

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 790**

51 Int. Cl.:

C12N 9/96

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009** **E 09738244 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2281038**

54 Título: **Formulación de proteínas**

30 Prioridad:

01.05.2008 EP 08155538

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**ARECOR LIMITED (100.0%)
2 Cambridge Science Park
Cambridge CB4 0FE, GB**

72 Inventor/es:

JEZEK, JAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 476 790 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

Formulación de proteínas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a la estabilidad de las proteínas, en particular a la estabilidad de las metaloproteínas que pueden unir iones de calcio en su estructura tridimensional, en particular a la estabilidad de tales proteínas en sistemas acuosos, por ejemplo en disolución acuosa, en forma de gel acuoso o en un estado que no es líquido, tal como en estado sólido en el que hay presente agua libre o retenida, p.ej. en estado congelado o tras la eliminación parcial de agua, tal como mediante secado o liofilización.

Antecedentes de la invención

Muchas moléculas biológicas y sistemas supramoleculares, por ejemplo las proteínas, las partículas similares a virus o los virus atenuados, son inestables y son susceptibles a la degradación estructural y la pérdida consiguiente de actividad mientras están almacenados, en particular en disoluciones acuosas. Los procesos implicados en la degradación de proteínas se pueden dividir en físicos (es decir, procesos que afectan a las interacciones no covalentes, tales como la pérdida de estructura cuaternaria, terciaria o secundaria, la agregación, adsorción superficial) y químicos (es decir, procesos que implican un cambio covalente, tales como la desamidación, oxidación, alteración de puentes disulfuro, etc.). Las velocidades de los procesos de degradación en general son proporcionales a la temperatura. Las moléculas biológicas y los sistemas supramoleculares, por lo tanto, en general son más estables a temperaturas inferiores.

Las metaloproteínas son una clase de proteínas que contienen uno o más iones metálicos en su estructura. El ión metálico puede ser parte de un componente químico más complejo (p.ej. grupo hemo) que está unido en la estructura de la proteína. De manera alternativa, el ión metálico puede estar unido directamente a una o más cadenas laterales de los aminoácidos en la estructura de la proteína por medio de diversas interacciones no covalentes (interacciones de coordinación, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc.). Aunque en ciertos casos el metal puede ser esencial para la actividad biológica de la proteína, en otros casos desempeña solamente un papel estructural. Aunque en ciertos casos, por ejemplo en la molécula de Factor VIII, el metal forma un puente entre dos subunidades de la proteína, en otros casos, por ejemplo en el antígeno protector recombinante del carbunco, el metal se halla encerrado en una subunidad. Es probable que la pérdida del metal de la estructura de la proteína afecte a la función y/o la estructura de la proteína. Dependiendo de la posición del metal en la molécula de proteína, la pérdida del metal puede conducir a la separación física de dominios clave o a cambios conformacionales en un dominio. Por lo tanto, para mantener la estructura nativa de la proteína, es muy importante mantener la proteína en una formulación en la que se mantengan óptimamente las interacciones de unión entre el metal y la estructura de aminoácidos de la proteína.

El documento WO2007/109221 describe un método para reducir la agregación de una proteína en una formulación de proteínas que comprende añadir metionina a la formulación a una concentración de alrededor de 0,5 mM a alrededor de 145 mM.

Smith et al (1990) J Biol Chem 265(22) 13335-13343 describe una disolución que contiene peroxidasa de rábano recombinante que incluye TRIS-HCl, EDTA y CaCl_2 (véase la Tabla 1).

Josic et al (1994) J Chromatograph B 662, 181-190 describe una disolución de purificación de Factor VIII que comprende TRIS-HCl, CaCl_2 , lisina y NaCl (véase la pág. 184, columna de la izquierda).

Gwinn et al (2006) Protein Expression and Purification 45, 30-36 describe la purificación del antígeno protector de *Bacillus anthracis*.

Shi et al (2008) Biotechnol. Lett. 30, 181-186 describe la purificación de catalasa secretora recombinante de *Bacillus subtilis*.

Sekiya et al (1995) J Biol Chem 270(24) 14325-14331 describe una disolución acuosa de Factor IX humano que comprende TRIS-HCl, NaCl, BSA y diversas concentraciones de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} .

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de varios aspectos deseables de las formulaciones de proteínas, en particular la estabilidad de las metaloproteínas que pueden unir iones de calcio en su estructura tridimensional. La puesta en práctica de algunos o todos estos aspectos da como resultado una estabilización considerable de esas moléculas durante el almacenamiento.

Descripción de la invención

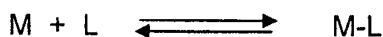
Existen varias subclases de metaloproteínas. Una subclase importante son las proteínas que contienen el ión de calcio (Ca^{2+}) en su estructura terciaria. Estas proteínas a menudo tienen funciones biológicas importantes. Los ejemplos de proteínas que contienen calcio comercialmente importantes incluyen algunos de los factores sanguíneos implicados en la cascada de la coagulación sanguínea (p.ej., Factor VIII, Factor VIIa), diversas glucosidasas, antígeno protector recombinante del carbunco (rPA), ciertas peroxidasas, etc. Otra subclase de metaloproteínas son las proteínas que contienen grupo hemo, tales como catalasa o peroxidasa. En estos casos el metal (hierro) está unido en una estructura más compleja (grupo hemo), que a su vez está unido en la estructura terciaria de la proteína. Otros diversos metales pueden ser una parte esencial de la estructura de la proteína, tales como zinc, cobre o magnesio.

Los detalles exactos de las interacciones entre los iones metálicos y los residuos de aminoácidos en la estructura terciaria de una proteína se pueden obtener muy fácilmente de diversos recursos disponibles de dominio público, tales como el Banco de Datos de Proteínas (<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Así, por ejemplo, la siguiente información se puede obtener de la página de Internet del banco de datos de proteínas con respecto al antígeno protector recombinante del carbunco (Petosa et al.: Anthrax protective antigen; código 1ACC). Cada molécula de rPA contiene dos iones de calcio. Los iones de calcio se unen a varias cadenas laterales de aminoácidos en uno de los cuatro dominios de la molécula rPA. Las interacciones de unión son de naturaleza no covalente, e incluyen puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones de coordinación. Se han identificado interacciones de iones de calcio con las cadenas laterales de los aminoácidos siguientes en el dominio de rPA: Asp177, Asp179, Asn180, Asp181, Asp185, Glu188, Ser222, Glu224, Lys225 y Asp235. Los aminoácidos con grupos carboxílicos en sus cadenas laterales, es decir, Aspartato (Asp) o Glutamato (Glu), parecen ser especialmente eficaces formando interacciones de unión con el ión de calcio en las estructuras de la proteína debido a su carga y a varios pares de electrones libres disponibles.

Una formulación típica de una molécula biológica o sistema supramolecular (p.ej. una proteína terapéutica o una vacuna) contiene un tampón (por ejemplo fosfato o citrato) y en general uno o más de los componentes siguientes: modificadores de la tonicidad (en general, sales inorgánicas o aminoácidos), tensioactivos (por ejemplo, Polisorbato 80) y carbohidratos o polialcoholes (por ejemplo, sacarosa). Ciertas formulaciones comerciales de proteínas que contienen calcio comprenden el catión de calcio, en general en forma de cloruro cálcico. Así, por ejemplo, Kongenat, uno de los productos de factor VIII recombinante disponible comercialmente, contiene cloruro cálcico 2 - 3 mM, junto con histidina (18 - 23 mM), glicilglicina (21 - 25 g/L), sacarosa (0,9 - 1,3%) y polisorbato 80 (35 µg/mL). Este ejemplo demuestra que en general se aprecia la importancia de la presencia del catión metálico en la formulación de una proteína que contiene el mismo catión en su estructura.

