

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 944**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016** **E 16197420 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022** **EP 3318281**

54 Título: **Azúcares altamente purificados y composiciones de azúcar**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2023

73 Titular/es:

COROLIS PHARMA RESEARCH GMBH (100.0%)
Fraunhoferstraße 18B
82152 Martinsried, DE

72 Inventor/es:

WEINBUCH, DANIEL;
Hawe, ANDREA y
JISKOOT, WIM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 939 944 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

Azúcares altamente purificados y composiciones de azúcar

Campo

- 5 La invención se refiere a azúcares, en particular sacarosa, su uso en composiciones farmacéuticas y, además, a impurezas nanoparticuladas comprendidas en azúcares. La invención se refiere además a métodos para obtener sacarosa con niveles reducidos de impurezas nanoparticuladas y métodos relacionados para preparar composiciones farmacéuticas.

Antecedentes

- 10 Según se describe en Weinbuch *et al.*; "Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations" (Impurezas nanoparticuladas en azúcares de calidad farmacéutica y su interferencia con el análisis de formulaciones de proteína basado en dispersión lumínica); Pharm Res. 2015, julio; 32(7):2419-27, se ha descubierto recientemente que azúcares de calidad farmacéutica tales como la sacarosa contienen impurezas nanoparticuladas (NPI, por sus siglas en inglés), es decir, nanopartículas sitas en el intervalo de tamaños de alrededor de 100-200 nm por término medio que, a diferencia de la sacarosa, no se disuelven en el medio acuoso. Estas impurezas dan lugar a una señal de interferencia a 100-200 nm que se observa habitualmente en disoluciones acuosas que contienen azúcar durante, por ejemplo, mediciones de dispersión lumínica dinámica (DLS) y análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). La señal no está causada por las moléculas de azúcar disueltas, cuyo tamaño mide solo alrededor de 0,5 nm y 1 nm, respectivamente, para monosacáridos y disacáridos. Otros autores también habrían advertido esta señal de interferencia en el pasado, pero no investigaron ni identificaron su causa ni sus efectos potenciales sobre composiciones farmacéuticas.

La intensidad de la señal de interferencia y, por lo tanto, la cantidad o recuento de partículas de NPI difiere entre los tipos de azúcar (por ejemplo, trehalosa, fructosa, maltosa y galactosa), sacarosa de diversos grados de pureza, obtenida de diferentes proveedores y distintos lotes del mismo proveedor; sin embargo, la distribución de los tamaños de partícula no varía mucho.

- 25 Weinbuch *et al.* han demostrado además que las nanopartículas presentes en la sacarosa son, al parecer, aglomerados compuestos de diversas impurezas que proceden de las materias primas, tales como dextranos, componentes de cenizas y colorantes aromáticos. No está claro si estas NPI se forman espontáneamente al disolverse en un medio acuoso (como el que suele estar presente durante los análisis DLS y NTA) o si ya están presentes en su forma nanoparticulada en la sacarosa sólida seca. Además, Weinbuch *et al.* guardan silencio sobre cualquier propiedad de tipo endotoxínico de las nanopartículas encontradas.

Las mismas consideraciones rigen, por ejemplo, para el documento WO01/36690A1. Aunque tiene como objeto la eliminación de azúcares invertidos mediante nanofiltración de una disolución de partida que contiene sacarosa, el documento WO01/36690A1 guarda total silencio sobre impurezas nanoparticuladas insolubles en agua que presentan un tamaño de partícula de 20-500 nm y/o propiedades de tipo endotoxínico.

- 35 De hecho, la presencia en azúcares, incluso azúcares de calidad farmacéutica, de NPI insolubles en agua con propiedades de tipo endotoxínico y que presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 20-500 nm, era completamente desconocida para el experto antes de la presente invención.

- 40 Asimismo, aunque el documento WO2015/191110A1 aborda la eliminación de endotoxinas en el sentido más estricto (es decir, lipopolisacáridos) de disoluciones acuosas de azúcar, empleando cromatografía de intercambio aniónico en una columna de polietilenimina (PEI), no se describen dichas endotoxinas ni explícita ni implícitamente como nanopartículas insolubles en agua de cualquier tamaño específico.

Según se desprende de los documentos WO01/36690A1 y WO2015/191110A1 de Weinbuch *et al.*, los azúcares pueden comprender una diversidad de impurezas sin ninguna relación estructural y/o de composición entre sí. Esto constituye un problema si se tiene en cuenta el uso de azúcares en composiciones farmacéuticas.

- 45 En composiciones farmacéuticas que comprenden principios biológicamente activos basados en polipéptidos se utilizan frecuentemente azúcares, en particular sacarosa y trehalosa, porque son excluidos preferencialmente de la superficie de la proteína, incrementando así la energía libre del sistema y favoreciendo la estabilidad conformacional. Además, los azúcares tales como la sacarosa se utilizan ampliamente como crioprotectores y lioprotectores para composiciones de proteína liofilizadas.

- 50 El impacto global de las NPI sobre la actividad biológica, el comportamiento o la estabilidad de composiciones farmacéuticas con principios activos basados en polipéptidos no ha sido investigado en el pasado, y en dichas composiciones se han utilizado ampliamente e incorporado azúcares, entre ellos la sacarosa, que cumplían con las especificaciones definidas en las respectivas monografías de la farmacopea, con independencia de su contenido de NPI.

La presente invención se basa en el descubrimiento hecho por los inventores de que las NPI pueden representar una

amenaza significativa para el comportamiento y la estabilidad de composiciones farmacéuticas que contengan sacarosa, y si no se controla el contenido de NPI existe un riesgo sustancial de no poder fabricar lotes de tales composiciones que tengan una calidad consistente.

Compendio de la invención

5 En un primer aspecto, la invención proporciona un método para preparar sacarosa ultrapura, comprendiendo el método los pasos de (b) proporcionar una cantidad de una primera sacarosa que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel de 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, donde las nanopartículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 20 nm a 500 nm, comprenden un (1-3)- β -glucano y presentan propiedades de tipo endotoxínico; donde antes del paso (b) se lleva a cabo un paso (a) de obtener o determinar el nivel de NPI en la primera sacarosa; y después (c) reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior (i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía de una disolución de dicha sacarosa; o (ii) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa. Opcionalmente, el método puede comprender además un paso (d) de concentrar la disolución de sacarosa del paso (i) hasta una concentración de 10 % (en peso/volumen, abreviado p/v) o superior, o de secar la disolución de sacarosa para obtener sacarosa sólida seca. Además, el método puede comprender además un paso de obtener o determinar el nivel de NPI en la primera sacarosa, opcionalmente mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

20 Como se ha indicado más arriba, las partículas de NPI insolubles en agua tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 20 nm a 500 nm. Además, las NPI pueden tener una distribución de tamaños de partícula (PSD, por sus siglas en inglés) caracterizada por un valor D50 de 80 nm a 300 nm, en particular de 100 nm a 200 nm, según lo medido mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de una disolución acuosa de la sacarosa.

