



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 993**

51 Int. Cl.:
C07K 16/46 (2006.01)
C11D 3/384 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01985860 .4**
96 Fecha de presentación : **06.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1368380**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

54 Título: **Estabilización de anticuerpos camélidos de cadena larga con sales de potasio.**

30 Prioridad: **19.12.2000 EP 00311407**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2010

73 Titular/es: **UNILEVER N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Chapple, Andrew P;**
Hemmington, Sandra;
Howell, Steven y
Parry, Neil James

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 332 993 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

Estabilización de anticuerpos camélidos de cadena larga con sales de potasio.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a la estabilización de anticuerpos, o de fragmentos derivados de los mismos, en composiciones detergentes, en particular en composiciones detergentes blanqueadoras.

10 Antecedentes y técnica anterior

Los anticuerpos son polipéptidos que son capaces de enlazar específicamente con compuestos contra los que fueron cultivados. Los anticuerpos se utilizan para una diversidad de propósitos, tal como inmuno ensayos. Más recientemente, se ha propuesto su replicación en aplicaciones detergentes y de limpieza. El documento WO-A-98/56885 (Unilever) revela una enzima blanqueadora que es susceptible de generar una química blanqueadora, y que tiene una alta afinidad enlazadora con las manchas presentes en los tejidos, así como una composición blanqueadora enzimática que comprende la citada enzima blanqueadora, y un procedimiento para blanquear manchas en los tejidos. La afinidad enlazadora puede estar formada por una parte de la cadena de polipéptido de la enzima blanqueadora, o la enzima puede comprender una parte de enzima que sea capaz de generar una química de blanqueo que se acopla a un reactivo que tiene una alta afinidad enlazadora respecto a las manchas presentes en los tejidos. En este último caso, el reactivo puede ser bi-específico, comprendiendo una especificidad respecto a la mancha y una respecto a la enzima. Ejemplos de tales reactivos bi-específicos mencionados en la descripción son los anticuerpos, especialmente los derivados de lo Camélidos que tienen solamente una región variable de la cadena pesada de polipéptido (V_{HH}), los péptidos, peptidomímicos, y otras moléculas orgánicas. La enzima es normalmente una oxidasa, tal como la oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa y alcohol oxidasa, que sea capaz de formar peróxido de hidrógeno u otro agente blanqueador. De ese modo, si el reactivo multiespecífico es un anticuerpo, la enzima forma un conjugado enzima/anticuerpo que constituye un ingrediente de una composición detergente. Durante el lavado, dicho conjugado enzima/anticuerpo de la composición detergente es objetivado por otro sitio funcional del anticuerpo, mientras que la enzima conjugada cataliza la formación de un agente blanqueador en las proximidades de la mancha, y la mancha se verá sometida al blanqueador.

Se ha prestado poca atención con respecto a la manera en la que tales anticuerpos son añadidos a la composición detergente con el fin de conseguir el efecto blanqueador deseado del complejo enzima-anticuerpo. Se ha encontrado que la estabilidad de almacenamiento de los anticuerpos en cuanto a ese problema de las composiciones de limpieza, no es siempre satisfactoria. Existe una amplia técnica anterior con respecto a la granulación de enzimas para su uso en detergentes, pero esta tecnología no puede ser transferida directamente a los anticuerpos.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento mediante el que los anticuerpos puedan ser incorporados en composiciones detergentes (blanqueadoras) de una manera estable.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que es posible incorporar anticuerpos en composiciones detergentes de una manera estable si los anticuerpos están granulados con sales de potasio. Esto es la inversa de la granulación de enzimas, por lo que han de tomarse medidas complicadas en la tecnología de granulación con el fin de proporcionar la estabilidad y la duración requeridas para la enzima.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que la actividad del anticuerpo fue mejorada cuando se almacenó en forma granulada, en comparación con los métodos de almacenaje de la proteína común. Esto imparte, por lo tanto, una duración sustancialmente mejorada del anticuerpo y de su comportamiento asociado en forma de polvo o en forma de producto.

50 Definición de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un gránulo de anticuerpo que consiste esencialmente en uno o más anticuerpos de cadena pesada encontrados en los Camélidos, o en fragmentos derivados de los mismos, granulados con una sal de potasio, en el que el gránulo consiste en más de un 80%, con preferencia más de un 90%, de sal de potasio.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona una composición enzimática blanqueadora de manchas o anti transferencia de tinte, que comprende el gránulo de anticuerpo de la invención.

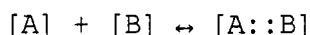
De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar los citados gránulos de anticuerpo de la invención.

65 Descripción de la invención

En su primer aspecto, la invención se refiere a un gránulo de anticuerpo según se define en la reivindicación 1. Según se ha expuesto en lo que antecede, los anticuerpos de cadena pesada son polipéptidos que son susceptibles de enlazar específicamente con compuestos contra los que fueron cultivados.

ES 2 332 993 T3

El grado de enlace de un compuesto A con otra molécula B, puede ser expresado en general por la constante K_d de equilibrio químico que resulta de la siguiente reacción de enlace:



La constante K_d de equilibrio químico viene dada por:

$$K_d = \frac{[A] \times [B]}{[A : B]}$$

Se puede determinar si el ligante con la sustancia es específico o no a partir de la diferencia entre [valor K_d] del ligante del compuesto para esa sustancia, respecto al ligante para el material al que se aplica la sustancia, o respecto a otras sustancias que no se desea oxidizar. Para sustancias que se producen en las manchas, se puede prever que el último material sea el tejido en el que la mancha está presente, o las moléculas de tinte sobre prendas de vestir coloreadas. La diferencia entre las dos constantes de enlace debe ser mínimamente 100, y con preferencia más de 1000. Típicamente, el compuesto deberá enlazar con la sustancia coloreada con un valor K_d de 1×10^{-4} a 1×10^{-6} , con un enlace de fondo con el tejido con una K_d de 1×10^{-2} a 1×10^{-3} . Afinidades de enlace más altas (K_d menor de 1×10^{-3}) y/o una diferencia más grande entre el enlace de la sustancia coloreada y el fondo, podrían incrementar la selectividad del proceso de oxidación. También, la eficacia de peso del compuesto en la composición detergente total podría ser incrementada, y se necesitarían cantidades más pequeñas del compuesto.