Casi todos los compuestos que se pueden considerar excipientes en una formulación de proteínas tienen hasta cierto punto la capacidad de unirse a metales, lo que da como resultado la formación de iones complejos. Tales iones complejos consisten en un ión metálico en el centro y una o más moléculas rodeándolo. Las moléculas que rodean al ión metálico central se denominan ligandos. La formación del ión complejo entre el ión metálico y los ligandos se puede explicar mejor mediante la teoría de Lewis de ácidos y bases. Todos los ligandos contienen al menos un par de electrones solitarios, y por lo tanto son bases de Lewis. Todos los cationes metálicos contienen orbitales electrónicos vacíos en sus capas electrónicas externas, y por lo tanto son ácidos de Lewis. La energía de estos orbitales se puede reducir aceptando uno o más pares de electrones solitarios de otras moléculas (ligandos), lo que conduce a sistemas más estables energéticamente. El sistema tiene la energía más baja (y por lo tanto es más estable) si todos los orbitales vacíos disponibles del catión metálico se rellenan con electrones de los pares de electrones solitarios de el/los ligando(s). El enlace entre un ión metálico y un ligando se denomina enlace de coordinación. Ciertos ligandos tienen solamente un par de electrones solitarios capaz de formar un enlace con el ión metálico central. Se dice que tales ligandos son monodentados. En muchos casos, el ión metálico central está rodeado por varios ligandos monodentados. Sin embargo, ciertos ligandos tienen tal distribución de pares de electrones solitarios en sus moléculas, que pueden formar dos o más enlaces de coordinación con el ión metálico central y se denominan polidentados (bidentado, tridentado, etc.). Así, 1,2-diaminoetano es un ejemplo de un ligando bidentado, el grupo hemo es un ejemplo de un ligando tetradentado y EDTA de un ligando hexadentado. Los iones complejos que implican ligandos polidentados se denominan quelatos. Los quelatos son más estables que los complejos que implican ligandos monodentados, y la estabilidad (es decir, la fuerza de unión al metal total del ligando) se incrementa con el número de pares de electrones solitarios que una molécula de ligando puede utilizar en la formación del quelato. Por esta razón, un metal rodeado por seis ligandos monodentados está unido de manera significativamente menos fuerte que al estar quelado por un ligando hexadentado.

El enlace entre un metal y un ligando cumple los principios de un equilibrio químico dinámico, y se puede describir, por lo tanto, mediante constantes de equilibrio, a veces denominadas "constantes de estabilidad" como sigue (M = metal, L = ligando):



$$K = \frac{[M-L]}{[M][L]}$$

En los casos en los que se puede unir más una molécula de ligando al ión metálico central, el equilibrio se describe mediante una serie de constantes de equilibrio:

$$K_1 = \frac{[M-L]}{[M][L]}$$

$$K_2 = \frac{[M-L_2]}{[M-L][L]}$$

$$K_3 = \frac{[M-L_3]}{[M-L_2][L]}$$

Etc.

De manera alternativa, se puede usar una constante de estabilidad global para cuantificar la capacidad de unión de los ligandos polidentados como sigue:

$$K = \frac{[M-L_x]}{[M][L]}$$

en la que $[M-L_x]$ es la concentración total de las diversas formas del complejo metal-ligando, $[M]$ es la concentración de metal libre y $[L]$ es la concentración de ligando libre. Como los valores de las constantes de estabilidad a menudo son muy elevados, se expresan en general como un logaritmo decimal ($\log K$).

Las constantes de estabilidad global de los complejos metal-ligando se pueden obtener de una base de datos completa publicada por el US National Institute of Standards and Technology (NIST Standard Reference Database 46, R. M. Smith y A. E. Martell: Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database). Esta base de datos enumera más de 49.000 constantes de estabilidad que implican 6.173 ligandos y 216 iones metálicos en diversos estados de oxidación. Un experto en la técnica podrá calcular la concentración de metal libre y la concentración de metal unido en el complejo a partir de las constantes de estabilidad, con tal de que se conozca la concentración total (es decir, unido + sin unir) del metal en el sistema y la concentración total (es decir, unido + sin unir) de los ligandos en el sistema.

Los valores de $\log K$ oscilan de alrededor de 0 a > 15 . Para un metal particular, los valores de $\log K$ serán menores para los ligandos monodentados y se incrementarán con el número de pares de electrones solitarios que un ligando puede utilizar en el enlace de coordinación (bidentado, tridentado, etc.). No obstante, los valores de $\log K$ también dependen en gran medida del metal y del número de orbitales electrónicos vacantes en las capas electrónicas externas. Así, por ejemplo, el $\log K$ del complejo entre cobre e histidina es 10,16, mientras el complejo entre calcio e histidina tiene un valor de $\log K$ de solamente 1,21. De forma similar, el $\log K$ del complejo entre cobre y EDTA es 18,78, mientras el $\log K$ del complejo entre calcio y EDTA es 10,81.

Los ligandos con $\log K$ elevado unirán la mayoría de iones metálicos del sistema, con tal de que su concentración sea igual o mayor que la del metal. Si la concentración de los ligandos con $\log K$ elevado es menor que la del metal, existirán de manera predominante en forma del complejo metal-ligando, y la concentración del ligando libre será mínima. De manera importante, sin embargo, incluso los ligandos con $\log K$ relativamente bajo, tales como entre 1 y 2, todavía son muy eficaces en la unión al ión metálico. Así, por ejemplo, un ligando con $\log K = 2$ a una concentración dos veces mayor que la concentración de un ión metálico unirá $> 99\%$ del metal.

En la mayoría de sistemas acuosos, habrá varios ligandos compitiendo por la unión a un metal. En el equilibrio, algunos de los iones metálicos estarán libres (es decir, sin unir), mientras algunos estarán unidos a varios ligandos. La concentración en equilibrio de todas las especies se puede determinar si se conoce la concentración total del metal, la concentración total de cada ligando y las constantes de estabilidad de todos los complejos implicados. Un experto en la técnica podrá calcular las concentraciones del metal libre y la concentración de todos los complejos metálicos en el sistema a partir de las constantes de estabilidad y la concentración total del metal en el sistema y la concentración total de todos los ligandos en el sistema. Como regla general, si la diferencia entre el $\log K$ de dos ligandos es > 1 , los iones metálicos se complejarán de manera predominante por el ligando con un $\log K$ superior, y la unión al ligando con $\log K$ inferior solamente será significativa si la concentración de metal supera la del ligando más fuerte.

El equilibrio entre los complejos metal-ligando, los iones metálicos libres y los ligandos libres es un proceso dinámico. Así, aunque las concentraciones de todas las especies en el sistema se mantengan constantes en el equilibrio, los iones metálicos se intercambiarán continuamente entre los ligandos. De forma similar, habrá un intercambio continuo entre los iones metálicos libres y los unidos con los ligandos. El intercambio de iones metálicos entre ligandos con constantes de estabilidad similares se dará más fácilmente que entre ligandos con constantes de estabilidad muy diferentes. De forma similar, el intercambio de metal se dará más fácilmente entre el metal libre y uno unido con un ligando con una constante de estabilidad baja en comparación con el de un ligando con una constante de estabilidad elevada.

Hay muchos sitios en la estructura de cualquier molécula biológica, tal como una proteína o un virus, que pueden formar un enlace de coordinación con un ión metálico. Así, la molécula biológica formará diversos complejos con los iones metálicos presentes en la formulación. Tales complejos pueden ser perjudiciales, ya que pueden facilitar la agregación de las moléculas biológicas formando un puente entre dos moléculas. Los iones metálicos capaces de formar enlaces de coordinación muy fuertes con las cadenas laterales de los aminoácidos u otros componentes superficiales de las moléculas biológicas, tales como cobre o zinc, son especialmente eficaces favoreciendo la agregación, mientras los metales que forman complejos más débiles con las cadenas laterales de los aminoácidos, tales como los iones de calcio, es menos probable que contribuyan a la agregación de las proteínas. Así, por ejemplo, se descubrió que la presencia de Cu^{2+} o Zn^{2+} 0,2 mM da como resultado una agregación rápida de la hormona del crecimiento humana a temperatura ambiente, mientras la presencia de Ca^{2+} tuvo un efecto insignificante incluso a una concentración de 2 mM.

Además, ciertos metales, tales como cobre o hierro, pueden catalizar procesos oxidativos en las formulaciones acuosas, especialmente en presencia de luz UV, por lo que contribuyen adicionalmente a la degradación de las moléculas biológicas. Por lo tanto, a menudo es deseable eliminar los metales de la formulación de moléculas biológicas.