25 Como también se ha indicado más arriba, las partículas de NPI insolubles en agua presentan además propiedades de tipo endotoxínico; es decir, dan un resultado positivo en ensayos para endotoxinas tales como los ensayos con lisado de amebocitos de Limulus (LAL, por sus siglas en inglés) y/o ensayos LAL modificados. Más específicamente, las NPI comprenden un (1-3)- β -glucano inmunomodulador, como puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos LAL modificados utilizando reactivos con Factor C eliminado, tales como el kit de ensayo Glucatell® específico para (1-3)- β -glucano.

30 Las NPI pueden comprender además un dextrano, opcionalmente reticulado y/o que presente una masa molecular media de 10 kDa a 100 kDa. Además, las NPI pueden comprender uno o más colorantes orgánicos y/o un compuesto inorgánico seleccionado entre silicio, aluminio, calcio, magnesio, fósforo, azufre, potasio, hierro o cualquier combinación de cualesquiera de estos.

35 El método puede llevarse a cabo para reducir el nivel de NPI a no más de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa, o no más de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa; o incluso de manera que la sacarosa esté sustancialmente exenta de NPI, como puede determinarse mediante cualquier técnica analítica adecuada basada en la dispersión lumínica, tal como el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) o la detección de zonas eléctricas utilizando el denominado contador Coulter.

40 Cuando mediante filtración o centrifugación, respectivamente, se reduce el nivel de NPI, ello puede realizarse sometiendo una disolución acuosa de sacarosa a un proceso de ultrafiltración o ultradiálisis o de ultracentrifugación, respectivamente. Opcionalmente, la ultrafiltración se puede realizar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,02 μ m o menor.

45 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una sacarosa ultrapura que se puede obtener por el método descrito más arriba. La invención proporciona además una sacarosa sólida cristalina que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel no superior a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa según lo determinado mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), preferiblemente no más de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa y más preferiblemente no más de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa.

50 En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de dicha sacarosa ultrapura para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo, preferiblemente un principio activo tal como un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína; un principio activo propenso a la agregación y/o degradación; y/o un principio activo sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas.

55 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo y sacarosa, comprendiendo el método los pasos de obtener o determinar el nivel de NPI en la sacarosa, opcionalmente mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA); después, si el nivel de NPI en la sacarosa es 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, o si el nivel de NPI en la sacarosa es tal que daría como resultado un nivel de NPI de 10^5 nanopartículas por gramo de composición o superior, reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior (i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía; o (ii)

diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa; y finalmente preparar la composición farmacéutica o de diagnóstico que incorpora la sacarosa.

5 Este método es particularmente útil cuando se prepara una pluralidad de lotes consecutivos de la composición farmacéutica o de diagnóstico de la manera descrita, utilizando opcionalmente distintos lotes de sacarosa. Ventajosamente, el método puede procurar una mayor reproducibilidad en términos de calidad, pureza y estabilidad de los lotes que la que se puede lograr actualmente con composiciones que contienen sacarosa.

La composición farmacéutica o de diagnóstico preparada con este método puede estar, por ejemplo, en forma de un polvo o una espuma sólida liofilizada para reconstituir, o en forma de un líquido acuoso.

10 En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico obtenida por el método de preparación descrito más arriba, para uso en el diagnóstico o la terapia de un ser humano o un animal no humano. Por ejemplo, la composición farmacéutica o de diagnóstico puede comprender un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína como principio activo; y/o un principio activo propenso a la agregación y/o degradación; y/o un principio activo sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas. En una realización, la composición farmacéutica o de diagnóstico puede comprender un anticuerpo monoclonal y/o la sacarosa de la composición farmacéutica o de diagnóstico está sustancialmente exenta de NPI según lo determinado mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

Definiciones

20 Se entenderá que todos los términos técnicos que se utilizan en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona capacitada en el campo técnico relevante. Además, los siguientes términos o expresiones, según se emplean en la presente memoria, deben interpretarse normalmente como se bosqueja en esta sección, salvo que se definan de otra manera en la descripción o salvo que el contexto específico indique o requiera otra cosa:

25 En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras 'comprenden', 'comprende' y 'que comprende' o 'que comprenden', y expresiones similares deben interpretarse, en un sentido abierto e inclusivo, como 'que incluye o incluyen, pero sin limitación'.

30 Debe entenderse que las formas singulares 'un', 'uno' o 'una' y 'el' o 'la' incluyen referentes plurales. Dicho de otro modo, todas las referencias a características o limitaciones singulares de la presente descripción deberán incluir la característica o limitación plural correspondiente, y viceversa. Los términos 'un', 'uno' o 'una' y 'el' o 'la' tienen, por lo tanto, el mismo significado que 'al menos uno o una', 'uno o más' o 'una o más'. Por ejemplo, la referencia a 'una nanopartícula' incluye una pluralidad de nanopartículas, y así análogamente.

35 Las expresiones 'una realización', 'una realización específica' y similares significan que un rasgo, propiedad o característica particulares, o un grupo o combinación particular de rasgos, propiedades o características, a los que se alude en combinación con la expresión respectiva, está presente en al menos una de las realizaciones de la invención. Estas expresiones, que aparecen en diversos lugares a lo largo de esta memoria descriptiva, no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, propiedades o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

40 Todos los porcentajes, partes y/o proporciones en el contexto de números deben entenderse con relación al número total de los elementos respectivos, salvo que el contexto especifique, indique o requiera otra cosa. Además, se pretende que todos los porcentajes, partes y/o proporciones sean en peso respecto del peso total; por ejemplo '%' debe leerse como '% en peso', salvo que se especifique otra cosa (por ejemplo, p/v), o el contexto lo indique o lo requiera.

Los términos y expresiones 'esencialmente', 'alrededor de', 'aproximadamente' (aprox.), 'circa' (ca.) y similares, en relación con un atributo o valor, incluyen el atributo exacto o el valor preciso, así como cualquier atributo o valor típicamente considerado dentro de un intervalo o variabilidad normales aceptados en el campo técnico en cuestión.

45 Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como una limitación a las realizaciones representadas en cualquiera de los dibujos.