Los anticuerpos pueden ser extraídos a partir de varias fuentes. A partir de los ratones, se pueden obtener anticuerpos monoclonales que posean afinidades de enlace muy altas. A partir de tales anticuerpos, se pueden preparar los fragmentos Fab, Fv o scFv, que conserven sus propiedades de enlace. Tales anticuerpos o fragmentos pueden ser producidos a través de tecnología de ADN recombinante, por fermentación microbiana. Huéspedes bien conocidos de producción de anticuerpos y de sus fragmentos son la levadura, los hongos o las bacterias.

Una clase de anticuerpos de particular interés está formada por los anticuerpos de cadena pesada según se encuentran en Camélidos tales como el camello o la llama. Los dominios de enlace de estos anticuerpos consisten en un fragmento de polipéptido simple, en particular la región variable del polipéptido de cadena pesada (HC-V). Por el contrario, en los anticuerpos clásicos (murina, humano, etc.), el dominio de enlace consiste en dos cadenas de polipéptido (las regiones variables de de la cadena pesada (V_h) y de la cadena ligera (V_l)). Procedimientos para obtener inmunoglobulinas de cadena pesada a partir de los Camélidos, o fragmentos (funcionalizados) de los mismos, han sido descritos en el documento WO-A-94/04678 (Casterman y Hamers) y en el documento WO-A-94/25591 (Unilever y Free University of Brussels).

Alternativamente, los dominios de enlace pueden ser obtenidos a partir de los fragmentos V_h de anticuerpos clásicos por medio de un procedimiento conocido como "camelización". Con ello, el fragmento clásico V_h se transforma por sustitución de un número de aminoácidos, en un fragmento de tipo HC-V, con lo que se mantienen sus propiedades de enlace. Este procedimiento ha sido descrito por Riechmann y cols., en un número de publicaciones (J. Mol. Biol. (1996) 259, 957-969; Protein. Eng. (1996) 9, 531-537, Bio/Technology (1995) 13, 475-479). También, los fragmentos HC-V pueden ser producidos mediante tecnología de ADN recombinante en un número de huéspedes microbianos (bacteriano, levadura, hongo), según se describe en el documento WO-A-94/19457 (Unilever).

Procedimientos para producir proteínas de fusión que comprenden una enzima y un anticuerpo, o que comprenden una enzima y un fragmento de anticuerpo, son ya conocidos en el estado de la técnica. Una alternativa ha sido descrita por Neuberger y Rabbits (EP-A-194 276). Un procedimiento para producir una proteína de fusión que comprende una enzima y un fragmento de anticuerpo que fue extraído a partir de un anticuerpo con origen en Camélidos, se encuentra descrito en el documento WO-A-94/25591. Un procedimiento para producir fragmentos de anticuerpo bi-específicos ha sido descrito por Holiger y cols. (1993) PNAS 90, 6444-6448.

Una característica particularmente atractiva del comportamiento de enlace del anticuerpo, consiste en su capacidad reconocida para enlazar con una "familia" de moléculas estructuralmente relacionadas. Por ejemplo, en Gani y cols. (J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 48, 277-282), se describe un anticuerpo que fue cultivado contra la progesterona, pero que también enlaza con los esteroides estructuralmente relacionados, la pregnanodiona, la pregnanolona y la 6-hidroxi-progesterona. Por lo tanto, utilizando la misma alternativa, se podrían aislar anticuerpos que enlacen con una "familia" completa de cromóforos de la mancha (tales como los polifenoles, las porfirinas, o los carotenoides según se describe más adelante). Un anticuerpo de amplia acción tal como éste, podría ser utilizado para tratar diversas manchas diferentes cuando se acopla con una enzima blanqueadora.

Se pueden prever diversas clases de otros compuestos que suministren la capacidad de enlace específica. En lo que sigue, vamos a proporcionar un número de ejemplos de esos otros compuestos que tienen tales capacidades de enlace, sin pretender ser exhaustivos.

1. Péptidos

Los péptidos tienen normalmente afinidades de enlace más bajas con las sustancias de interés que los anticuerpos. Sin embargo, las propiedades de enlace de los péptidos pueden ser suficientes para proporcionar el efecto de enlace deseado. Un péptido que es susceptible de enlazar selectivamente con otra sustancia, puede ser obtenido, por ejemplo, a partir de una proteína que se sepa que enlaza con esa sustancia específica. Un ejemplo de péptido de ese tipo podría ser una región de enlace extraída de un anticuerpo cultivado contra esa sustancia.

Alternativamente, los péptidos que enlazan con esa sustancia pueden ser obtenidos mediante el uso de librerías combinatorias de péptidos. Una librería de ese tipo puede contener hasta 10^{10} péptidos, entre los que se puede aislar el péptido con las propiedades de enlace deseadas. (R.A. Houghten, Trends in Genetics, Vol. 9, núm. 7, 235-239). Se han descrito varias realizaciones para este procedimiento (J. Scott y cols., Science (1990), Vol. 249, 386-390; Fodor y cols., Science (1991), Vol. 251, 767-773; K. Lam y cols., Nature (1991), Vol. 354, 82-84; R.A. Houghten y cols., Nature (1991), Vol. 354, 84-86).

Se pueden producir péptidos adecuados mediante síntesis orgánica, utilizando por ejemplo el procedimiento Merrifield (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149-2154). Alternativamente, los péptidos pueden ser producidos mediante tecnología de ADN recombinante en huéspedes microbianos (levadura, mohos, bacterias), (K.N. Faber y cols., Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 45, 72-79).

2. Peptidomímicos

Con el fin de mejorar la estabilidad y las propiedades de enlace de un péptido, la molécula puede ser modificada mediante la incorporación de aminoácidos no naturales y/o de enlaces químicos no naturales entre los aminoácidos. Tales moléculas se denominan peptidomímicos (H.U. Saragovi y cols., Bio/Technology (1992), Vol. 10, 773-778; S. Chen y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), Vol. 89, 5872-5876). La producción de tales compuestos está restringida a la síntesis química.

3. Otras moléculas orgánicas

Se puede prever fácilmente que se puedan encontrar otras estructuras moleculares, que no necesiten ser relacionadas con las proteínas, los péptidos o los derivados de los mismos, que enlacen selectivamente con las sustancias. Por ejemplo, algunas moléculas de ARN polimérico que hayan demostrado que enlazan con pequeñas moléculas de tinte sintético (A. Ellington y cols., Nature (1990), vol. 346, 818-822). Tales compuestos de enlace pueden ser obtenidos por aproximación combinatoria, según se describe para los péptidos (L.B. McGown y cols., Analytical Chemistry, 1 de Noviembre de 1995, 663A-668A).