Sin embargo, diversas moléculas biológicas, especialmente aquellas cuya función y/o estructura depende de un ión metálico particular, se pueden beneficiar de la presencia de tal ión metálico en la formulación. En tales casos, es importante crear un equilibrio óptimo de iones metálicos en la formulación, de forma que el ión metálico esencial esté presente mientras se reduce al mínimo la agregación facilitada por el metal. La presente invención aborda tales formulaciones.

Prácticamente todos los compuestos usados en las formulaciones convencionales de moléculas biológicas, especialmente las moléculas biológicas usadas en las aplicaciones terapéuticas, tienen cierto grado de capacidad de unirse a metales, lo que da como resultado la formación de iones complejos. Es muy probable que tales procesos comprometan la estabilidad de esas moléculas biológicas cuya estructura depende hasta cierto punto de la unión adecuada de un ión metálico, interfiriendo con los enlaces de coordinación entre la molécula biológica y el metal.

Los principios dinámicos de los enlaces metal-ligando, como se explicaron anteriormente, también son aplicables a los metales unidos en la estructura de una proteína u otra molécula biológica. El equilibrio dinámico que rige las interacciones entre las moléculas biológicas, los iones metálicos y los excipientes presentes en la formulación se explica más adelante mediante el uso de las proteínas como ejemplo típico de moléculas biológicas. No obstante, los mismos principios son aplicables a cualquier otra molécula biológica o sistema supramolecular, tal como ácidos nucleicos, partículas similares a virus o virus completos.

Existe una competición continua por el metal entre el sitio de unión de la proteína y otros ligandos presentes en la formulación, con tal de que los ligandos puedan acceder al sitio de unión del metal en la estructura de la proteína. La accesibilidad del ión metálico en la estructura de la proteína puede estar limitada para ciertos ligandos debido a su carga y/o tamaño, especialmente si el metal está localizado profundamente en la estructura de la proteína.

Si la unión de un metal en la estructura de la proteína es beneficiosa para su función y/o estructura, es importante minimizar la competición por la unión al metal de los ligandos presentes en la formulación para reducir la velocidad de pérdida del ión metálico de la estructura de la proteína y la desnaturalización consiguiente. Hasta cierto punto, esto se puede conseguir añadiendo una fuente del ión metálico a la formulación de proteínas. Los iones metálicos añadidos ocupan los ligandos que, a su vez, es menos probable que interfieran con el metal unido en la proteína. Sin embargo, es igualmente importante reducir la fuerza de los ligandos que rodean la proteína al unirse al ión metálico clave. Esto se puede conseguir (a) seleccionando los compuestos de la formulación de proteínas (p.ej. tampones o modificadores de la tonicidad) con constantes de estabilidad muy bajas (es decir, $\log K$) y (b) manteniendo su concentración al mínimo. Aunque en las formulaciones de tales proteínas se puede apreciar en general la necesidad de evitar los agentes de complejación muy fuertes, es decir, los compuestos con constantes de estabilidad extremadamente elevadas (tales como EDTA), se puede subestimar el efecto de los ligandos con una constante de estabilidad considerablemente inferior. No obstante, debido a los principios dinámicos de la unión a metales, existe cierta probabilidad de que incluso un compuesto con una constante de estabilidad relativamente baja compita por la unión al metal. Aunque los compuestos con una constante de estabilidad inferior no serán tan eficaces como los agentes de complejación fuertes compitiendo por la unión al metal, todavía contribuirán a la competición durante un periodo largo de tiempo (p.ej. durante el almacenamiento de la proteína).

La importancia del aspecto dinámico del equilibrio metal-ligando en la formulación de proteínas y la contribución consiguiente de los excipientes con constantes de estabilidad relativamente bajas a la competición por la unión al metal se puede haber subestimado hasta ahora, y se aborda en esta invención.

De manera importante, solamente la forma libre del ligando, es decir, una molécula de ligando que no está unida a un ión metálico en un momento particular, es la que puede participar en la competición por la unión al ión metálico. La concentración de la forma libre del ligando depende de la concentración total del ligando y de la concentración total de los iones metálicos en el sistema. Así, si no hay iones metálicos en el sistema, la concentración de la forma libre de un ligando es igual a la concentración total del ligando. En presencia de iones metálicos en el sistema, la concentración de la forma libre de un ligando será siempre menor que la concentración total del ligando, porque una porción del ligando estará unida al metal.

En el contexto de la presente invención, es importante darse cuenta de que, si la concentración de ión(es) metálico(s) en el sistema es mayor que la concentración de un agente de complejación muy fuerte (es decir, un ligando con una constante de estabilidad muy elevada), la concentración de la forma libre de este ligando es insignificante. En contraste, si la constante de estabilidad del ligando es relativamente baja, la concentración de la forma libre del ligando será mayor en tal sistema. Esto se puede demostrar en el ejemplo siguiente:

el sistema 1 comprende ión de calcio 5 mM y EDTA 4 mM (un agente de complejación fuerte, $\log K = 10,81$);
el sistema 2 comprende ión de calcio 5 mM e histidina 4 mM (un agente de complejación suave, $\log K = 1,21$);
el sistema 3 comprende ión de calcio 5 mM, EDTA 4 mM e histidina 4 mM.

Las concentraciones en equilibrio de las formas libres de los ligandos son las siguientes:

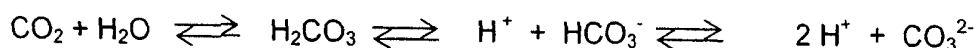
en el sistema 1 la concentración de EDTA libre es $6,2 \times 10^{-11}$ mM;
en el sistema 2 la concentración de histidina libre es 0,197 mM;
en el sistema 3 la concentración de EDTA libre es $6,2 \times 10^{-11}$ mM y la concentración de histidina libre es 3,02 mM.

El ejemplo anterior demuestra que la capacidad de un ligando de competir en la unión a un metal en la estructura de una proteína depende no solamente del valor de $\log K$ de este ligando, sino también de la presencia de otros componentes en el sistema. Así, aunque el EDTA es un agente de complejación muy fuerte, su capacidad de competir por la unión al metal en la estructura de la proteína en el sistema 1 o el sistema 3 es insignificante debido a la concentración muy baja de su forma libre. La capacidad de la histidina de competir por la unión al metal en la estructura de la proteína en el sistema 2 o el sistema 3 puede ser mayor debido a la concentración más significativa de su forma libre. Esto es a pesar del hecho de que la histidina es un agente de complejación considerablemente más débil. Estos principios son importantes en ciertos aspectos de la presente invención.

Algunos compuestos usados en las formulaciones de proteínas convencionales pueden precipitar diversos iones metálicos. Por ejemplo, el ión de calcio, uno de los iones metálicos más comunes unido en la estructura terciaria de muchas proteínas, se puede precipitar mediante el anión fosfato o anión carbonato. Tales procesos son perjudiciales para la proteína, porque (a) privan a la proteína del ión metálico esencial, y (b) dan como resultado la formación de partículas insolubles, cuya presencia es inaceptable en ciertas formulaciones de proteínas, tales como las que tienen propósitos terapéuticos.

Por lo tanto, es esencial evitar cualquier especie en la formulación de una proteína que pueda conducir a la precipitación del metal unido en la estructura de la proteína. Por ejemplo, es esencial evitar el uso de tampón fosfato o tampón carbonato al formular una proteína que une calcio en su estructura terciaria. Aunque la precipitación puede no conducir necesariamente a la pérdida de la función de la proteína, incluso un grado muy pequeño de precipitación es inaceptable en muchas aplicaciones, por ejemplo las aplicaciones farmacéuticas.

Es importante darse cuenta de que las moléculas de gases disueltos pueden contribuir también a la competición por la unión al metal. Aunque la química de coordinación de los complejos gas disuelto-metal no se ha estudiado tan a fondo como la de otros ligandos, hay diversos informes en la bibliografía que caracterizan varios de tales complejos. Los complejos dióxido de carbono-metal (revisados en Gibson D.H.: Coordination Chemistry Reviews 185-186 (1999) 335-355) son probablemente los complejos mejor estudiados, que implican un ligando gaseoso disuelto. Aparte de la unión directa a un metal, el dióxido de carbono puede contribuir también a la unión al metal de manera indirecta dando lugar a diversas especies de carbonato que son capaces de unirse al metal. Esto es debido al hecho de que, en las disoluciones acuosas, el dióxido de carbono existe en equilibrio con ácido carbónico y diversos aniones de carbonato:



Los aniones de carbonato no solamente son capaces de formar complejos con metales, sino que en ciertos casos también pueden provocar su precipitación.