50 Según se emplea en la presente memoria, la expresión 'impurezas nanoparticuladas' (NPI) significa impurezas que en un ambiente acuoso, en particular a un pH fisiológicamente compatible, por ejemplo dentro del intervalo de pH 4 a pH 9 o de pH 5 a pH 8, son detectables como nanopartículas que tienen un tamaño de partícula de 20 nm a 500 nm, por ejemplo, según lo determinado mediante difracción láser o dispersión lumínica dinámica. Además, las nanopartículas de NPI se caracterizan por presentar una inmunorreactividad de tipo endotoxínico, que puede detectarse o determinarse, por ejemplo, con un ensayo de Limulus, también conocido como ensayo con lisado de amebocitos de Limulus (LAL), o mediante cualquier otro ensayo para identificar propiedades de tipo endotoxínico, tal como un ensayo LAL modificado en el cual se ha eliminado el Factor C (por ejemplo, el ensayo GlucateII®). Aunque, según una definición restringida, las endotoxinas son lipopolisacáridos que se encuentran en la membrana externa de bacterias gramnegativas y que desencadenan respuestas inmunitarias en animales, también otros compuestos que no

necesariamente se derivan solo de bacterias (tales como el (1-3)- β -glucano, que también se encuentra en levaduras u hongos) pueden presentar propiedades inmunomoduladoras y pueden ser detectados y cuantificados, por ejemplo con el ensayo GlucateII®. Tanto a las endotoxinas bacterianas como al (1-3)- β -glucano se les denomina también en la bibliografía "patrones moleculares asociados a patógenos" (PAMP, por sus siglas en inglés).

- 5 Aplicada a las nanopartículas, la expresión 'insoluble en agua' significa que la sustancia o sustancias que forman las nanopartículas de NPI son sustancialmente menos solubles en agua que la sacarosa, por lo cual son detectables como nanopartículas en un ambiente acuoso.

- 10 Según se emplea en la presente memoria, el término 'ultrapuro' aplicado a la sacarosa significa que la sacarosa presenta un alto grado de pureza, también en cuanto al nivel de NPI. También puede entenderse el término en el sentido de que la sacarosa no incorpora NPI a un nivel que afectaría negativamente a la calidad, el comportamiento o la estabilidad de una formulación farmacéutica que comprendiera la sacarosa. La sacarosa que comprende NPI a un nivel no superior a alrededor de 10^6 nanopartículas por gramo también puede ser considerada una sacarosa ultrapura.

El término 'nanoparticulado', según se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo, forma, estructura o morfología de nanopartícula que pueda existir, en particular en un ambiente acuoso.

15 Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar sacarosa ultrapura, comprendiendo el método los pasos de:

- 20 (b) proporcionar una cantidad de una primera sacarosa que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel de 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, donde las nanopartículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 20 nm a 500 nm, comprenden un (1-3)- β -glucano y presentan propiedades de tipo endotoxínico;

donde antes del paso (b), se lleva a cabo un paso (a) de obtener o determinar el nivel de NPI en la primera sacarosa;

(c) reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior

- 25 (i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía de una disolución de dicha sacarosa; o

(ii) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa, y opcionalmente

(d) concentrar la disolución de sacarosa del paso (i) hasta una concentración de 10 % (p/v) o superior, o secar la disolución de sacarosa para obtener sacarosa sólida seca.

- 30 Los inventores han descubierto que las NPI presentes en la sacarosa, incluso a un nivel con el cual la sacarosa cumple con todas las especificaciones establecidas por las principales farmacopeas, puede afectar negativamente al comportamiento y la estabilidad de composiciones farmacéuticas con principios activos basados en polipéptidos. Además, los inventores han encontrado que, en particular, la consistencia del comportamiento y la estabilidad de tales composiciones entre un lote y otro pueden verse afectadas adversamente por niveles variables de NPI en la sacarosa.
- 35 En ausencia de tales conocimientos, era totalmente inesperado que al controlar el contenido de NPI de la sacarosa, por ejemplo seleccionando una sacarosa que tuviera un bajo contenido de NPI o purificando la sacarosa en cuanto al contenido de NPI antes de su incorporación en una composición farmacéutica, pudiera incrementarse significativamente la calidad de producto de las composiciones farmacéuticas y su consistencia entre un lote y otro.

- 40 Opcionalmente, el paso (a) de obtener o determinar el nivel de NPI en la primera sacarosa, que se lleva a cabo antes del paso (b), se efectúa mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) según se detalla, por ejemplo, en la sección de ejemplos que sigue; no obstante, también se puede emplear cualquier otro método de determinación del tamaño de partícula que sea capaz de detectar y cuantificar partículas en el intervalo de tamaños de 20 nm a 500 nm, por ejemplo otras técnicas analíticas basadas en la dispersión lumínica, tales como la dispersión lumínica dinámica (DLS).

- 45 En una realización, las partículas de NPI tienen una distribución de tamaños de partícula en una disolución acuosa que se caracteriza por un valor D50 de 80 nm a 300 nm según lo medido mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), en particular de 100 nm a 200 nm o de 125 nm a 165 nm.

- 50 En una realización adicional, el valor D90 vale de alrededor de 100 nm a alrededor de 400 nm, según lo medido mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), en particular de alrededor de 150 nm a alrededor de 350 nm o de alrededor de 220 nm a alrededor de 290 nm. Como alternativa, el valor D10 vale de alrededor de 50 nm a alrededor de 150 nm, según lo medido mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), en particular de alrededor de 70 nm a alrededor de 130 nm o de alrededor de 80 nm a alrededor de 110 nm.

En una realización adicional, la distribución de tamaños de partícula de las partículas de NPI es monomodal.

Según se ha indicado más arriba, las NPI comprenden un (1-3)- β -glucano. Este tipo de compuesto –que se puede derivar de las paredes celulares de bacterias, levaduras y hongos– puede contribuir a las propiedades inmunomoduladoras o de tipo endotoxínico de las NPI o incluso ser su principal responsable. Esta es una de las razones por las cuales debe mantenerse lo más bajo posible el nivel de NPI en la sacarosa, pero también en las composiciones farmacéuticas que contienen sacarosa. La presencia y el contenido de (1-3)- β -glucano en las NPI se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo con lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), modificado, utilizando un reactivo en el cual se ha eliminado el Factor C, lo que hace a este ensayo más específico para (1-3)- β -glucano. Este ensayo se detalla, por ejemplo, en la sección de ejemplos que sigue. Sin desear quedar limitados por la teoría, es posible que los (1-3)- β -glucanos que se encuentran en las NPI provengan, al menos parcialmente, de las paredes celulares de microorganismos, por ejemplo bacterias *Leuconostoc*, que entran en la caña de azúcar o la remolacha durante la cosecha, el corte y la molienda, por ejemplo, pero también durante pasos de elaboración posteriores; no obstante, también pueden provenir de otras fuentes, tales como hongos o levaduras.

Basado en el descubrimiento hecho por los inventores de que puede estar presente un (1-3)- β -glucano en nanopartículas de NPI derivadas de sacarosa, el método de la invención resulta particularmente ventajoso y conduce a mejoras inesperadas en la calidad de producto, el comportamiento y la estabilidad para cualquier composición farmacéutica en cuya fabricación se contemple la incorporación de una sacarosa que comprenda dichas NPI.