Se puede aplicar también esta aproximación para compuestos puramente orgánicos que no son poliméricos. Se han descrito procedimientos combinatorios para la síntesis y selección de las propiedades de enlace deseadas para tales compuestos (Weber y cols., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1995), 34, 2280-2282; G. Lowe, Chemical Society Reviews (1995), Vol. 24, 309-317; L.A. Thompson y cols., Chem. Rev. (1996), Vol. 96, 550-600). Una vez que se han identificado los compuestos de enlace adecuados, éstos pueden ser producidos a gran escala por medio de síntesis orgánica.

Cuando se utiliza la aproximación descrita en el documento WO-A-98/56885 (Unilever), los anticuerpos son dirigidos a manchas presentes en los tejidos. Se puede prever que se desee oxidar varias clases de sustancias: para aplicaciones detergentes, las sustancias coloreadas o no coloreadas que puedan ocurrir a modo de manchas en los tejidos, pueden ser un objetivo. Se pueden prever varios tipos o clases de sustancias coloreadas que se pueden producir en las manchas:

1. Estructuras derivadas de la porfirina

Las estructuras de porfirina, coordinadas con frecuencia con un metal, forman una clase de sustancias coloreadas que se producen en las manchas. Ejemplos son el hemo o la hematina de la mancha de sangre, la clorofila como sustancia verde en las plantas, por ejemplo en la hierba o la espinaca. Otro ejemplo de una sustancia libre de metal es la bilirrubina, un producto de descomposición del hemo.

2. Taninos, polifenoles

Los taninos son formas polimerizadas de ciertas clases de polifenoles. Tales polifenoles son las catequinas, leucocianinas, etc. (P. Ribéreau-Gayon, Plant Phenolics, Ed. Oliver & Boyd, Edimburgo, 1972, pp. 169-198). Estas sustancias pueden ser conjugadas con fenoles simples como, por ejemplo, ácidos gálicos. Estas sustancias polifenólicas se producen en las manchas de té, manchas de vino, manchas de plátano, manchas de melocotón, etc., y son notoriamente difíciles de eliminar.

3. *Carotenoides*

(G.E. Bartley y cols., The Plant Cell (1995), Vol. 7, 1027-1038). Los carotenoides son las sustancias coloreadas que se producen en el tomate (licopeno, rojo), el mango (β -caroteno, amarillo-naranja). Éstos se producen en manchas de alimentos (tomate) que son también claramente difíciles de eliminar, especialmente en tejidos de color, cuando no se prevé el uso de agentes blanqueadores químicos.

4. *Antocianinas*

(P. Ribéreau-Gayon, Plant Phenolics, Ed. Oliver & Boyd, Edimburgo, 1972, 135-169). Estas sustancias son las moléculas altamente coloreadas que se producen en muchas frutas y flores. Ejemplos típicos, relevantes para las manchas, son las bayas, pero también el vino. Las antocianinas tienen una amplia diversidad de patrones de glicosidación.

5. *Productos de reacción de Maillard*

Con el calentamiento de mezclas de moléculas de carbohidratos en presencia de estructuras de proteína/péptido, se produce una sustancia típica de color amarillo/marrón. Estas sustancias se producen, por ejemplo, en el aceite de cocinar, y son difíciles de eliminar de los tejidos.

6. *Tintes en solución*

Para la prevención de transferencia de tinte desde una pieza coloreada de tejido a otras prendas de vestir durante el lavado, es válido blanquear específicamente las moléculas de tinte presentes en la solución de lavado. Se utilizan varios tipos de tintes para tejidos, y se puede prever por lo tanto que sean un objetivo con respecto a los procesos de oxidación: por ejemplos, tintes de azufre, colorantes de cuba, tinte directo, tintes reactivos y tintes azoicos.

El gránulo de anticuerpo de la invención contiene sal de potasio. Los gránulos se fabrican utilizando tecnología de granulación estándar, por ejemplo mezclando los ingredientes en un aparato mezclador, con preferencia en presencia de un ligante.

(a) *La enzima*

Los gránulos de anticuerpo conforme a la invención pueden ser utilizados en una composición detergente blanqueadora. Tales composiciones detergentes enzimáticas comprenden una enzima de oxidación o blanqueadora. La enzima puede, o bien ser una enzima que muestre actividad peroxidasa (que se utiliza después junto con una fuente de peróxido de hidrógeno), o bien una enzima que presente actividad oxidasa sobre compuestos fenólicos, tal como un fenol oxidasa o una laccasa. Se han descrito enzimas adecuadas en el documento EP-A-495 835 (Novo Nordisk). Por ejemplo, se pueden aislar peroxidases adecuadas a partir de, y son reproducibles por medio de, plantas o microorganismos tales como bacterias u hongos. Los hongos preferidos son las cepas pertenecientes a la clase de la *Basidiomycetes*, en particular *Coprinus*, o a la clase de la *Hyphomycetes*, en particular *Arthromyces*, especialmente *Arthromyces ramosus*. Otras fuentes preferidas son *Hormographiella* sp., *Myxococcus* sp., *Corallococcus* sp. (documento WO-A-95/11964), o peroxidasa de semilla de soja. Ejemplos de enzimas adecuadas que muestran actividad peroxidasa sobre los compuestos fenólicos, son la catecol oxidasa y la laccasa, y la oxidasa de bilirrubina. La laccasa puede ser extraída de hongos tales como *Trametes* sp., *Collybio* sp., *Fomes* sp., *Lentinus* sp., *Pleurotus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Aspergillus* sp., *Neurospora* sp., *Podospora* sp., *Phlebia* sp., *Coriolus* sp., *Myceliophthora* sp., *Coprinus* sp., *Panaeolus* sp., *Psathyrella* sp. (documento WO-A-96/06930). La oxidasa de bilirrubina puede ser obtenida a partir de *Myrothecium* sp., o de *Stachibotrys* sp.