El oxígeno es otro ejemplo de un gas disuelto que actúa como un ligando para formar complejos gas disuelto-metal. Por ejemplo, el transporte de oxígeno por la hemoglobina se facilita por la unión coordinada del oxígeno al hierro del grupo hemo. La molécula de oxígeno tiene cuatro pares de electrones solitarios disponibles, algunos de los cuales pueden participar en la unión al metal. Otros gases también son bases de Lewis, y así pueden participar en la formación de enlaces de coordinación con los iones metálicos.

La contribución de los gases disueltos a la competición por el metal se puede subestimar en general por varias razones. En primer lugar, en vez de añadirlos de manera deliberada a la formulación, la presencia de estos excipientes se debe de manera natural al equilibrio con el espacio de cabeza gaseoso. Los gases disueltos, por lo tanto, en general no se enumeran como excipientes en las formulaciones acuosas de proteínas terapéuticas. En segundo lugar, la concentración de gases disueltos en las disoluciones acuosas es muy baja debido a su naturaleza hidrófoba apolar. En tercer lugar, con la excepción del oxígeno, los gases disueltos son químicamente muy inertes, y por lo tanto no se asocian a los cambios químicos que se dan en una formulación acuosa. El oxígeno se puede asociar a los procesos oxidativos, pero hasta ahora no se ha apreciado su contribución a los equilibrios metal-ligando en el sistema.

La solubilidad de los gases varía considerablemente, y también depende de otros parámetros de la disolución, tales como la fuerza iónica, la temperatura, etc. A una temperatura constante, la concentración de un gas determinado disuelto en un tipo determinado de líquido es directamente proporcional a la presión parcial del gas que está en equilibrio con el líquido. La concentración del gas disuelto en un líquido a una temperatura determinada se puede calcular a partir de su presión parcial en equilibrio con el líquido y la constante de Henry para ese líquido y temperatura:

$$[G] = \frac{p}{k}$$

en la que [G] es la concentración de gas disuelto en el líquido, p es la presión parcial y k es la constante de Henry. Los ejemplos de constantes de Henry para la solubilidad de gases en agua a 25 °C son:

oxígeno:	769,2 (L atm)/mol
dióxido de carbono:	29,4 (L atm)/mol
hidrógeno:	1282,1 (L atm)/mol
nitrógeno:	1800 (L atm)/mol

Así, el dióxido de carbono es con mucho el más soluble de los gases anteriores, mientras el nitrógeno es el menos soluble. Por ejemplo, el agua equilibrada con una fase gaseosa que contiene un exceso de nitrógeno de 60 veces (v/v) respecto del dióxido de carbono contendrá aproximadamente una concentración molar igual de nitrógeno disuelto y dióxido de carbono. Así, la concentración total de gases disueltos en el agua será más pequeña si se equilibra con una atmósfera de nitrógeno que si se equilibra con aire, la cual, a su vez, será más pequeña que si se equilibra con una atmósfera rica en dióxido de carbono.

Un experto en la técnica entenderá que para reducir la concentración de un gas particular disuelto en una fase líquida, el líquido se debe envasar bajo un espacio de cabeza en el que la presión parcial del gas particular está sustancialmente reducida. La manera más eficaz de reducir la concentración total de los gases disueltos es equilibrando el líquido con una fase gaseosa cercana al vacío.

La naturaleza hidrófoba de las moléculas de gas disuelto, tal como oxígeno, da como resultado una concentración en equilibrio relativamente baja. Sin embargo, la hidrofobicidad, junto con la ausencia de carga y un tamaño muy pequeño, hace que estos excipientes sean muy móviles en el núcleo hidrófobo de las moléculas de proteínas. Por lo tanto, para este tipo de moléculas es considerablemente más fácil alcanzar los iones metálicos en una estructura de una proteína comparado con los excipientes mayores y cargados. Debido a su naturaleza hidrófoba, se ha demostrado que las moléculas de los gases disueltos se concentran en el núcleo hidrófobo de las proteínas. Así, aunque las constantes de estabilidad de los complejos de metales con los gases disueltos pueden ser relativamente bajas, su contribución a competir y alterar los enlaces de coordinación en las moléculas de proteínas se incrementa considerablemente debido a su capacidad de difundirse fácilmente hacia el núcleo hidrófobo de las proteínas. Por lo tanto, es importante minimizar la concentración de ciertos gases disueltos en las formulaciones de metaloproteínas acuosas para minimizar la pérdida de la estructura de las proteínas. Esto se aborda en la presente invención.

Además, la difusión y la solubilidad superior de los metales disueltos en el núcleo hidrófobo de las proteínas pueden alterar también diversos enlaces hidrófobos entre las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos que son esenciales para mantener la estructura tridimensional nativa. Por lo tanto, incluso las proteínas que no dependen de la unión adecuada de un ión metálico en su estructura se pueden beneficiar de la eliminación de los gases disueltos de su formulación acuosa.

El término "proteína" se usa en la presente memoria para abarcar las moléculas o complejos moleculares que consisten en un polipéptido simple, moléculas o complejos moleculares que comprenden dos o más polipéptidos y moléculas o complejos moleculares que comprenden uno o más polipéptidos junto con uno o más restos no polipeptídicos tales como grupos prostéticos, cofactores, etc. La invención es aplicable a los polipéptidos de cualquier peso molecular.

El término "polipéptido" pretende abarcar los polipéptidos que comprenden restos que no son aminoácidos unidos de manera covalente, tales como polipéptidos glicosilados, lipoproteínas, etc.

La invención se refiere a metaloproteínas, es decir, moléculas de proteínas que tienen una estructura tridimensional particular y una actividad biológica de interés, cuya actividad y/o estructura dependen de la retención de un ión metálico particular en un sitio de unión en la proteína. El metal puede estar unido directamente a las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína, o puede ser parte de un componente químico más complejo que está unido en la estructura de la proteína.

El término "ligando" se usa en la presente memoria para abarcar cualquier compuesto capaz de unir iones metálicos, lo que da como resultado la formación de iones complejos. Para el propósito de esta invención, los ligandos se dividen en "ligandos débiles", "ligandos de fuerza media" y "ligandos fuertes". Las expresiones "ligando débil", "ligando de fuerza media" y "ligando fuerte" se definen basándose en las constantes de estabilidad de sus complejos con el ión de calcio, uno de los iones metálicos más comunes hallados en la estructura de las metaloproteínas, como sigue: Un ligando débil tiene una constante de estabilidad de un complejo con ión de calcio de $\log K < 0,5$; un ligando de fuerza media tiene una constante de estabilidad de un complejo con ión de calcio de $\log K$ de 0,5 a 2; un ligando fuerte tiene una constante de estabilidad de un complejo con ión de calcio de $\log K > 2$. Todas las constantes de estabilidad indicadas en este documento se miden a 25 °C.

El término "tampón desplazado" se usa en la presente memoria para abarcar cualquier aditivo presente en una composición de pH especificado que es capaz de intercambiar protones y tiene valor(es) de pK_a de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo deseado de temperaturas de almacenamiento de la composición. La técnica de aplicar tampones desplazados a formulaciones de productos biológicos se describe en el documento PCT/GB2007/000082.

Se muestran ejemplos de constantes de estabilidad de una selección de excipientes potenciales en formulaciones de proteínas en la Tabla 1. La tabla enumera solamente un número limitado de excipientes potenciales, y la presente invención no se limita de ninguna manera al uso de estos compuestos. Se pueden obtener las constantes de estabilidad de un amplio intervalo de otros excipientes potenciales de la NIST Standard Reference Database 46.

Tabla 1

Constantes de estabilidad de excipientes seleccionados. Todas las constantes de estabilidad son con respecto al catión de calcio (Ca^{2+}).