En una realización, las NPI comprenden un dextrano, donde el dextrano está opcionalmente reticulado y/o presenta una masa molecular media de 10 kDa a 100 kDa. En una realización específica, las NPI comprenden un (1-3)- β -glucano y un dextrano, donde el dextrano está opcionalmente reticulado y/o presenta una masa molecular media de 10 kDa a 100 kDa.

Además, las NPI pueden comprender uno o más colorantes orgánicos y/o un compuesto inorgánico seleccionado entre silicio, aluminio, calcio, magnesio, fósforo, azufre, potasio, hierro o cualquier combinación de cualesquiera de estos. En una realización específica, los colorantes son colorantes aromáticos, según se puede detectar o determinar, por ejemplo, midiendo la fluorescencia interna de una muestra. En una realización más específica, los colorantes son colorantes aromáticos que presentan dos patrones de máxima intensidad de fluorescencia; el patrón 1 a alrededor de 280/390 nm (que puede ser causado potencialmente por dos fluoróforos con una gran similitud con el triptófano y la tirosina) y el patrón 2 a alrededor de 340/420 nm (que puede ser causado potencialmente por catecoles formados por degradación del azúcar catalizada por bases).

En una realización del método para preparar sacarosa ultrapura, se lleva a cabo el paso (c) para reducir el nivel de NPI a no más de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa, o no más de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa; o de manera que la sacarosa esté sustancialmente exenta de NPI según lo determinado mediante técnicas analíticas basadas en la dispersión lumínica, tales como la dispersión lumínica dinámica (DLS) o el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). A este respecto, debe entenderse que 'sustancialmente exenta de NPI' significa que no se pueden detectar NPI de acuerdo con los métodos actualmente disponibles; sin embargo, esto no excluye que de todos modos pueda estar presente un pequeño número de partículas por debajo del nivel de detección del método respectivo, por ejemplo el NTA.

En una realización se puede realizar el paso (c) para reducir el nivel de partículas de NPI por gramo de sacarosa en un factor de 100 o más. Opcionalmente, se realiza el paso (c) para reducir las partículas de NPI en un factor de al menos 200, o al menos 300, o al menos 500, o al menos 1000, o al menos 2000, o al menos 3000, o al menos al menos 5000, o al menos 10.000, respectivamente.

En una realización, en el paso (c)(i) se realiza la filtración como ultrafiltración o ultradiafiltración de una disolución acuosa de la primera sacarosa. Opcionalmente, se puede someter la disolución acuosa de la primera sacarosa a ultrafiltración a través de un filtro con un tamaño de poro de aprox. 0,02 μ m o menor, tal como un filtro de PVDF con un tamaño de poro nominal tan pequeño como 0,001 μ m; o a través de una membrana con un umbral de corte de 30 kDa o menor. La filtración a través de un filtro de 0,02 μ m reduce a niveles de fondo la señal relacionada con NPI en las mediciones tanto por DLS como por NTA, es decir, ya no aparece un pico a alrededor de 100-200 nm. Se ha encontrado que filtros con tamaños de poro mayores, tales como los filtros para filtración estéril comunes (a menudo de 0,2 μ m o de 0,22 μ m) o incluso filtros de 0,1 μ m, son sustancialmente menos eficaces para reducir el nivel de NPI en disoluciones acuosas de sacarosa.

En una realización específica, o como alternativa a la ultrafiltración mediante filtros de jeringa, se puede someter la disolución acuosa de la primera sacarosa a ultradiafiltración en un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) equipado con una membrana TFF; por ejemplo, una membrana TFF con un umbral de corte de 30 kDa o menor. Los inventores han utilizado dichos sistemas de ultradiafiltración para obtener y/o purificar NPI a partir de disoluciones acuosas de sacarosa, por ejemplo con el fin de investigar el tamaño y la composición de las NPI y/o el nivel de las mismas por gramo de sacarosa.

En una realización adicional, la centrifugación en el paso (c)(i) se realiza como ultracentrifugación de una disolución acuosa de la primera sacarosa. Opcionalmente, durante la ultracentrifugación se pueden emplear unidades de filtro centrífugo, por ejemplo unidades equipadas con una membrana filtrante con un umbral de corte de 30 kDa o 10 kDa. Los inventores también han utilizado dichas unidades de filtración centrífuga para obtener y/o purificar NPI a partir de disoluciones acuosas de sacarosa, en particular para concentrar muestras contenían NPI, después de la

ultradiafiltración.

Según se ha descrito más arriba para el paso (c)(ii), también se puede obtener una sacarosa con nivel aceptable de NPI (es decir, como máximo 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa; o dicho de otro modo, mezclando una 'sacarosa con alto contenido de NPI' con una 'sacarosa con bajo contenido de NPI' hasta que el contenido total de la mezcla se sitúe por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa.

Se entenderá que normalmente este paso de dilución es aconsejable y económicamente razonable solamente en aquellos casos donde la segunda sacarosa presenta un contenido de NPI lo suficientemente bajo como para "contrarrestar" el mayor contenido de NPI en la primera sacarosa. Por ejemplo, si la primera y la segunda sacarosa comprenden respectivamente 10^6 y 10^1 nanopartículas por gramo de sacarosa, sería suficiente una mezcla 1:10 para reducir las NPI en la mezcla a un nivel aceptable por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa. Esta proporción razonable de dilución o mezcla permitiría a los fabricantes de azúcares de calidad farmacéutica tener en cuenta —dentro de los límites establecidos— las diferencias inherentes en sus materias primas que pudieran tener un efecto en el nivel final de NPI. Por ejemplo, el contenido de dextrano en la materia prima generalmente viene dado por la carga de bacterias *Leuconostoc*, como se ha descrito más arriba.

Sin embargo, si la primera sacarosa comprende ya un número de NPI mayor, tal como 10^9 nanopartículas por gramo de sacarosa (un contenido que los inventores encontraron en sacarosa de calidad farmacéutica en un estudio anterior), incluso las mezclas con una segunda sacarosa sustancialmente exenta de NPI requerirían cantidades muy grandes de dicha segunda sacarosa; en cuyo caso puede ser económicamente más razonable eliminar o reducir estas NPI de la primera sacarosa mediante uno de los otros pasos, tales como filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía, en lugar de intentar una dilución.