Las composiciones de oxidación enzimática de la invención comprenden alrededor de 0,001 a 10 miligramos de enzima activa por litro. Una composición detergente comprenderá alrededor de un 0,001% a un 1% de enzima activa (p/p). La actividad enzimática puede ser expresada como unidades de ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfónico). Una unidad ABTS representa la cantidad de enzima que oxidiza el ABTS, dando como resultado un incremento de 1 densidad óptica a 418 nm en un minuto. Las condiciones para el ensayo de actividad son 2 mM de ABTS, 1 mM de H₂O₂, 20 mM de Tris, pH 9. La actividad enzimática que se añade a la composición de oxidación enzimática será de alrededor de 10 a 10⁶ unidades ABTS por litro, con preferencia 10³ a 10⁵ unidades ABTS por litro.

Las enzimas oxidantes pueden ser normalmente añadidas a la composición detergente de cualquier forma adecuada, es decir, en forma de una composición granular, de un líquido o de una lechada de la enzima, o con material portador (por ejemplo, como en el documento EP-A-258 068 y en los productos Savinase® y Lipolase® de Novozymes). Una buena forma de añadir la enzima a un producto detergente líquido es en forma de una lechada que contenga un 0,5 a 50% en peso de la enzima en un tensoactivo no iónico de alcohol etoxilado, tal como se describe en el documento EP-A-450 702 (Unilever).

(b) *Fuente de peróxido de hidrógeno*

Si contienen una peroxidasa, las composiciones blanqueadoras enzimáticas o de anti transferencia de tinte conforme a la invención, contendrán también una fuente de peróxido de hidrógeno. Ésta puede ser peróxido de hidrógeno

ES 2 332 993 T3

en sí mismo, pero se prefieren formas estabilizadas de peróxido de hidrógeno, tal como perborato o percarborato. Especialmente preferido es el percarborato de sodio.

Alternativamente, se puede emplear un sistema de generación de peróxido de hidrógeno enzimático. El sistema de generación de peróxido de hidrógeno enzimático puede ser elegido, en principio, a partir de los diversos sistemas de generación de peróxido de hidrógeno enzimático que han sido descritos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una amino oxidasa y una amina, un aminoácido oxidasa y un aminoácido, colesterol oxidasa y colesterol, ácido úrico oxidasa y ácido úrico, o una xantina oxidasa con xantina. Con preferencia, sin embargo, se utiliza la combinación de C₁-C₄ alcohol oxidasa y C₁-C₄ alcohol, y especialmente preferida es la combinación de metanol oxidasa y etanol. El metanol oxidasa se aísla preferentemente a partir de una cepa polimorfa de *Hansenula catalasa-negativa*. (véase por ejemplo el documento EP-A-244 920) (Unilever)).

Un tercer aspecto de la invención consiste en un procedimiento para preparar gránulos de anticuerpo según la invención, en el que un anticuerpo se granula con sal de potasio. Se prefiere que el pH se mantenga en un valor de 6,0 a 10,0, más preferiblemente de 7 a 9. El proceso se lleva preferentemente a cabo a una temperatura de 30°C o más alta, más preferentemente de 30°C a 80°C, incluso más preferentemente de 30°C a 65°C. La invención va a ser ahora mejor ilustrada en los ejemplos no limitativos que siguen.

En las Figuras:

Figura 1 - Actividad de varios gránulos 1249 de doble cabeza después de su almacenamiento a temperatura ambiente;

Figura 2 - Actividad de los mismos gránulos después de su almacenamiento a 37°C/77% H;

Figura 3 - Actividad de otros varios gránulos 1249 después de su almacenamiento a temperatura ambiente;

Figura 4 - Actividad de gránulos 1249 a varios valores de pH;

Figura 5 - Actividad de gránulos 1249 después de su almacenamiento a temperatura ambiente;

Figura 6 - Actividad de gránulos 1249 después de su almacenamiento a 37°C/77% H;

Figura 7 - Ensayo de gránulos 1249 procesados con calor.

Ejemplo 1

Se construyó un anticuerpo (1249) de doble cabeza (anti Glucosa Oxidasa-anti polifenoles/Vino tinto (vino Côtes du Rhône (Co-op, UK)), de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO-A99/23221 (Unilever). Los gránulos se prepararon con el anticuerpo 1249 liofilizado para investigar las propiedades de almacenamiento conferidas por la utilización de diferentes materiales. La doble cabeza (que contenía Bicina y NaCl del proceso de purificación de intercambio iónico) fue combinado con Na₂SO₄. La mezcla fue a continuación mezclada uniformemente y ligeramente molida en un mortero. A continuación se añadieron 2,23 g de una solución a un 40% en peso de copolímero CP5 acrilato-maleato (ex BASF), gota a gota, a la mezcla sólida con mezclado frecuente. Los gránulos resultantes fueron transferidos a continuación a una bandeja plana y se dejaron secar en flujo de aire a temperatura ambiente. Los gránulos perdieron un 4,5% en peso durante el secado. Los gránulos secos fueron después molidos hasta un tamaño menor de 1000 micras.

50 Composición del gránulo

Composición del gránulo:

Material	% humedad	% en peso
doble cabeza	0,4	1,9
NaCl/biceno	1,227	5,9
Na ₂ SO ₄	18,453	88,0
Copolímero CP5 (base seca)	0,892	4,3

Los gránulos fueron realizados con glucosa en vez de con Na₂SO₄, o en los que el 50% del Na₂SO₄ fue sustituido por glucosa.

ES 2 332 993 T3

Prueba de almacenamiento

Ésta se estableció en polvo OMO MA completamente formulado, que fue dispensado en cantidades de 1 g/vial de vidrio. Los gránulos fueron dosificados a 50 miligramos por vial. Esto se calculó de modo que proporcionara aproximadamente 1 mg/ml de doble cabeza cuando el contenido de un vial fuera disuelto en 500 ml de agua. Los viales etiquetados fueron colocados en cámaras húmedas, por muestras almacenadas a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) cuya cámara contenía una solución saturada de carbonato potásico para proporcionar alrededor de un 44% de humedad. Para las muestras almacenadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, se utilizó una solución saturada de NaCl para obtener una humedad de alrededor de un 7%. Las muestras fueron retiradas a intervalos regulares, y ensayadas en cuanto a actividad bi-específica.