Excipiente	Log K
EDTA	10,81
Citrato	3,48
Histidina	1,21
Lisina	1,05
Ornitina	1,68
Metionina	2,04
Cisteína	2,5
Glutamato	1,43
Tirosina	1,48
Aspartato	1,7
Alanina	1,3
Glicina	1,09
Glicilglicina	1,24
Malato	2,06
Ftalato	1,6
Maleato	1,76
Ascorbato	0,2
Benzoato	0,2
Salicilato	-0,87
Lactato	1,48
Glicolato	1,11
TRIS	0,25
Trietanolamina	0,87

Cloruro	0,1
Nitrato	0,5
Carbonato	3,22
Borato	1,76
Sulfito	2,62
Fosfato	1,9 (además, el ión de calcio precipita en presencia de fosfato)

Prácticamente todos los compuestos que se pueden considerar excipientes (p.ej. tampones, modificadores de la tonicidad, etc.) en las formulaciones de proteínas tienen cierto grado de capacidad de unirse a iones metálicos, lo que da como resultado la formación de iones complejos. Por lo tanto, es probable que participen compitiendo por la unión de ión(es) metálico(s) en la formulación de proteínas. Si tal(es) ión(es) está(n) implicado(s) en la actividad funcional y/o en la estructura tridimensional de la proteína, la presencia de tales excipientes contribuirá a la inestabilidad de la proteína debido a que provocan la pérdida temporal o permanente del metal de la estructura de la proteína.

Aunque de manera realista no es posible detener completamente la competición por la unión de ión(es) metálico(s) en una formulación de una proteína, es esencial minimizar tal competición para estabilizar la proteína durante el almacenamiento.

La competición por la unión de ión(es) metálico(s) en una formulación de una metaloproteína se puede reducir añadiendo a la formulación cierta cantidad de el/los ión(es) metálico(s). En general se aprecia la importancia de la presencia del ión metálico en la formulación de ciertas proteínas, y ciertas formulaciones de proteínas comercialmente importantes contienen ión(es) metálico(s), en general un ión de calcio en las proteínas que contienen calcio.

Sin embargo, es igualmente importante reducir la fuerza de los ligandos que rodean la proteína al unirse al ión metálico clave, y que interfieren con la unión adecuada del metal en la estructura de la proteína. Debido a la naturaleza dinámica de los equilibrios metal-ligando, cada compuesto presente en la formulación de una metaloproteína tendrá cierto grado de capacidad de interferir con la unión del ión metálico en la proteína. Esta capacidad dependerá de muchos parámetros, tales como (1) la constante de estabilidad, (2) la concentración del excipiente, (3) la concentración de otras especies en el sistema, (4) la temperatura, etc. Aunque los excipientes con constantes de estabilidad elevadas interferirán con la unión del metal incluso a concentraciones relativamente bajas, la capacidad de los excipientes con constantes de estabilidad inferiores solamente será pronunciada a concentraciones superiores.

La fuerza de unión al metal de los excipientes (p.ej. tampones o modificadores de la tonicidad) que rodean la proteína se puede minimizar (a) seleccionando excipientes con constantes de estabilidad muy bajas ($\log K$) y (b) manteniendo su concentración al mínimo.

Ciertas formulaciones requieren una concentración relativamente elevada de ciertas especies, por ejemplo para el ajuste de la tonicidad. En tales casos, es esencial usar excipientes con constantes de estabilidad tan bajas como sea posible de los complejos con los metales clave.

Aunque en las formulaciones de metaloproteínas se puede apreciar en general la necesidad de evitar los agentes de complejación muy fuertes, es decir, los compuestos con constantes de estabilidad extremadamente elevadas (tales como EDTA), se puede subestimar el efecto de los ligandos con una constante de estabilidad considerablemente inferior. No obstante, debido a los principios dinámicos de la unión a metales, existe cierta probabilidad de que incluso un compuesto con una constante de estabilidad relativamente baja compita por la unión al metal. Aunque los compuestos con una constante de estabilidad inferior no serán tan eficaces como los agentes de complejación fuertes compitiendo por la unión al metal, todavía contribuirán a la competición durante un periodo largo de tiempo (p.ej. durante el almacenamiento de la proteína).

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, una composición acuosa comprende una metaloproteína cuya actividad biológica y/o estructura tridimensional dependen de la retención de un ión de calcio en un sitio de unión en la proteína, y también

- (i) comprende iones de calcio a una concentración de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,05 a 10 mM, lo más preferiblemente de 0,2 mM a 5 mM;
- (ii) comprende ligandos débiles que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K < 0,5$; y
- (iii) está exenta de ligandos de fuerza media que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K$ de entre 0,5 y 2; y
- (iv) está exenta de ligandos fuertes que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K > 2$; o comprende tal ligando fuerte a una concentración no mayor que la concentración

total de los iones de calcio;

cuya composición comprende un sistema tampón basado en TRIS e ión benzoato como ligandos débiles, en el que todas las constantes de estabilidad se miden a 25 °C.

5 En una realización, la composición comprende un ligando fuerte a una concentración no mayor de la concentración total de los iones de calcio, por lo que el ligando fuerte no está disponible en forma libre. La concentración del ligando fuerte es de manera adecuada < 1 mM, p.ej. < 0,5 mM, p.ej. < 0,1 mM.

10 El pH de la composición se puede ajustar a un valor necesario, por ejemplo un valor que asegure la mejor estabilidad térmica de la proteína durante el almacenamiento.

La presencia de iones metálicos, especialmente iones metálicos que pueden formar enlaces de coordinación muy fuertes con las cadenas laterales de los aminoácidos, tales como cobre o zinc, en las formulaciones de proteínas pueden provocar la agregación de las proteínas. Además, ciertos metales, tales como cobre o hierro, pueden catalizar procesos oxidativos en las formulaciones acuosas, especialmente en presencia de luz UV, por lo que contribuyen adicionalmente a la degradación de las proteínas. Es probable que haya cantidades mínimas de tales iones metálicos en las formulaciones acuosas, incluso si se usan componentes de pureza muy elevada. Por lo tanto, puede ser deseable eliminar tales metales de la formulación de proteínas. Esto se puede conseguir añadiendo a la formulación de proteínas agentes de complejación fuertes, tales como EDTA. Sin embargo, diversas proteínas, especialmente aquellas cuya función y/o estructura depende de un ión metálico particular, se pueden beneficiar de la presencia de un ión metálico determinado en la formulación. En tales casos, es importante crear un equilibrio óptimo de iones metálicos en la formulación, de forma que el ión metálico esencial esté presente mientras se reduce al mínimo la agregación facilitada por el metal.

25 Tal equilibrio óptimo se puede conseguir añadiendo a la formulación al mismo tiempo (1) los iones metálicos deseables, es decir, iones de calcio y (2) un agente de complejación fuerte tal como EDTA. Es crítico, sin embargo, que la concentración del agente de complejación fuerte no supere la concentración del ión metálico. Preferiblemente, la concentración del agente de complejación fuerte será menor de la mitad de la concentración del ión metálico. La presencia simultánea del metal clave y del agente de complejación fuerte a una concentración inferior que la concentración del metal clave tendrá los siguientes beneficios:

1. La composición contiene iones libres del metal deseable que pueden contribuir decisivamente al mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína. Esto contribuye a la estabilización de la proteína.
2. La composición está prácticamente exenta de otros iones metálicos que pueden contribuir a la agregación de la proteína.

El calcio es uno de los metales más comunes que es esencial para mantener la estructura tridimensional de las proteínas comercialmente importantes. Los complejos del ión de calcio con las cadenas laterales de los aminoácidos son considerablemente menos fuertes que los complejos de otros metales, tales como cobre o hierro. Así, es menos probable que el ión de calcio provoque la agregación de proteínas que los iones metálicos que forman complejos fuertes. Si se añaden iones de calcio a la formulación junto con un agente de complejación fuerte, las cantidades mínimas de metales tales como cobre o hierro se eliminarán casi completamente, mientras el ión de calcio libre estará disponible para asegurar una unión óptima del metal a la metaloproteína.

Es esencial que el agente de complejación añadido a la formulación sea uno muy fuerte, preferiblemente EDTA. La constante de estabilidad fuerte del agente de complejación asegurará que (1) los metales en cantidades mínimas se eliminan casi completamente de la formulación y (2) no queda libre una concentración significativa del agente de complejación en la formulación, de forma que no puede contribuir a la competición por la unión al metal en la proteína.