En un aspecto adicional, la invención también proporciona la sacarosa que se puede obtener mediante el método o los métodos descritos en lo que antecede; es decir, una sacarosa purificada de la cual se han eliminado sustancialmente las NPI o en la cual el nivel de NPI ha sido reducido a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior. Tal sacarosa ultrapura ofrece una serie de ventajas, en particular cuando se la incorpora a composiciones farmacéuticas o de diagnóstico. Por ejemplo, la sacarosa ultrapura introduce menos NPI y, en consecuencia, menos (1-3)- β -glucano (al estar comprendido en las NPI) y menos nanopartículas que podrían actuar potencialmente como núcleo inicial o sitio de nucleación para procesos de cristalización y/o agregación, especialmente en composiciones acuosas. De este modo se mejora la estabilidad y la vida útil de las composiciones (acuosas) y se reduce el riesgo de reacciones inmunogénicas. Además, dado que los inventores informan de que el nivel de NPI hallado en la sacarosa varía notablemente, el hecho de eliminar o al menos reducir el nivel de NPI al nivel de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior ayuda a asegurar y/o mejorar la reproducibilidad de un lote a otro durante la preparación de composiciones farmacéuticas o de diagnóstico; es decir, una pluralidad de lotes consecutivos preparados con sacarosa mostrarán menos variabilidad en términos de parámetros de calidad, pureza y estabilidad, tales como el contenido y la actividad del fármaco o el número de agregados formados en el tiempo t_0 (después de la preparación) y transcurridos los tiempos t_1 a t_n durante el almacenamiento en condiciones ambientales y/o aceleradas.

Las mismas ventajas son válidas para la sacarosa ultrapura que no contenga más de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa en sí, es decir, para una sacarosa que contenga niveles limitados de NPI como resultado de, por ejemplo, un proceso optimizado de refinación de azúcar y/o bajos niveles iniciales de NPI en las materias primas de las que se ha obtenido la sacarosa. Por lo tanto, en un aspecto similar, la invención también proporciona sacarosa ultrapura, sólida y cristalina, que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel no superior a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa según lo determinado mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). En realizaciones preferidas, la sacarosa ultrapura, sólida y cristalina comprende no más de alrededor de 10^4 nanopartículas por gramo de sacarosa, no más de alrededor de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa; o no más de alrededor de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa, respectivamente.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona el uso de sacarosa ultrapura (es decir, sacarosa que comprende no más de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa) para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo o fármaco. Según se ha descrito más arriba, el uso de sacarosa ultrapura ofrece diversos beneficios cuando se incorpora en tales composiciones. De nuevo, también se prefiere que la sacarosa ultrapura comprenda no más de alrededor de 10^4 nanopartículas por gramo de sacarosa, no más de alrededor de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa; o no más de alrededor de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa, respectivamente.

Preferiblemente, el principio activo en estas composiciones farmacéuticas o de diagnóstico es (a) un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína; (b) propenso a la agregación y/o degradación; y/o (c) sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas. Las proteínas tienen una propensión inherente a agregarse (y finalmente precipitar) porque su estructura es dinámica y se mantiene unida principalmente por una combinación de fuerzas de van der Waals, enlaces disulfuro, enlaces de hidrógeno, etc., y a medida que avanza la agregación, la actividad de las moléculas de proteína puede disminuir o perderse, reduciendo así la eficacia de la composición. Además, se sabe a partir de estudios que la presencia de

agregados de proteína en una composición (especialmente cuando está destinada a la administración parenteral) puede desencadenar respuestas inmunitarias no deseadas y/o potencialmente peligrosas en el receptor. Ya es conocido que, entre otros factores, la presencia de partículas contaminantes tales como gotitas de aceite de silicona o caucho de silicona procedente de los sistemas de cierre del recipiente favorecen la agregación de proteínas; y aparentemente lo mismo es válido para las NPI tal como han descubierto los inventores al emplear anticuerpos, por ejemplo, como fármacos modelo (véanse, por ejemplo, los ejemplos que se exponen más adelante). Por lo tanto, las composiciones que comprenden proteínas y/u otros principios activos propensos a la agregación y/o degradación pueden beneficiarse en particular del uso de sacarosa ultrapura.

En lo que respecta al principio activo debe entenderse que en algunos casos también la propia sacarosa puede ser considerada el principio activo, o al menos como uno de los principios activos; por ejemplo cuando la composición farmacéutica es una disolución oral (por ejemplo una disolución oral de sacarosa al 24 % para el alivio del dolor en neonatos) o una composición para nutrición parenteral. Estas últimas en particular pueden beneficiarse del uso de sacarosa ultrapura, ya que la inmunogenicidad relacionada con (1-3)- β -glucano es típicamente más pronunciada con las composiciones parenterales que con las orales.

Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo y sacarosa, comprendiendo el método los pasos de

(a) obtener o determinar el nivel de NPI en la sacarosa, opcionalmente mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA);

(b) si el nivel de NPI en la sacarosa es 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, o si el nivel de NPI en la sacarosa es tal que daría como resultado un nivel de NPI de 10^5 nanopartículas por gramo de composición o superior, reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior

(i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía; o

(ii) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa; y

(c) preparar la composición farmacéutica o de diagnóstico que incorpora la sacarosa.

En una realización, la composición farmacéutica o de diagnóstico preparada por el método anterior se suministra en forma de (a) un polvo o una espuma sólida liofilizada para reconstituir, o (b) un líquido acuoso. En cuanto al contenido de nanopartículas por gramo de composición, debe entenderse que el nivel de NPI indicado se refiere a la composición final; es decir, en el caso de un polvo o una espuma sólida liofilizada para reconstituir, se pretende que se refiera a la composición reconstituida. El contenido de sacarosa en productos para reconstituir comunes actualmente comercializados, tales como Enbrel®, Serostim®, Remicade® o Stelara® está típicamente por debajo de 10 % en las disoluciones reconstituidas, situándose en un intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 8 %, por lo que es recomendable reducir el nivel de NPI en la composición por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de composición, preferiblemente por debajo de 10^4 nanopartículas por gramo de composición y más preferiblemente por debajo de 10^3 nanopartículas por gramo de composición.

En una realización específica, se reducirá el nivel de NPI a 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior empleando los pasos (i) o (ii) mencionados más arriba si el nivel de NPI en la sacarosa es tal que daría como resultado un nivel de NPI de 10^5 nanopartículas por gramo de composición o superior.

En una realización específica, la separación de las NPI de la sacarosa en el paso (i) del método de preparación anterior mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía se lleva a cabo de manera que reduce el número de nanopartículas por debajo del límite de detección del método respectivo, por ejemplo el NTA; es decir, de manera que la sacarosa esté sustancialmente exenta de NPI cuando sea incorporada a la composición farmacéutica o de diagnóstico junto con el principio activo.