Ensayo respecto a actividad bi-específica

Placas Microtitre Nunc Maxisorb fueron sensibilizadas durante la noche a 37°C con $200\ \mu\text{l}$ /pocillo de vino tinto (Coop, Côtes du Rhône). Se extrajeron seis viales desde cada cámara húmeda utilizando 2 de cada tipo de gránulo, y los contenidos de cada vial fueron añadidos a 500 ml de agua desmineralizada. Para un control, se pesaron los gránulos frescos y se añadieron a 1 g de OMO MA, de los que cada uno fue añadido a frascos separados que contenían 500 ml de agua desmineralizada. Los contenidos de cada frasco fueron agitados durante 5 minutos antes de que se extrajera una cantidad alícuota de $250\ \mu\text{l}$ desde cada uno, y se diluyeran en PBST, pH 7,4, para obtener 250 ng/ml de doble cabeza.

Las diluciones de control y de muestra, fueron dispensadas a razón de $200\ \mu\text{l}$ por pocillo, por duplicado, en los pocillos de las placas de vino tinto lavadas. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se retiraron las muestras sin enlazar mediante tres lavados en PBST. Se dispensó glucosa oxidasa (Gox), a $25\ \mu\text{g/ml}$ en PBST, a todos los pocillos que contenían muestra y a los pocillos adicionales que habían sido previamente incubados solamente con PBST; esto se hizo para comprobar el enlace no específico de la enzima con la placa sensibilizada. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora, y la Gox sin enlazar fue extraída mediante lavado con PBST. Se dispensó a cada pocillo sustrato que contenía TBM, 10 mM de glucosa y $2\ \mu\text{g/ml}$, y se dejó evolucionar durante 20 minutos antes de que la reacción fuera interrumpida con la adición de $100\ \mu\text{l}$ /pocillo de HCl 1M. Las placas fueron leídas utilizando un lector de placa Dynatech a 450 nm. Las lecturas duplicadas de cada dilución fueron promediadas y representadas como porcentaje del control apropiado. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. Éstos pueden ser resumidos como sigue:

Los gránulos almacenados a temperatura ambiente y que contenían sulfato de sodio, mostraron entre un 100 y un 170% de actividad de la que se vio en las muestras de control. Los gránulos de glucosa mostraron una variabilidad con una muestra que tenía una actividad de un 100% y otra con una actividad de un 80%. En ensayos posteriores, se apreció un nivel más alto de actividad que en la muestra de control hasta el día 33. Todos los gránulos probados mostraron una caída de actividad de entre un 50 y un 80% del control.

Todas las muestras almacenadas a 37°C mostraron una actividad por encima del 100% de las muestras de control. En el día 7, la doble cabeza granulada con sulfato de sodio mostró todavía niveles de enlace por encima de los gránulos de control. Las restantes muestras mostraron un descenso significativo en la actividad bi-específica cuando se compararon con los controles apropiados. En el ensayo del día 15, no se detectó ninguna actividad en ninguna de las muestras almacenadas.

Las condiciones de almacenamiento elegidas fueron muy diferentes, y los resultados obtenidos así lo reflejan; a temperatura ambiente, los niveles de actividad están todavía por encima del 55% después de 33 días. A 37°C existe una caída drástica de la actividad entre los días 7 y 15. El efecto de los ingredientes después del almacenaje, es variable, a $37^{\circ}\text{C}/77\% \text{ H}$, con lo que la presencia de glucosa tuvo un efecto significativo adverso sobre la actividad del anticuerpo (estos gránulos mostraron una reducción de actividad de hasta un 60%). Los gránulos que contenían tanto sulfato de sodio como glucosa, mostraron una tendencia similar. Sin embargo, se detectó aún una buena actividad en el día 7 en los gránulos de sulfato de sodio, y los mismos gránulos almacenados a temperatura ambiente/40% H, tuvieron una alta actividad anticuerpo.

Se deduce como conclusión que el proceso de granulación con una sal simple no afectó negativamente a la actividad de la doble cabeza. También, el almacenaje de anticuerpos en forma granulada tiene una actividad de anticuerpo superior en comparación con los métodos convencionales de almacenaje de proteínas.

Ejemplo 2

En este ejemplo, se investigó la actividad de doble cabeza 1249 tras la granulación a diferentes valores de pH. Los gránulos de doble cabeza 1249 fueron preparados como en el Ejemplo 1. La actividad de doble cabeza de los gránulos fue evaluada con EIA. La placa Nunc maxisorb microtitre fue sensibilizada durante la noche con vino tinto, mediante dispensación de $200\ \mu\text{l}$ de vino a cada uno de los 96 pocillos, e incubación a 37°C . Los gránulos testados incorporaban Doble cabeza 1249 y una de las siguientes sales:

carbonato de sodio, pH 10,4

bicarbonato de sodio, pH 8,9

ES 2 332 993 T3

sulfato de sodio, pH 7,2

sulfato de potasio, pH 6

5 fosfato de potasio, pH 5,8.

Las muestras de gránulos fueron diluidas para obtener una curva de dilución con la siguiente gama: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,57, 0,785, 0,39, 0,196, 0,098 $\mu\text{g/ml}$ en PBST. Cada dilución fue dispensada por duplicado en pocillos lavados y sensibilizados, e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de que la muestra sin enlazar fuera retirada mediante lavado.

Se dispensó glucosa oxidasa a 25 $\mu\text{g/ml}$ en PBST en los pocillos, y la incubación se llevó a cabo durante 30 minutos adicionales. La placa fue lavada de nuevo con tres cambios de PBST antes de que se añadiera el regulador de sustrato, el cual comprendía 10 mM de glucosa, TMB y 2 $\mu\text{g/ml}$ de HRP. La reacción fue interrumpida después de 20 minutos con la adición de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de HCl 1M. La placa fue leída a 450 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. La Figura 3 muestra la pérdida de actividad a un % con relación a los gránulos de sulfato de sodio, y la Figura 4 muestra la pérdida de actividad a varios valores de pH.

20 La mayor pérdida se atribuye a los gránulos con los pHs más alto y más bajo, aunque la actividad restante es todavía muy buena en estas circunstancias. A un pH de 6,5 existe muy poca diferencia en comparación con el control, siendo éste un resultado esperado debido a que el pH de los gránulos es muy similar. A un pH de 8,9, sorprendentemente, se perdió poca actividad.