El uso simultáneo de un ión metálico y un agente de complejación fuerte, tal como EDTA, en una formulación de proteínas mejora la estabilidad de las proteínas, y es contraintuitivo.

En tales formulaciones, todavía es crítico reducir la fuerza de otros ligandos que rodean la proteína al unirse al ión metálico clave y que interfieren con la unión adecuada del metal en la estructura de la proteína, tal como se detalla en el primer aspecto de la presente invención.

60 El pH de la composición se puede ajustar a un valor necesario, por ejemplo un valor que asegure la mejor estabilidad térmica de la proteína durante el almacenamiento.

El primer aspecto de la invención se basa en la adición de un ión metálico a la formulación de proteínas como una de varias medidas aplicadas de manera simultánea para asegurar la unión óptima de un metal en una estructura de una proteína.

Las moléculas de gases disueltos también pueden contribuir a la competición por la unión al metal, dada su capacidad de formar complejos con los iones metálicos y su capacidad de difundirse fácilmente en la estructura de las proteínas debido a su tamaño pequeño y su naturaleza hidrófoba. Por lo tanto, es deseable reducir la concentración de los gases disueltos en una formulación acuosa de una proteína para mejorar la estabilidad del almacenamiento. Es especialmente importante reducir la concentración de dióxido de carbono, ya que es muy probable que su presencia contribuya a la competición por la unión al metal en la proteína. Sin embargo, también es probable que otros gases disueltos tengan cierto grado de capacidad de unirse a los iones metálicos, y por lo tanto la eliminación completa de todos los gases disueltos es la mejor manera de eliminar la competición por la unión al metal en una estructura de proteína.

El nitrógeno y oxígeno son los componentes principales del aire, el nitrógeno representa alrededor del 79% y el oxígeno alrededor del 21%. El dióxido de carbono está presente en el aire a una concentración considerablemente inferior, alrededor del 0,4% (v/v). Sin embargo, dadas las diferentes solubilidades de los tres gases, sus concentraciones en forma disuelta en las formulaciones acuosas de proteínas equilibradas con aire serán bastante similares.

El equilibrio de la composición acuosa de proteínas con un espacio de cabeza de nitrógeno conducirá a una reducción considerable de los gases disueltos totales. Además, esto conducirá a una eliminación eficaz del dióxido de carbono y oxígeno, los gases que más probablemente compiten por la unión a metales en la estructura de las metaloproteínas. El almacenamiento bajo un espacio de cabeza de un gas noble inerte, tal como argón, dará como resultado una reducción adicional de los gases disueltos totales y la eliminación del nitrógeno. Sin embargo, para llevar a cabo una eliminación casi completa de todos los gases disueltos, la formulación acuosa se debe almacenar bajo un espacio de cabeza cercano al vacío.

La eliminación parcial o completa de los gases disueltos de las composiciones acuosas de proteínas es una parte importante de la presente invención. Sin embargo, es muy importante combinar este principio con los principios descritos en los primeros tres aspectos de la presente invención para conseguir una estabilidad óptima de una proteína. Por lo tanto, en un segundo aspecto de la presente invención, una composición acuosa como se describe en la presente memoria comprende una metaloproteína, caracterizada además porque

- (i) la composición comprende uno o más iones de calcio a una concentración de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,05 a 10 mM, lo más preferiblemente de 0,2 mM a 5 mM;
- (ii) la composición comprende otros excipientes, tales como tampones y modificadores de la tonicidad, cuyos excipientes son ligandos débiles;
- (iii) la composición está sustancialmente exenta de excipientes que son ligandos de fuerza media o ligandos fuertes;
- (iv) la composición se almacena en un recipiente sellado con un espacio de cabeza que asegura la eliminación parcial o sustancial de los gases disueltos, en particular la eliminación de dióxido de carbono, por ejemplo con un espacio de cabeza de nitrógeno o con un espacio de cabeza de un gas noble, tal como argón o con un espacio de cabeza al vacío o cercano al vacío.

En un tercer aspecto de la presente invención, una composición acuosa como se describe en la presente memoria comprende una metaloproteína, caracterizada además porque

- (i) la composición comprende uno o más iones de calcio a una concentración de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,05 a 10 mM, lo más preferiblemente de 0,2 mM a 5 mM;
- (ii) la composición comprende otros excipientes, tales como tampones y modificadores de la tonicidad, cuyos excipientes son ligandos débiles;
- (iii) el sistema comprende además un agente de complejación fuerte a una concentración no mayor que la concentración total de los iones metálicos añadidos, que asegura que el agente de complejación fuerte no está disponible sustancialmente en forma libre;
- (iv) la composición se almacena en un recipiente sellado con un espacio de cabeza que asegura la eliminación parcial o sustancial de los gases disueltos, en particular la eliminación de dióxido de carbono, por ejemplo con un espacio de cabeza de nitrógeno o con un espacio de cabeza de un gas noble, tal como argón o con un espacio de cabeza al vacío o cercano al vacío.

Las composiciones según la presente invención comprenden una metaloproteína y un sistema tampón basado en una combinación de ión benzoato y TRIS. La composición comprende una fuente de iones de calcio. La composición puede comprender opcionalmente cualquiera de lo siguiente: (1) un agente de complejación fuerte, tal como EDTA, a una concentración no mayor de la concentración total de los iones de calcio añadidos, (2) una fuente de cloruro, por ejemplo en forma de cloruro sódico, para ajustar la fuerza iónica, (3) un carbohidrato, tal como sacarosa o manosa, o un polialcohol, tal como propilenglicol o manitol, (4) un tensioactivo, tal como Polisorbato 80 o Poloxámero 188.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: Antígeno protector recombinante del carbunco (rPA)

El antígeno protector recombinante del carbunco se obtuvo de la Agencia de Protección de la Salud (Porton Down, R.U.). La estabilidad de la proteína se ensayó mediante el uso del siguiente procedimiento cromatográfico de fase inversa: La fase móvil consistió en (A) 0,1% de TFA en agua y (B) 0,1% de TFA en 95% de Propan-2-ol + 5% de agua. Se empleó una elución en gradiente del 30% de B al 55% de B a lo largo de 25 mins. El cromatógrafo líquido (serie Agilent 1100) se equipó con un detector de 214 nm, columna de protección (Phenomenex KJO-4282) y una columna de 4,6 × 250 mm (columna Phenomenex Jupiter C4 300A, 250 × 4,6 mm) mantenida a 45 °C. El caudal se mantuvo a 0,5 mL min⁻¹. La carga de muestra típica fue 15 µL de muestra acuosa que contenía 0,5 mg mL⁻¹ de rPA. La recuperación se expresó como el porcentaje del área del pico que correspondió al rPA intacto medido tras una incubación a 25 °C durante un periodo determinado de tiempo con respecto al medido antes del ensayo de almacenamiento. La recuperación de la integridad estructural de rPA se midió tras la incubación a 37 °C y a 25 °C a pH 8,5. En experimentos preliminares se demostró que este pH es óptimo para el almacenamiento de rPA acuoso a temperaturas entre 25 - 37 °C.

Se sabe que rPA del carbunco contiene cationes de calcio unidos en su estructura terciaria. Se estudió el efecto de los excipientes/tampones con diversas constantes de estabilidad (log K) de los complejos con iones metálicos sobre la estabilidad de rPA acuoso. Los excipientes y sus constantes de estabilidad (log K) con los iones de calcio fueron los siguientes: TRIS (log K = 0,25), lisina (log K = 1,4), citrato (log K = 3,5), borato (log K = 1,76), fosfato (log K = 1,9 además de precipitación lenta del ión de calcio). Todas las muestras de rPA se estudiaron a un pH de alrededor de 8,5. En los experimentos preliminares se demostró que este pH era óptimo para el almacenamiento de rPA acuoso.