En cuanto a los niveles de NPI elegidos en la presente memoria en términos de niveles máximos aceptados por unidad de sacarosa o por unidad de una composición (o niveles deseables que se deben cumplir o preferiblemente estar por debajo), debe entenderse que estos niveles se indican principalmente como guía, y la persona experta puede adaptarlos a situaciones o productos específicos. Se entenderá fácilmente que una composición que contiene solamente cantidades bastante bajas de sacarosa, tales como alrededor de 2 % o menos, puede tolerar un nivel de NPI más alto que una composición con contenidos bastante altos de sacarosa, tales como alrededor de 10 % o más. De manera similar, una composición que comprenda compuestos sensibles a la agregación tales como proteínas o que comprenda fármacos sobresaturados propensos a la precipitación puede ser más sensible al nivel de NPI de la sacarosa utilizada que otras composiciones en las que es menos probable que las NPI desencadenen agregación o cristalización. Además, una composición pediátrica destinada a neonatos o lactantes puede requerir niveles de NPI menores que las composiciones para adultos, ya que los lactantes normalmente reaccionarán de manera más sensible a endotoxinas tales como el (1-3)- β -glucano comprendido en las NPI.

En una realización se prepara una pluralidad de lotes consecutivos de la composición farmacéutica o de diagnóstico, y cada uno de estos lotes se prepara siguiendo los pasos del método descrito en lo que antecede. Opcionalmente se pueden emplear lotes de sacarosa diferentes.

El hecho de preparar una pluralidad de lotes consecutivos (en lugar de, por ejemplo, solo un lote específico para un paciente) es muy común en el campo de la preparación de composiciones farmacéuticas o de diagnóstico. También es común que se utilicen diferentes lotes de las materias primas requeridas. Tal como han demostrado los inventores, el nivel de NPI que se encuentra en la sacarosa varía. Por lo tanto, eliminar o reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o incluso menos ayuda a asegurar y/o mejorar la reproducibilidad de un lote a otro de las composiciones farmacéuticas o de diagnóstico que se preparan. En consecuencia, la pluralidad de lotes consecutivos mostrará menos variabilidad en términos de parámetros de calidad, pureza y estabilidad, tales como el contenido y la actividad del fármaco o el número de agregados formados en el tiempo t_0 (después de la preparación) y transcurridos los tiempos t_1 a t_n durante el almacenamiento en condiciones ambientales y/o aceleradas.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico obtenida por el método de preparación precedente, para uso en el diagnóstico o la terapia de un ser humano o un animal no humano.

En una realización, el principio activo utilizado en el diagnóstico o la terapia es (a) un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína; (b) un principio activo propenso a la agregación y/o degradación; y/o (c) un principio activo sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas.

En una realización específica, el principio activo de la composición farmacéutica o de diagnóstico es un anticuerpo monoclonal; y/o la composición farmacéutica o de diagnóstico con sacarosa está sustancialmente exenta de NPI según lo determinado mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

Ejemplos

Ejemplo 1: NPI derivadas de sacarosa y su efecto sobre la estabilidad de anticuerpos monoclonales

Hospitales locales donaron Herceptin® (trastuzumab), MabThera® (rituximab), Remicade® (infliximab) y Erbitux® (cetuximab). Se adquirió sacarosa de calidad farmacéutica (Ph. Eur.) de VWR BDH Prolabo® (Bruchsal, Alemania) y Südzucker (Mannheim, Alemania). Se adquirieron histidina-HCl, trehalosa, citrato de sodio, cloruro de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio y ácido cítrico de Merck (Darmstadt, Alemania). Se adquirieron polisorbato 20 y 80, así como glicina, de Sigma (Taufkirchen, Alemania). Se adquirió histidina de Amresco (Solon, Ohio, EE. UU.). Se obtuvieron de Millipore (Schwalbach, Alemania) filtros de jeringa con membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,2 μm .

Se obtuvieron partículas de NPI a partir de lotes de sacarosa de calidad farmacéutica mediante diafiltración de 1 L de disolución acuosa recién preparada de sacarosa al 50 % (p/v) utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) Minimate II equipado con una membrana TFF de 30 kDa (ambos de Pall, Cralisheim, Alemania). Se concentró el retenido hasta alrededor de 300 mL y posteriormente se diafiltró con agua MilliQ® hasta alcanzar un volumen de diafiltración (DV) 14 (relación entre volumen de filtrado y volumen de retenido). Después se concentró el retenido hasta alrededor de 50 mL y se filtró con un filtro de jeringa (0,2 μm) antes de concentrar aún más el retenido hasta alrededor de 1 mL con unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra 15 (Millipore) con un umbral molecular de corte de 10 kDa. Se dividió en alícuotas la muestra de NPI, en criotubos de 0,5 mL, y por último se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior. La muestra final contenía 7×10^{11} nanopartículas/mL, presentando las partículas un intervalo de tamaños de alrededor de 100-200 nm y una PSD monomodal, según lo determinado mediante NTA (véase más abajo).

Para el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de las partículas de NPI se utilizó un instrumento NanoSight LM20 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido) equipado con un láser azul de 405 nm, una cámara de muestra y una junta tórica de fluoroelastómero Viton. Con una jeringa de 1 mL y un volumen de análisis previo de 0,5 mL, se cargan las muestras en la cámara de muestra y posteriormente se analizan por triplicado con flujo detenido. Entre una repetición y otra se hacen pasar 0,1 mL de muestra a través de la cámara. Se utiliza el *software* NTA 2.3 para capturar y analizar los datos; y los movimientos de las partículas en las muestras se graban como vídeos de 60 s de duración, mientras el *software* configura automáticamente los parámetros de obturador y de ganancia de la cámara para obtener una resolución óptima de las partículas. En caso de ser necesario diluir la muestra para lograr una concentración más optimizada para el NTA, se utiliza como diluyente agua ultrapura de Tipo 1 tal como se define, por ejemplo, en la norma ISO 3696 (por ejemplo, agua Milli-Q® o agua MQ) y se recalculan todos los resultados para la concentración original.

El potencial zeta de las partículas de NPI se midió mediante electroforesis Doppler láser (LDE, por sus siglas en inglés) utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) y el *software* Zetasizer versión 7.03 para control del sistema y adquisición de datos. Se tamponaron a pH 7,4 (tampón de fosfato 1 mM) o a pH 3,0 (tampón de citrato 1 mM) muestras de NPI a una concentración (basada en NTA) de 5×10^{11} nanopartículas/mL, y para la medición se transfirieron 1000 μL de muestra a una celda capilar plegada (Malvern). Cada medición de potencial

zeta es el promedio de tres mediciones consistentes en 100 subejecuciones. La evaluación LDE reconfirmó los resultados anteriores en el sentido de que las partículas de NPI presentaban un potencial zeta de $-13,4 \pm 1,6$ (a pH 7,4) y $-8,0 \pm 0,3$ mV (a pH 3,0).