25 Ejemplo 3

Se investigó el comportamiento al almacenaje del granulado de doble cabeza a valores diferentes de pH. Se prepararon cabezas dobles 1249 que contenían Na_2SO_4 como en el Ejemplo 1. La concentración de doble cabeza en gránulo seco fue del 1,94%. Utilizando el mismo procedimiento, se prepararon las siguientes variantes:

30	<u>(1) Bicarbonato de Sodio</u>	
	Componente	peso (g)
35	Doble cabeza	0,105
	Bicarbonato de Na	4,0
	CP5	0,302
40	Sales, etc.	0,395
	Concentración de doble cabeza en gránulo seco = 2,19%	
45	<u>(2) Fosfato Dihidrógeno de Potasio (pH = 4)</u>	
	Componente	peso (g)
	Doble cabeza	0,07
50	KH_2PO_4	2,8
	CP5	0,14
55	Sales, etc.	0,277
	Concentración de doble cabeza en gránulo seco = 2,13%	
60	<u>(3) Sulfato de potasio (uso del adyuvante ácido CP45)</u>	
	Componente	%
	KH_2PO_4	82,5
	CP45	4,1
65	Sales	11,16
	Doble cabeza	2,22

ES 2 332 993 T3

Prueba de almacenamiento

Ésta fue establecida en polvo de base OMO, que fue dispensado en cantidades de 0,25 g/vial de vidrio. Los gránulos fueron dosificados a 50 mg por vial. Esto fue calculado de modo que se proporcionaran 4 mg de doble cabeza cuando el contenido de un vial fuera disuelto en 125 ml de agua. Se colocaron viales etiquetados en cámaras de humedad; para las muestras almacenadas a temperatura ambiente, la cámara contenía una solución de carbonato de potasio para proporcionar ~44% de humedad. Las lecturas de temperatura y de humedad fueron monitorizadas con higrómetros. Para las muestras almacenadas a 37°C ± 1, se utilizó una solución saturada de NaCl para proporcionar ~75% de humedad. Las muestras fueron retiradas a intervalos regulares y testadas en cuanto a actividad bi-específica.

Procedimiento de ensayo

Placas Microtitre Nunc Maxisorb fueron sensibilizadas durante la noche a 37°C con 200 µl/pocillo de vino tinto (Coop, Côtes du Rhône). Se extrajeron diez viales desde cada cámara de humedad utilizando 2 de cada tipo de gránulo. Como control, se extrajo mediante pesado base de Omo fresco y se añadió a 125 ml de agua desmineralizada, a lo que se añadieron 4 mg de extracto de doble cabeza que no había sido secado por congelación. Los contenidos de los viales almacenados fueron añadidos, cada uno de ellos, a 125 ml de agua desmineralizada en frascos cónicos de 250 ml. Las soluciones fueron agitadas durante 5 minutos antes de que se extrajera una cantidad alícuota de 250 µl desde cada uno, y se diluyeron en PBST, pH 7,4, para obtener 1 mg/ml de doble cabeza. Las diluciones de control y de muestra fueron dispensadas a 200 µl por pocillo, por duplicado, en los pocillos de las placas de vino tinto lavadas, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de que la proteína sin enlazar fuera retirada mediante tres lavados en PBST. Se dispensó glucosa oxidasa (Gox) a razón de 25 µg/ml en PBST a todos los pocillos que contenían muestras y a pocillos adicionales que habían sido previamente incubados solamente con PBST; esto se hizo para comprobar el enlace no específico de la enzima con la placa sensibilizada. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora; la Gox sin enlazar fue extraída mediante lavado con PBST. Se dispensó sustrato que contenía TMB, 10 mM de glucosa y 2 µg/ml de HRP, a cada pocillo, y se permitió su desarrollo durante 20 minutos antes de que la reacción fuera interrumpida con la adición de 100 µl/pocillo de HCl 1M. Las placas fueron leídas a 450 nm utilizando un lector de placa Dynatech. Las muestras fueron ensayadas a diferentes intervalos durante un período de 60 días.

Para cada muestra, se promediaron los puntos duplicados y se determinó la desviación estándar. Para comparar la actividad de los diferentes tipos de gránulos, las lecturas de las muestras duplicadas fueron promediadas y comparadas con el control húmedo en cuanto a actividad. Las Figuras 5 y 6 muestran el % de actividad después de 60 días para las muestras almacenadas a 22°C y 37°C.

La actividad de la doble cabeza se mantuvo durante el período de almacenamiento cuando se incluyeron sales de potasio en el proceso de granulación. Existen algunas incidencias de actividad mayor del 100% del control, pero éstas no son significativas. La actividad de doble cabeza fue también mantenida a un nivel alto cuando se incorporaron sales bicarbonato en el gránulo. En la muestra ensayada el día 60 detectamos un descenso del 30% en la actividad de doble cabeza de los gránulos de bicarbonato. El mantenimiento de la actividad de doble cabeza en presencia de carbonato, es muy diferente comparativamente. La actividad en estos gránulos fue medida el día 0, siendo del 9,1% del control. Este bajo nivel de actividad se debe probablemente al ambiente muy básico del gránulo, que provoca cambios conformacionales en primera instancia, y rotura de proteína a largo plazo.

También se estudió en el Ejemplo 1 el efecto del sulfato de sodio en los gránulos de doble cabeza, en los que se midieron concentraciones más bajas de doble cabeza después de un período de almacenamiento de 33 días. Esta prueba produjo resultados similares, la actividad de doble cabeza estuvo entre 60-80% entre los días 1-28, pero inició una caída por debajo del 50% a partir del día 46. En estas condiciones, los componentes preferidos podían ser tanto las sales de potasio como el bicarbonato. Los resultados del almacenamiento a 37°C varían enormemente y se han resumido en la Figura 7. A partir de estos datos, resulta evidente que los gránulos de carbonato tienen una actividad muy baja el día 0, y por lo tanto no fueron testados después del día 1. Las variantes de potasio muestran, de nuevo, una notable actividad de doble cabeza, siendo estas condiciones susceptibles de determinar que los gránulos de sulfato de potasio muestran una reducción en la actividad de doble cabeza a partir del día 14, y que a partir del día 21 existe un descenso significativo (~90%) en la actividad detectada, pudiéndose medir a partir del día 28 menos del 10% de la actividad de control. Por el contrario, los gránulos de fosfato de potasio mantienen la actividad de doble cabeza al 100% del control hasta el día 46, cuando se produce un descenso de ~40%. La última medición realizada el día 60, detectó todavía un 40% de actividad de doble cabeza en esos gránulos. El uso del adyuvante ácido CP45 puede ser contributivo a la falta de estabilidad en este caso. La doble cabeza mostró menos estabilidad en los gránulos de bicarbonato en esas condiciones, conservando una actividad muy pequeña el día 14. Con el sulfato de sodio, la pérdida de actividad fue también completa para el día 14, pero la pérdida fue más gradual que con la caída severa observada con el bicarbonato. En esas condiciones, el fosfato de potasio mantiene la actividad de doble cabeza más tiempo que cualquiera de los otros componentes testados.