Se descubrió que la presencia de iones de calcio era esencial para asegurar la estabilidad estructural de rPA. Sin embargo, la estabilidad estructural también dependió de las constantes de estabilidad (con respecto a la unión de calcio) de otros excipientes/tampones presentes en la composición. Así, la mejor estabilidad se observó en ausencia de otros excipientes (es decir, en una formulación que comprendía solamente cloruro cálcico mientras se ajustaba el pH a alrededor de 8,5 mediante hidróxido sódico) o en presencia de un excipiente con una constante de estabilidad muy baja (TRIS). La formulación en presencia de TRIS pareció ser más estable, probablemente debido a una mejor estabilidad del pH comparado con la formulación solamente con calcio. El efecto beneficioso de la combinación TRIS/calcio se eliminó completamente en presencia de citrato, es decir, un excipiente con una constante de estabilidad elevada. TRIS fue también el único excipiente/tampón que aseguró una estabilidad mejorada en ausencia de calcio. Esto se podría deber a una interferencia mínima con los enlaces de calcio en la molécula de rPA. La presencia de lisina, es decir, un compuesto con una constante de estabilidad mayor que TRIS, también dio como resultado una estabilidad mejorada de rPA, aunque no tan buena como en presencia de TRIS o en ausencia de excipientes. La presencia de otros excipientes/tampones con constantes de estabilidad elevadas (citrato, borato) fue perjudicial para la estabilidad de rPA.

Tabla 2

Recuperación (%) de la integridad estructural de rPA medida mediante RP-HPLC en disoluciones acuosas tras incubación a 25 °C o 37 °C durante 12 semanas. Todas las muestras se ajustaron a pH 8,5.

Composición	25 °C (12 semanas)	37 °C (12 semanas)
fosfato sódico (5 mM)	<5	<5
fosfato sódico (5 mM) + cloruro cálcico (4 mM)	<5	<5
fosfato sódico (25 mM)	<5	<5
fosfato sódico (25 mM) + cloruro cálcico (4 mM)	<5	<5
TRIS (5 mM)	36,1	30,7
TRIS (25 mM)	<5	<5
TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (4 mM)	89,9	58,2
TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (4 mM) + citrato (20 mM)	<5	<5
citrato (20 mM)	<5	<5
lisina (5 mM)	<5	<5
lisina (5 mM) + cloruro cálcico (4 mM)	32,2	10,2
borato (5 mM)	<5	<5
borato (5 mM) + cloruro cálcico (4 mM)	<5	<5
cloruro cálcico (10 mM)	69,9	41,6

Ejemplo 2: Catalasa (hígado bovino)

La catalasa se obtuvo de Sigma y se formuló en composiciones acuosas a 100 µg mL⁻¹. Se ensayó la actividad de catalasa en las disoluciones de catalasa, recién preparadas y después de una incubación a la temperatura especificada. Esto se llevó a cabo según el siguiente procedimiento: Se añadieron 2 mL de peróxido de hidrógeno (30 mM en agua) a 18 mL de PBS en un recipiente de polipropileno de 125 mL. Se añadieron 100 µL de la muestra

de catalasa y se mezclaron. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente exactamente durante 30 min. Mientras tanto, se mezclaron los siguientes reactivos en una cubeta de plástico para las medidas espectrofotométricas:

- 5 • 2,73 mL de tampón citrato/fosfato (0,1 M, pH 5,0)
- 100 µL de TMB (3 mg /mL, disuelto en DMSO)
- 100 µL de lactoperoxidasa

10 Tras el periodo de incubación de 30 min, se añadieron 70 µL de la mezcla que contenía catalasa a la cubeta, se mezclaron y se leyó la absorbancia en aproximadamente 30 s. Los resultados se expresaron como la recuperación en porcentaje, tomando como referencia la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a una temperatura incrementada). La recuperación de la actividad de catalasa se midió tras una incubación a 25 °C durante 23 y 51 días a pH 6,8. En los experimentos preliminares se demostró que este pH era óptimo para el almacenamiento de la catalasa acuosa.

15 Se sabe que la catalasa contiene el grupo hemo y cationes de calcio en su estructura terciaria. Se estudió el efecto de los excipientes con diversas constantes de estabilidad (log K) de los complejos con iones metálicos sobre la estabilidad de la catalasa acuosa. Los excipientes y sus constantes de estabilidad (log K) con los iones de calcio fueron los siguientes: TRIS 25 mM (log K = 0,25), purina 25 mM (log K = 1,2), lisina 25 mM (log K = 1,4), citrato 25 mM (log K = 3,5) y fosfato 25 mM (log K = 1,9, además de precipitación lenta del ión de calcio). Todas las muestras de catalasa estudiadas contuvieron TRIS 5 mM y cloruro sódico 200 mM como disolución de fondo. Todas las muestras se mantuvieron en viales de vidrio sellados con un espacio de cabeza de aire o nitrógeno o al vacío.

20 La recuperación de la actividad de catalasa en las muestras que contenían estos ligandos dependió de las constantes de estabilidad de estos ligandos con respecto a la unión a los iones metálicos. Así, la recuperación fue considerablemente mayor en presencia de TRIS (25 mM) que en presencia de lisina (25 mM) o purina (25 mM). La recuperación fue extremadamente baja en presencia de citrato y fosfato, es decir, ligandos con una unión fuerte de iones de calcio; véase la Tabla 3. Por ejemplo, la recuperación de la actividad de catalasa tras la incubación a 25 °C durante 23 días fue < 15% en presencia de citrato o fosfato, pero > 25% en presencia de purina o lisina y >85% en presencia de TRIS solo. Después de 51 días de incubación a 25 °C se observó < 4% de actividad residual en todas las muestras aparte de la muestra que contenía TRIS solo, que conservó más del 50% de la actividad original. De manera importante, la recuperación se incrementó adicionalmente si las muestras se mantuvieron bajo un espacio de cabeza de nitrógeno, y en particular bajo un espacio de cabeza al vacío (Tabla 3). Este efecto fue especialmente notable en el caso de TRIS solo, es decir, un excipiente con una capacidad de complejación mínima de iones metálicos.

Tabla 3

40 Recuperación de la actividad de catalasa (%) tras incubación a 25 °C durante 23 y 51 días en muestras acuosas mantenidas bajo un espacio de cabeza de aire, nitrógeno y al vacío. Todas las muestras se ajustaron a pH 6,8 y contuvieron cloruro sódico 200 mM y tampón TRIS 5 mM.

	Lisina (25 mM)	Purina (25 mM)	TRIS (25 mM)	Citrato (25 mM)	Fosfato (25 mM)
23 Días					
Aire	32,2	29,4	88,0	7,0	11,6
Nitrógeno	40,3	58,0	100,1	No estudiado	No estudiado
Vacío	49,6	74,5	100,9	No estudiado	No estudiado
51 Días					
Aire	1,8	3,6	56,3	<1	<1
Nitrógeno	4,5	4,1	63,9	No estudiado	No estudiado
Vacío	4,0	19,2	99,9	No estudiado	No estudiado

Ejemplo 3: Peroxidasa de rábano

45 La peroxidasa de rábano se obtuvo de Sigma y se formuló en composiciones acuosas a 100 µg mL⁻¹. Se ensayó la actividad de peroxidasa de rábano en las disoluciones de peroxidasa de rábano, recién preparadas y después de una incubación a una temperatura incrementada. Esto se llevó a cabo según el siguiente procedimiento: Se añadieron 10 µL de la muestra de peroxidasa de rábano a una cubeta que contenía la mezcla de los siguientes reactivos:

- 50 • 2,5 mL de tampón citrato/fosfato (0,05 M, pH 5,0)
- 100 µL de peróxido de hidrógeno (2 mM)
- 100 µL de TMB (3 mg /mL, disuelto en DMSO)

55 Estos se mezclaron rápidamente. El tiempo = 0 se contó a partir de la adición de la muestra de peroxidasa de

rábano. Exactamente después de 3 min, se leyó la absorbancia a 630 nm. Los resultados se expresaron como la recuperación en porcentaje, tomando como referencia la absorbancia medida en las muestras antes de su incubación a la temperatura incrementada. La recuperación de la actividad de peroxidasa de rábano se midió tras la incubación a 25 °C y 40 °C durante 6 semanas a pH 7. En experimentos preliminares se demostró que este pH es óptimo para el almacenamiento de peroxidasa de rábano acuosa a 40 °C.