El nivel de (1-3)- β -glucano en las partículas de NPI se mide empleando un kit GlucateLL® (Cape Cod, East Falmouth, EE. UU.) conforme a las instrucciones del fabricante. Para ello se diluyen con agua exenta de endotoxinas las muestras que contienen NPI, en cuatro pasos de dilución 1 a 10 en serie, en condiciones asépticas y libres de partículas. Se coloca la mezcla de muestra (diluida) y el reactivo GlucateLL® en un bloque calefactor de microplacas a 37 °C durante el tiempo recomendado. Para detener la reacción se añade a la mezcla un volumen de 50 μ L de cada uno de los tres reactivos diazo. Se mide la absorbancia a 545 nm y se calcula la concentración de (1-3)- β -glucano en pg/mL basándose en una curva patrón. Las partículas de NPI originaron una intensa señal de (1-3)- β -glucano, en concreto 750 ng/mL para la muestra de NPI con alrededor de 7×10^{11} nanopartículas/mL, en comparación con solo 0,013 ng/mL para la muestra testigo.

Se diluyeron trastuzumab, rituximab, infliximab y cetuximab a una concentración de anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés) de 2 mg/mL empleando los siguientes tampones de formulación (todos filtrados a través de filtros de jeringa, de PVDF, de 0,2 μ m):

Trastuzumab: histidina-HCl 2,4 mM, histidina 2,1 mM, trehalosa 52,9 mM y polisorbato 20 al 0,009 % a pH 6,0.

Rituximab: tampón de citrato 25 mM, cloruro de sodio 9 g/l y polisorbato 80 0,7 g/l a pH 6,5.

Infliximab: tampón de fosfato 5 mM, sacarosa 50 g/L (Südzucker) y polisorbato 80 al 0,005 % a pH 7,2.

Cetuximab: tampón de ácido cítrico 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, glicina 100 mM y polisorbato 80 al 0,01 % a pH 5,5.

Se enriquecieron con NPI el trastuzumab, el rituximab, el infliximab y el cetuximab, así como sus tampones de formulación correspondientes, hasta una concentración final de $3,5 \times 10^{10}$, $3,5 \times 10^9$, $3,5 \times 10^8$ y $3,5 \times 10^7$ nanopartículas/mL (basada en NTA) o se les añadió un volumen equivalente de muestra testigo (agua MQ tratada de la misma manera que las disoluciones de sacarosa y que presentaba valores de nanopartículas por debajo del límite de cuantificación del NTA). Todas las muestras del nivel de $3,5 \times 10^{10}$ nanopartículas de NPI/mL fueron transferidas después a viales 2R estériles (volumen de llenado 1 mL) y se midió cada alícuota ($N = 1$) al menos un día después de la preparación (t_0), y transcurridas 2, 8 y 14 semanas de almacenamiento (t_{2w} , t_{8w} , t_{14w}) a 2-8 °C, 25 °C o 40 °C.

Además, se almacenaron a 40 °C durante una semana muestras de los cuatro niveles de NPI, para estudiar la dependencia respecto de la concentración. La manipulación de las muestras se realizó en condiciones de flujo laminar de aire.

Para evaluar los efectos de las NPI sobre la estabilidad de los anticuerpos monoclonales, se evaluaron visualmente las muestras mediante imágenes de microflujo (MFI, por sus siglas en inglés), análisis de seguimiento de nanopartículas y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Para la inspección visual conforme a la Farmacopea Europea, se analizaron de forma independiente los viales por dos examinadores capacitados, a fin de determinar la presencia o ausencia de partículas visibles o turbidez bajo agitación radial manual suave, durante 5 s frente a un fondo blanco y durante 5 s frente a un fondo negro

Para las imágenes de microflujo (MFI) se utilizó un sistema MFI5200 (ProteinSimple, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con una celda de flujo de 100 μ m y controlado por el *software* MFI View System Software (MVSS) versión 2-R2.6.1.20.1915. Se enjuagó el sistema con 10 mL de agua purificada a caudal máximo y se comprobó visualmente la limpieza de la celda de flujo entre mediciones. Para realizar la optimización de la iluminación antes de cada medición se utilizó como blanco el tampón de formulación respectivo. Se analizaron muestras de 0,5 mL con un volumen de 0,2 mL previo al análisis, a un caudal de 0,17 mL/min y una velocidad de cámara fija (no ajustable por el usuario), lo que llevó a una eficacia de muestreo de alrededor de 80-85 %.

Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna TSK Gel 4000 SWXL (300 mm $\times$ 7,8 mm) (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, EE. UU.) y un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE. UU.) acoplado a un detector ultravioleta (UV) ajustado a 280 nm. La fase móvil estaba compuesta por fosfato de sodio 100 mM y sulfato de sodio 100 mM a un pH de 7,0. Se fijó el caudal en 0,6 mL/min. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 3 minutos, se mantuvieron a 2-8 °C y se inyectaron en duplicados de 25 μ L cada uno. Se calculó la recuperación de muestra como el área total del pico en relación a la muestra enriquecida con el testigo, en el t_0 . Los picos con un tiempo de retención superior a 20 minutos estaban relacionados con el tampón, y no se les tuvo en cuenta. El tiempo de retención del pico de monómero fue 17,5 minutos. Los picos con un tiempo de retención más corto que el monómero fueron considerados especies de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés). A la inversa, los picos con un tiempo de retención más largo que el monómero fueron considerados especies de bajo peso molecular (LMW). Los contenidos de monómero, especies HMW y especies LMW se indican en porcentaje con respecto a la recuperación total de la muestra.

Resultados

Las NPI afectan negativamente a la estabilidad de los cuatro anticuerpos monoclonales (mAb) ensayados, aunque en distinto grado; es decir, los cuatro mostraron una degradación que era más pronunciada en comparación con la muestra testigo, tras la exposición a partículas de NPI. La Tabla 1 resume y clasifica los efectos observados de las NPI sobre la estabilidad de los anticuerpos ensayados. Una puntuación más alta (suma de signos '+') se corresponde con una degradación de mAb más pronunciada en comparación con los otros mAb ensayados.

El rituximab fue el afectado en menor medida por la presencia de NPI, mostrando la formación inmediata de un gran número de partículas de tamaño nanométrico como principal producto de degradación. El cetuximab mostró de manera similar la formación inmediata de un gran número de partículas de tamaño nanométrico como principal producto de degradación, pero en general se degradó más intensamente que el rituximab. El trastuzumab mostró la formación de gran número de partículas de tamaño micrométrico como principal producto de degradación, y la aparición de turbidez. Entre los mAb ensayados, el infliximab fue el que se degradó en mayor medida, mostrando un gran número de partículas de tamaño nanométrico y micrométrico como principal producto de degradación, así como la aparición de turbidez.