A 37°C, los gránulos de fosfato de potasio absorbieron humedad del entorno de almacenamiento. Sin embargo, esto no pareció afectar a la actividad de la doble cabeza. El alto pH del gránulo de carbonato desactivó la doble cabeza durante el almacenamiento normal a bajo nivel de humedad, y por lo tanto resulta totalmente inapropiado para su uso durante la granulación de la doble cabeza.

ES 2 332 993 T3

Ejemplo 4

Comparación de gránulos procesados a diferentes temperaturas

5 Se prepararon gránulos de doble cabeza 1249 con el objetivo de ver el efecto de varios procedimientos de procesamiento, y para ver si se puede mantener el tiempo de secado en un mínimo con el uso de temperaturas incrementadas. Esto podría ser ventajoso debido a que el uso de calor en la preparación de enzimas es normalmente perjudicial para la actividad de la enzima. Se prepararon los siguientes gránulos de doble cabeza 1249:

10	Doble cabeza 1249	0,21
	Na ₂ SO ₄	8,0
15	CP5	0,37
	Sales, etc.	0,872

20 La concentración de doble cabeza en el gránulo seco fue del 2,22%. Los gránulos sulfato fueron divididos en 4 fracciones separadas, cada una de las cuales fue secada bajo condiciones diferentes. Estas fueron:

- a) Durante la noche, a temperatura ambiente en flujo de aire
- 25 b) 10 minutos a 65°C en un horno
- c) 30 minutos a 65°C en un horno
- d) 60 minutos a 65°C en un horno.

30 Se midió la actividad utilizando el mismo método que el dado en el Ejemplo 2. Las muestras fueron diluidas para proporcionar 11 µg/ml en PBST, siendo éste un diluido doble para obtener una gama de ensayo. Los resultados se dan en la Figura 7. Se encontró que la temperatura usada para el secado no afectó significativamente a la actividad de la doble cabeza. Las muestras secadas durante 10 minutos dieron el mismo resultado de ensayo que las secadas durante una hora. La muestra secada durante la noche a temperatura ambiente, dio una lectura ligeramente más alta, pero esto
35 no es estadísticamente significativo.

40

45

50

55

60

65

ES 2 332 993 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Gránulo anticuerpo que consiste esencialmente en uno o más anticuerpos de cadena pesada como los encontrados en los Camélidos, o en fragmentos derivados de los mismos, granulados con una sal de potasio, en el que el gránulo consiste en más del 80%, con preferencia más del 90%, de la sal de potasio.
2. Gránulo anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un ligante polimérico.
- 10 3. Gránulo anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo tiene una constante K_d de equilibrio químico para su antígeno de menos de $1 \cdot 10^{-4}$, con preferencia menos de $1 \cdot 10^{-6}$.
4. Gránulo anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la constante K_d de equilibrio químico para el antígeno es menor de $1 \cdot 10^{-7}$.
- 15 5. Una composición detergente que comprende el gránulo anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Una composición enzimática blanqueadora de manchas, que comprende el gránulo anticuerpo de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Una composición enzimática anti transferencia de tinte, que comprende el gránulo anticuerpo de las reivindicaciones 1-5.
- 25 8. Procedimiento de preparación de un gránulo anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo está granulado con una sal de potasio.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la temperatura es de 30°C o mayor, con preferencia de 30°C a 80°C.
- 30 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el pH se mantiene en un valor desde 6,0 hasta 10,0, con preferencia desde 7,0 hasta 9,0.

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1.

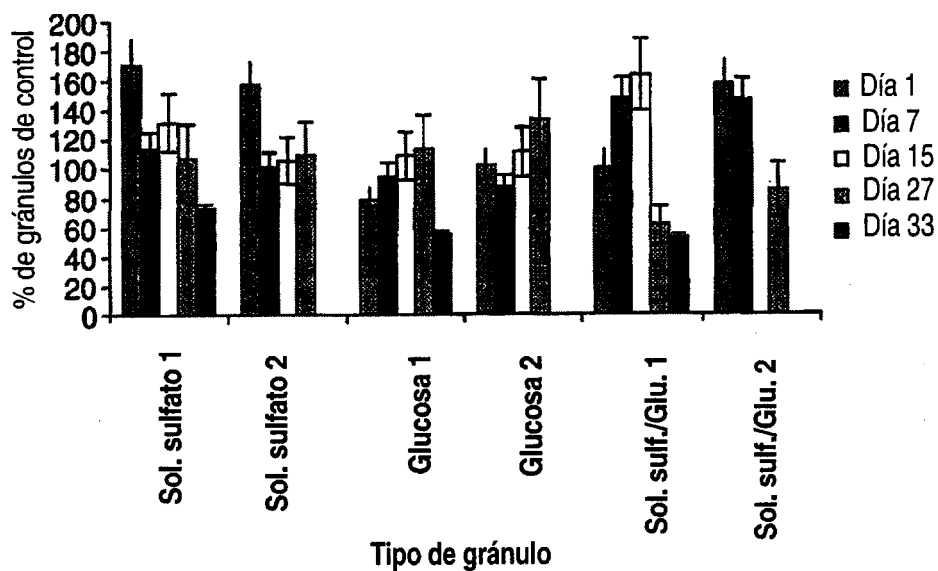


Fig.2.