Se sabe que la peroxidasa de rábano contiene el grupo hemo y cationes de calcio unidos en su estructura terciaria. Se estudió el efecto de los excipientes con diversas constantes de estabilidad (log K) de los complejos con iones metálicos sobre la estabilidad de la peroxidasa de rábano acuosa. La estabilidad se estudió en las composiciones siguientes:

- fosfato sódico (5 mM)
- fosfato sódico (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)
- fosfato sódico (25 mM)
- fosfato sódico (25 mM) + cloruro cálcico (3 mM)
- TRIS (50 mM)
- TRIS (50 mM) + cloruro cálcico (3 mM)
- TRIS (5 mM)
- TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)
- malato sódico (5 mM)
- malato sódico (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)
- benzoato potásico (5 mM) + TRIS (5 mM)
- benzoato potásico (5 mM) + TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)

Todas las muestras contuvieron cloruro sódico 100 mM y 0,005% (p/p) de Tween 80 como disolución de fondo. Las constantes de estabilidad (log K) de los complejos con iones de calcio de los excipientes usados son las siguientes: 0,2 (anión benzoato), 0,25 (TRIS), 1,9 (fosfato), 2,06 (malato). Además de formar un complejo con el ión de calcio, el fosfato provoca su precipitación lenta a pH neutro.

La recuperación de la actividad de peroxidasa de rábano en las muestras que contenían estos ligandos dependió de las constantes de estabilidad de estos ligandos con respecto a la unión a los iones metálicos. Así, la recuperación fue considerablemente mayor en presencia de TRIS (5 mM) y mezcla TRIS (5 mM)/benzoato potásico (5 mM) que en presencia de fosfato (5 mM o 25 mM) o malato (5 mM), es decir, ligandos con una unión fuerte de iones de calcio; véase la Tabla 4. La co-presencia de iones de calcio en la formulación no tuvo un efecto significativo en las formulaciones que comprendían solamente los ligandos débiles (TRIS o benzoato potásico), pero condujo a una recuperación ligeramente mejorada en presencia de ligandos más fuertes. Esto se puede explicar por el efecto reducido de los ligandos fuertes al competir por el ión metálico en presencia de una fuente adicional de los iones metálicos.

Tabla 4

Recuperación (%) de la actividad de peroxidasa de rábano en disoluciones acuosas tras la incubación a 40 °C o 25 °C durante 6 semanas. Todas las muestras se ajustaron a pH 7 y contuvieron cloruro sódico 100 mM y 0,005% (p/p) de Tween 80.

Composición	25 °C (6 semanas)	40 °C (6 semanas)
fosfato sódico (5 mM)	54,7	11,3
fosfato sódico (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	75,6	25,0
fosfato sódico (25 mM)	53,6	10,1
fosfato sódico (25 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	55,4	36,3
malato sódico (5 mM)	42,8	21,8
malato sódico (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	58,6	33,9
TRIS (50 mM)	78,4	65,1
TRIS (50 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	84,1	69,7
TRIS (5 mM)	97,3	93,6
TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	98,1	96,0
benzoato potásico (5 mM) + TRIS (5 mM)	98,2	95,4
benzoato potásico (5 mM) + TRIS (5 mM) + cloruro cálcico (3 mM)	99,6	99,2

Ejemplo 4: Factor de coagulación VIII

La actividad del Factor VIII se ensayó midiendo el tiempo de coagulación en el ensayo APTT, mediante el uso del coagulómetro CA-50 (Sysmex). La recuperación de la actividad de coagulación del Factor VIII se midió tras incubación a 25 °C o 37 °C. Todas las composiciones de Factor VIII se ensayaron a un pH de 6 a 6,5, el intervalo de

pH óptimo para la estabilidad. Todas las composiciones contuvieron cloruro sódico 500 mM, cloruro cálcico 5 mM y 0,005% (p/p) de Tween 80.

Se sabe que el Factor VIII contiene cationes de calcio y cationes de otros metales divalentes en su estructura terciaria. Se estudió el efecto de los excipientes con diversas constantes de estabilidad (log K) de los complejos con calcio sobre la estabilidad del Factor VIII acuoso. Los excipientes y sus constantes de estabilidad (log K) de los complejos con los iones de calcio fueron los siguientes: TRIS (log K = 0,25), benzoato potásico (log K = 0,20), malato (log K = 2,06) y trietanolamina (log K = 1,4). Las muestras se mantuvieron en viales de vidrio sellados con un espacio de cabeza de aire o nitrógeno o al vacío. La recuperación de la actividad de Factor VIII en las muestras que contenían estos ligandos dependió de sus constantes de estabilidad con respecto a la unión a los iones metálicos. Así, la actividad de coagulación, a 25 °C y 37 °C, fue más alta en presencia de un sistema tampón que consistió en TRIS (10 mM) y benzoato potásico (10 mM). La recuperación de la actividad en presencia de otros sistemas tampón reflejó sus constantes de estabilidad, disminuyendo en el orden siguiente: trietanolamina (10 mM), histidina (10 mM) y malato (10 mM); véase la Tabla 5. De manera importante, la recuperación se incrementó adicionalmente si las muestras se mantuvieron bajo un espacio de cabeza de nitrógeno, y en particular bajo un espacio de cabeza al vacío (Tabla 5).

Tabla 5

Tiempo de coagulación (en segundos) de composiciones de Factor VIII tras la incubación a 25 °C o 37 °C durante 4 semanas en muestras acuosas mantenidas bajo un espacio de cabeza de aire, nitrógeno y al vacío. Todas las muestras se ajustaron a pH 6,5 y contuvieron cloruro sódico 500 mM, cloruro cálcico 5 mM y 0,005% (p/p) de Tween 80. (El tiempo de coagulación inferior indica una mejor estabilidad del Factor VIII)

	TRIS (10 mM)/ benzoato (10 mM)	Trietanolamina (10 mM)	Histidina (10 mM)	Malato (10 mM)
25 °C				
Aire	50,8	53,2	55,8	62,7
Nitrógeno	47,6	49,2	52,3	57,8
Vacío	46,2	No estudiado	49,2	No estudiado
37 °C				
Aire	54,3	58,1	67,5	75,8

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende una metaloproteína cuya actividad biológica y/o estructura tridimensional dependen de la retención de un ión de calcio en un sitio de unión en la proteína, y también
 - (i) comprende iones de calcio a una concentración de 0,01 a 20 mM;
 - (ii) comprende ligandos débiles que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K < 0,5$; y
 - (iii) está exenta de ligandos de fuerza media que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K$ de entre 0,5 y 2; y
 - (iv) está exenta de ligandos fuertes que tienen una constante de estabilidad para un complejo con ión de calcio de $\log K > 2$; o comprende tal ligando fuerte a una concentración no mayor que la concentración total de los iones de calcio;
2. Una composición según la reivindicación 1, que comprende un ligando fuerte a una concentración no mayor que la concentración total de los iones de calcio, por lo que el ligando fuerte no está disponible en forma libre.
3. Una composición según la reivindicación 2, en la que la concentración del ligando fuerte es < 1 mM.
4. Una composición según la reivindicación 3, en la que la concentración del ligando fuerte es $< 0,1$ mM.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que el ligando fuerte es EDTA.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la concentración de dichos iones de calcio es 0,05 a 10 mM.
7. Una composición según la reivindicación 6, en la que la concentración de dichos iones de calcio es 0,2 a 5 mM.
8. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un polialcohol o un carbohidrato.
9. Una composición acuosa según la reivindicación 1, que tiene un pH de alrededor de 6,5, que comprende factor VIII de la coagulación sanguínea y los aditivos siguientes:
 - (i) un sistema tampón que comprende TRIS e ión benzoato,
 - (ii) una fuente de ión de calcio a una concentración de 1 a 20 mM,
 - (iii) cloruro sódico a una concentración de 50 mM a 1 M,
 - (iv) polisorbato 80.
10. Una composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso en la terapia.
11. Una composición acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que es una composición farmacéutica.
12. Un recipiente sellado que contiene una composición según cualquier reivindicación precedente.
13. Un recipiente según la reivindicación 12, que incluye un espacio de cabeza que asegura la eliminación parcial o sustancial de los gases disueltos de la composición.
14. Un recipiente según la reivindicación 13, en el que el espacio de cabeza contiene nitrógeno o un gas noble.