Además, la estabilidad del trastuzumab y del infliximab se vio afectada directamente después del enriquecimiento con NPI. Por el contrario, solo se observó degradación de rituximab y cetuximab al cabo de 14 semanas a temperaturas elevadas. Además, la estabilidad del rituximab y el infliximab se vio afectada por concentraciones de NPI que están potencialmente presentes en productos farmacéuticos finales. Sin embargo, la estabilidad del trastuzumab solamente se vio afectada a concentraciones elevadas de NPI.

Parámetro	Método	trastuzumab	rituximab	infliximab	cetuximab
partículas visibles	inspección visual	+	-	+	-
turbiedad	inspección visual	++	-	++	+
partículas micrométricas	MFI	++	+	++	+
partículas nanométricas	NTA	-	++	++	++
especies HMW	SEC	-	-	-	+
recuperación de muestra	SEC	+	-	+	-
especies LMW	SEC	-	+	+	-
suma de +		6	4	9	5

Tabla 1: Influencia de las NPI sobre parámetros de estabilidad de mAb (con respecto al testigo)

- = no afectado

+ = afectado a elevadas concentraciones de NPI y/o efecto retardado

++ = afectado con gran intensidad e inmediatamente y/o afectado a concentraciones de NPI potencialmente presentes en productos farmacéuticos

Por el contrario, los testigos de tampón de formulación no mostraron inestabilidades en ninguno de los parámetros ensayados y los valores de pH medidos inmediatamente después de la preparación de la muestra no diferían en más de 0,1 unidades de pH de los de las muestras testigo correspondientes. Por lo tanto, puede excluirse que las observaciones se deban únicamente a diferencias en la composición del tampón de formulación o que sean resultado de inestabilidades del excipiente y/o variaciones de pH.

Se concluye que la presencia de NPI en composiciones (bio)farmacéuticas o de diagnóstico constituye una amenaza para la estabilidad de los mAb. Además, las NPI pueden tener consecuencias inmunológicas no deseadas, ya que se ha demostrado que las partículas de NPI contienen un alto contenido de (1-3)- β -glucano, que es una molécula inmunomoduladora.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar sacarosa ultrapura, comprendiendo el método los pasos de:
 - (b) proporcionar una cantidad de una primera sacarosa que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel de 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, donde las nanopartículas tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 20 nm a 500 nm, comprenden un (1-3)- β -glucano y presentan propiedades de tipo endotoxínico;donde antes del paso (b) se lleva a cabo un paso (a) de obtener o determinar el nivel de NPI en la primera sacarosa,
 - (c) reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior
 - (i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía de una disolución de dicha sacarosa; o
 - (ii) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa, y opcionalmente
 - (d) concentrar la disolución de sacarosa del paso (i) hasta una concentración de 10 % (p/v) o superior, o secar la disolución de sacarosa para obtener sacarosa sólida seca.
2. El método según la reivindicación 1, donde las partículas de NPI tienen, en una disolución acuosa, una distribución de tamaños de partícula caracterizada por un valor D50 de 80 nm a 300 nm, según lo medido mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), en particular de 100 nm a 200 nm.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, donde las NPI comprenden:
 - (a) un dextrano, donde el dextrano está opcionalmente reticulado y/o presenta una masa molecular media de 10 kDa a 100 kDa,
 - (b) un colorante orgánico, y/o
 - (c) un compuesto inorgánico seleccionado entre silicio, aluminio, calcio, magnesio, fósforo, azufre, potasio, hierro o cualquier combinación de cualesquiera de estos.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se lleva a cabo el paso (a) mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se lleva a cabo el paso (c) para reducir el nivel de NPI a no más de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa, o no más de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa; o de manera que la sacarosa está sustancialmente exenta de NPI según lo determinado mediante técnicas analíticas basadas en la dispersión lumínica, tales como la dispersión lumínica dinámica (DLS) o el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se realiza la filtración como ultrafiltración o ultrafiltración de una disolución acuosa de la primera sacarosa, opcionalmente a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,02 μ m o menor, o a través de una membrana con un umbral de corte de 30 kDa o menor; y/o
- donde se realiza la centrifugación como ultracentrifugación de una disolución acuosa de la primera sacarosa.
7. Sacarosa que se puede obtener por el método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. Sacarosa sólida cristalina que comprende impurezas nanoparticuladas (NPI) insolubles en agua, a un nivel no superior a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa según lo determinado mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), preferiblemente no más de 10^3 nanopartículas por gramo de sacarosa y más preferiblemente no más de 10^2 nanopartículas por gramo de sacarosa.
9. Uso de la sacarosa según las reivindicaciones 7 u 8 para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo, donde el principio activo es preferiblemente
 - (a) un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína;
 - (b) propenso a la agregación y/o degradación; y/o
 - (c) sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas.
10. Un método para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un principio activo y sacarosa, comprendiendo el método los pasos de

- (a) obtener o determinar el nivel de NPI en la sacarosa, opcionalmente mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA);
- (b) si el nivel de NPI en la sacarosa es 10^6 nanopartículas por gramo de sacarosa o superior, o si el nivel de NPI en la sacarosa es tal que daría como resultado un nivel de NPI de 10^5 nanopartículas por gramo de composición o superior, reducir el nivel de NPI a 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa o inferior
- 5 (i) separando al menos algunas de las NPI de la sacarosa, opcionalmente mediante filtración, centrifugación, cristalización o cromatografía; o
- (ii) diluyendo la primera sacarosa con una segunda sacarosa, comprendiendo la segunda sacarosa NPI a un nivel por debajo de 10^5 nanopartículas por gramo de sacarosa; y
- 10 (c) preparar la composición farmacéutica o de diagnóstico que incorpora la sacarosa.
11. El método según la reivindicación 10, donde se preparan una pluralidad de lotes consecutivos de dicha composición farmacéutica o de diagnóstico, y donde cada uno de estos lotes se prepara de la manera según la reivindicación 10, utilizando opcionalmente diferentes lotes de sacarosa.
12. El método según las reivindicaciones 10 a 11, donde la composición farmacéutica o de diagnóstico está en forma de
- 15 (a) un polvo o una espuma sólida liofilizada para reconstituir, o
- (b) un líquido acuoso.
13. Una composición farmacéutica o de diagnóstico obtenida por el método según las reivindicaciones 10 a 12, para uso en el diagnóstico o la terapia de un ser humano o un animal no humano.
14. La composición farmacéutica o de diagnóstico para uso según la reivindicación 13, donde el principio activo es
- 20 (a) un péptido, una proteína, un conjugado que comprende un péptido o proteína, un lipopéptido o una lipoproteína;
- (b) propenso a la agregación y/o degradación; y/o
- (c) sensible al calor, estrés mecánico, oxígeno, condiciones ácidas y/o básicas.
15. La composición farmacéutica o de diagnóstico para uso según la reivindicación 14, donde el principio activo es un anticuerpo monoclonal, y/o
- 25 donde la sacarosa está sustancialmente exenta de NPI según lo determinado por el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).