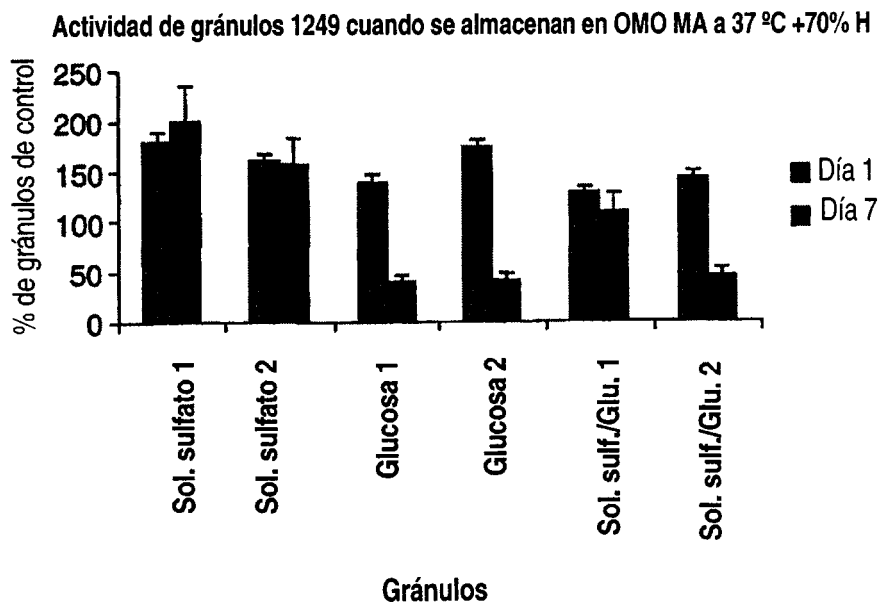


Fig.3.

Comparación de pérdida de actividad respecto a gránulos de sulfato de sodio

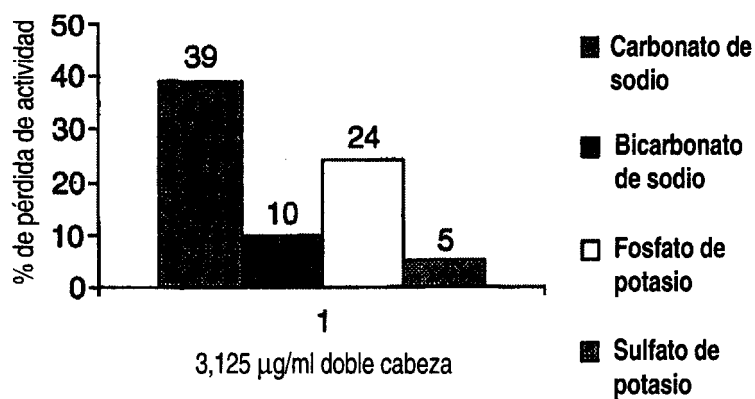


Fig.4.

Gráfico para mostrar la pérdida de actividad frente al pH del material de granulación

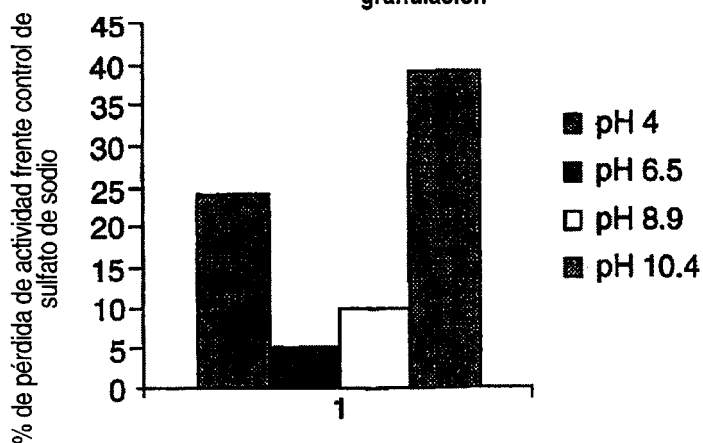


Fig.5.

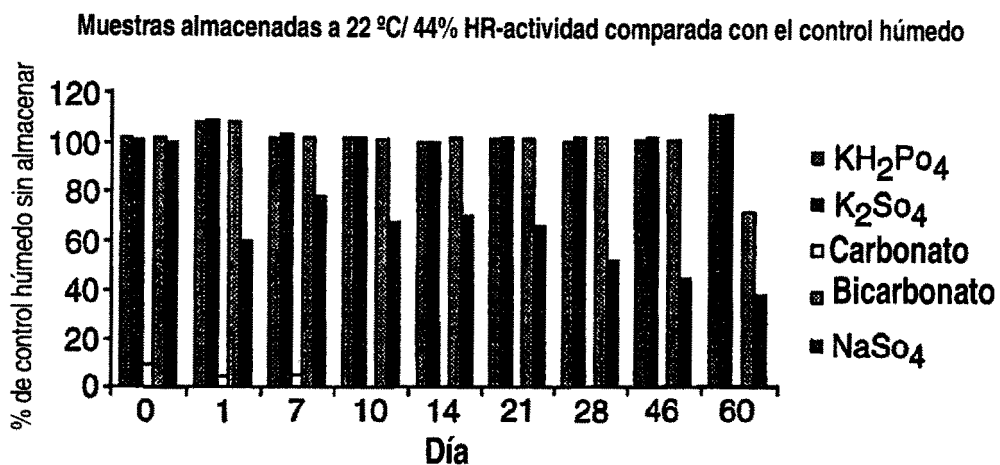


Fig.6.

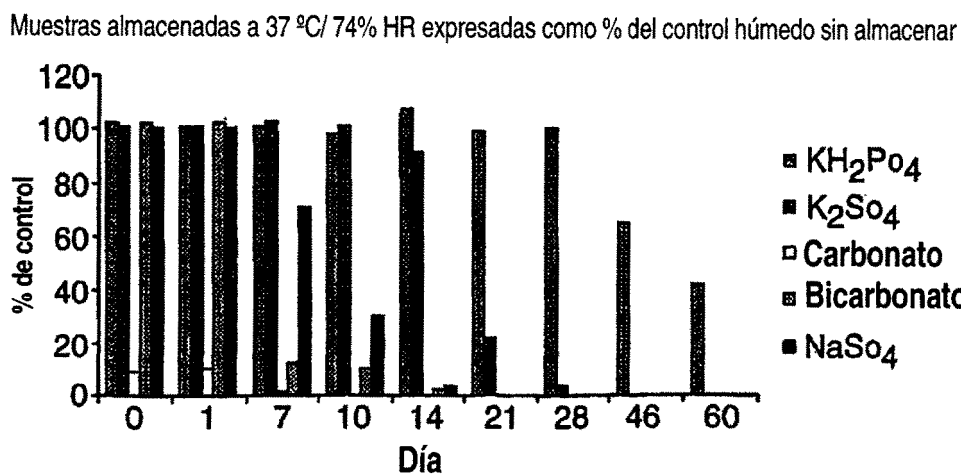


Fig.7.

Ensayo de gránulos procesados con calor

