizados. Bajo las respectivas condiciones anteriores, se llevó a cabo un ensayo de aceleración de temperatura sobre cada uno de los productos liofilizados, a 37°C, que después se disolvieron en 2 ml de agua destilada cada semana durante hasta 4 semanas, en el momento de realizar la medida, para determinar la actividad de ALP. Los cambios de la actividad residual de cada muestra se indican en la Tabla 4. Como puede confirmarse desde la tabla, aun cuando la adición de galactosa proporcionaba efecto, el producto al que se había añadido manosa mostraba una caída brusca de actividad al cabo de 3 semanas.

65

## ES 2 322 132 T3

TABLA 4  
*Actividad residual (%)*

	Sin sacárido	1% de galactosa	3% de galactosa	5% de galactosa	3% de manosa
1 semana	81,8	88,3	94,9	97,0	95,0
2 semanas	79,6	86,7	93,0	98,6	88,3
3 semanas	75,9	83,3	89,5	92,7	69,8
4 semanas	75,1	81,5	88,3	89,9	48,4

### Ejemplo 5

5% (p/v) de galactosa ó 5% (p/v) de 3-lactosa se añadió a una solución tampón 40 mM de BES-NaOH que contenía BSA al 1%, dextrano 60K al 3%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co., Ltd.), y 2 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en viales y liofilizados. Después de que los productos liofilizados habían disueltos y se habían medido sus actividad iniciales, cada cuatro viales fueron colocados en incubadores a 25°C, 37°C y 45°C para llevar a cabo un ensayo de degradación acelerado. Los resultados se indican en la Tabla 5.. Después, basándose en los resultados obtenidos, se calculó el período de tiempo de cada muestra que transcurría hasta que su actividad residual llegaba a ser del 98% cuando se mantenía a 4°C y -10°C usando la expresión de Arrhenius (J. Biol. Stand. 12, páginas 195-224, 1984) y se indica en la Tabla 6. Los resultados de los cálculos muestran que la solución de galactosa y la solución de lactosa podrían ser estables durante 1 ó más años cuando eran mantenidas a 4°C y durante 15 años, aproximadamente, cuando se mantenían a -10°C.

TABLA 5  
*Actividad residual (%)*

	5% de galactosa			5% de lactosa		
	carga a 25°C	carga a 37°C	carga a 45°C	carga a 25°C	carga a 37°C	carga a 45°C
1 semana	99,8	98,0	94,3	98,9	96,1	92,0
2 semanas	99,3	06,1	73,2	96,9	94,3	70,6
3 semanas	97,3	95,2	56,7	95,5	92,1	53,9
4 semanas	96,7	94,3	49,0	95,4	91,7	47,1

TABLA 6

	Galactosa	Lactosa
-10°C	15,8 años	13,8 años
4°C	1,3 años	1,2 años

## ES 2 322 132 T3

### Ejemplo 6

5% (p/v) de galactosa ó 5% (p/v) de lactosa, o trehalosa, como Ejemplo Comparativo, se añadió a una solución tampón 40 mM de BES-NaOH que contenía BSA al 3%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co. Ltd.), y 2 ml de la solución resultante se inyectaron en un vial y se liofilizó. Los cambios de actividad se examinaron durante 6 meses de almacenamiento en frío (5°C). Los resultados de los mismos se indican en la Tabla 7. La preparación liofilizada a la que se había añadido trehalosa había disminuido su actividad en 4 meses 8,6%, mientras que la preparación de la presente invención no ponía de manifiesto disminución de actividad.

TABLA 7

*Actividad residual (%)*

	Galactosa	Lactosa	Trehalosa
1 mes	99,8	100,1	99,8
2 meses	99,9	99,8	96,4
3 meses	99,5	99,9	95,1
4 meses	99,5	99,6	91,4
6 meses	99,7	99,9	

### Ejemplo 7

5% (p/v) de galactosa, 5% (p/v) de lactosa y 5% (p/v) de fructosa, se añadieron, cada uno, a una solución tampón 40 mM de BES-NaOH que contenía BSA al 3%, cloruro magnésico 0,5 mM, cloruro de cinc 10  $\mu$ M y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano (Número T-73, producida por Asahi Kasei Co., Ltd.), y 2 ml de cada una de las soluciones obtenidas fueron inyectados en viales y liofilizados. El producto liofilizado se disolvió en 2 ml de agua destilada y después se dejó en reposo a 25°C. Los cambios de actividad de ALP de la solución que tenía disuelto el producto se muestran en la Tabla 8 como la actividad residual. En todos los sacáridos, no hubo aumento de actividad, y continuó una condición estable durante 48 horas.

TABLA 8

*Actividad residual (%)*

	Lactosa	Galactosa	Fructosa
2 horas	100,2	101,2	100,8
4 horas	99,9	100,9	100,3
8 horas	99,6	101,1	100,1
24 horas	99,8	98,4	98,8
48 horas	98,9	99,5	98,3

### Ejemplo 8

3% de dextrano (peso molecular 60000-9000: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), ó 3% de BSA, se añadió a una solución tampón 20 mM de POPSO-NaOH (pH 7,5) que contenía 5% de galactosa, cloruro de cinc 0,01mM, cloruro magnésico 0,5 mM y 400 U/L de ALP derivada de hígado humano, y 2 ml de cada uno de los productos obtenidos fueron inyectados en viales y liofilizados en las mismas condiciones de liofilización que las del Ejemplo 3. Bajo las respectivas condiciones anteriores, se llevó a cabo un ensayo de carga sobre cada uno de los productos liofilizados,

## ES 2 322 132 T3

5 a 37°C, que luego se disolvieron en 2 ml de agua destilada cada semana durante hasta 4 semanas en el momento de realizar la medida de la actividad de ALP. Los cambios de la actividad residual de cada muestra se indican en la Tabla 9. Asimismo, en el caso del dextrano, pudo confirmarse un efecto de estabilización aun cuando ligeramente inferior al del BSA. Nótese que se usó como testigo el producto al que no se había añadido ni dextrano ni BSA, con el resultado de que el producto no pudo ser liofilizado suficientemente.

10 TABLA 9  
*Actividad residual (%)*

	3% de dextrano	3% de BSA
15 1 semana	91,2	91,8
2 semanas	84,8	85,2
20 3 semanas	76,7	81,2
4 semanas	66,2	77,3

### 25 **Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, se proporciona, como una preparación liofilizada que contiene fosfatasa alcalina para usar, específicamente, en exámenes clínicos, una preparación liofilizada en la que es estable fosfatasa alcalina derivada de hígado humano, que no manifiesta aumento de actividad después de reconstituir con agua y que puede ser almacenada durante largo tiempo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de estabilización de fosfatasa alcalina derivada de hígado humano en una preparación liofilizada, que comprende liofilizar la fosfatasa alcalina derivada de hígado humano en presencia de un sacárido seleccionado entre el grupo que consiste en galactosa, lactosa y fructosa, en combinación con albúmina o dextrano.

2. El método de estabilización según la reivindicación 1, en el que la fosfatasa alcalina derivada de hígado humano se obtiene a partir de una línea celular humana que comprende una célula recombinante transformada con un gen que codifica fosfatasa alcalina de hígado humano.

3. El método de estabilización según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que se usa albúmina en combinación con el sacárido.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65