

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 475**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/10** (2006.01)

**A61K 47/12** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009 E 09738438 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2283027**

54 Título: **Formulación de una proteína**

30 Prioridad:

**01.05.2008 GB 0807929**

**13.02.2009 GB 0902472**

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

**07.11.2014**

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 2 519 475 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 una proteína

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la estabilidad de proteínas que muestran la formación de dímeros o de especies de mayor peso molecular. La invención se refiere además a la estabilidad de las proteínas en sistemas acuosos, por ejemplo en una solución acuosa, en forma de gel acuoso o en estado no líquido como en estado sólido donde está presente agua libre o enlazada, por ejemplo, en estado de congelación o después de la eliminación parcial de agua, tal como mediante secado o liofilización.

**Antecedentes de la invención**

15 Muchas moléculas biológicas, tal como las proteínas, son inestables y son susceptibles a la degradación estructural y a la consiguiente pérdida de actividad mientras están almacenadas, en particular en soluciones acuosas. Los procesos involucrados en la degradación de las proteínas se pueden dividir en físicos (es decir, procesos basados en interacciones no covalentes, tal como la pérdida de la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria, agregación, adsorción superficial) y químicos (es decir, procesos que implican un cambio covalente tal como desamidación, hidrólisis, oxidación, codificación del disulfuro, etc.). Las velocidades de los procesos de degradación son típicamente proporcionales a la temperatura. Las proteínas son, por lo tanto, generalmente más estables a temperaturas más bajas. Los mismos principios de degradación se aplican generalmente a otras moléculas biológicas y sistemas supramoleculares más complejos formados por un número discreto de subunidades moleculares o componentes ensamblados.

25 Tanto la inestabilidad física como la química de las moléculas es un problema particular en muchas aplicaciones, tal como las aplicaciones destinadas a terapia.

Un problema particular de la estabilidad de las proteínas y otras moléculas biológicas, especialmente las utilizadas en terapia, es la formación de dímeros o de especies de mayor peso molecular (HMWS), mediante las que dos o más moléculas se agregan y forman entidades de mayor peso molecular. Dicha agregación puede ser reversible o irreversible, dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre las moléculas de proteínas. Un número de diferentes tipos de interacciones no covalentes se puede acoplar en la agregación de proteínas, tal como las interacciones iónicas entre partes cargadas positiva y negativamente de las moléculas de las proteínas, o las interacciones hidrófobas entre fragmentos hidrófobos en la superficie de la proteína. En casos raros, incluso las interacciones covalentes, tal como los enlaces de disulfuro pueden facilitar la agregación de las proteínas. Aunque los diferentes tipos de interacciones pueden combinarse, es típico que un tipo particular sea la fuerza dominante en el proceso de formación de HMWS. Así, por ejemplo, algunas proteínas pueden formar HMWS debido predominantemente a las interacciones iónicas, mientras que otras proteínas debido principalmente a las interacciones hidrófobas. Las condiciones que conducen a la formación de HMWS varían en adelante en función de las interacciones dominantes involucradas. En consecuencia, para minimizar la velocidad de formación de HMWS de diferentes proteínas pueden emplearse diferentes condiciones.

La formación de HMWS se puede medir mediante diversas técnicas tales como la cromatografía de exclusión por tamaño. La formación de grandes agregados se puede seguir mediante diversas técnicas de dispersión de la luz o de evaluación microscópica o visual.

La agregación es un problema particular en formulaciones de moléculas biológicas terapéuticas. Aunque las formas agregadas, especialmente si son reversibles, son a menudo equipotentes con la forma nativa de la proteína, la formación de HMWS representa un obstáculo considerable en el proceso de la aprobación según la normativa.

Otro problema de estabilidad particular de muchas clases diferentes de moléculas, que abarcan desde pequeñas moléculas hasta sistemas supramoleculares complejos, es la escisión de un enlace entre dos partes conjugadas de la molécula o del sistema. Ejemplos de tales procesos no deseables incluyen la escisión de un resto de polisacárido a partir de una proteína portadora en un número de vacunas basadas en polisacáridos (por ejemplo, la vacuna de Haemophilus influenzae b) o una escisión entre dominios clave de las proteínas de fusión (por ejemplo, Etanercept). La hidrólisis ácida o básica es típicamente el mecanismo de tales procesos de degradación.

La hidrólisis es una reacción química durante la cual una molécula de agua se divide en iones hidrógeno e hidróxido que van a participar en la escisión de un enlace covalente particular. La hidrólisis requiere la presencia de agua y se sabe que es un proceso que depende del pH. Sin embargo, la transferencia del protón de las moléculas también puede estar involucrada en el mecanismo de la escisión hidrolítica.

El documento WO 2007/003936 describe un sistema acuoso que comprende una proteína y uno o más agentes estabilizantes, caracterizado porque (i) uno o más agentes estabilizantes tienen grupos ionizables capaces de intercambiar protones con la proteína y con los productos ionizados de la disociación del agua; (ii) los grupos

ionizables incluyen primeros grupos que están cargados positivamente cuando están protonados y sin carga cuando están desprotonados, y segundos grupos que están sin carga cuando están protonados y cargados negativamente cuando están desprotonados; y (iii) el pH de la composición está dentro de un intervalo de estabilidad de la proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH.

5

### Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de varios parámetros deseables de formulaciones acuosas de moléculas pequeñas, macromoléculas tales como las proteínas y los sistemas supramoleculares. La aplicación de la invención da como resultado una mejora de la estabilidad, potencialmente sustancial, de tales moléculas o sistemas. En algunos aspectos, la aplicación de la invención da como resultado la reducción deseable de la formación de dímeros y HMWS durante el almacenamiento. En otros aspectos, la aplicación de la invención da como resultado una reducción deseable de la velocidad de los procesos hidrolíticos desestabilizadores.

Según la invención, se proporciona una composición acuosa terapéuticamente útil que comprende una proteína a un pH ajustado a un valor particular, con la velocidad de dimerización o de formación de especies de alto peso molecular reducida a dicho pH, caracterizada porque la composición comprende un excipiente anfílico que tiene una carga y una zona no polar y especies no iónicas para ajustar su osmolaridad y en donde la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, siendo dicha fuerza iónica calculada usando la fórmula:

20

$$I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2$$

en la que  $c_x$  es la concentración molar de ion  $x$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $z_x$  es el valor absoluto de la carga de ion  $x$  y la suma abarca todos los iones ( $n$ ) presentes en la composición.

25

### Descripción de la invención

La expresión "molécula pequeña" se utiliza aquí para abarcar una molécula de cualquier estructura química con un peso molecular entre 50-2.000 Da.

30

El término "macromolécula" se utiliza aquí para abarcar una molécula de cualquier estructura química con un peso molecular mayor que 2.000 Da. Las macromoléculas serán típicamente de naturaleza polimérica, pero la invención no se limita a las macromoléculas poliméricas.

El término "proteína" se utiliza aquí para abarcar moléculas o complejos moleculares que consisten en un único polipéptido, 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. El término "polipéptido" pretende abarcar polipéptidos que comprenden restos no aminoácidos enlazados de forma covalente, tales como polipéptidos glicosilados, lipoproteínas, etc.

40

La expresión "sistemas supramoleculares" se utiliza aquí para abarcar cualquier sistema compuesto por un número discreto de subunidades moleculares o componentes ensamblados.

La expresión "sustancia utilizada en terapia" se utiliza aquí para abarcar cualquier sustancia que se desarrolla con la intención de ser utilizada en pruebas clínicas o para ser aprobadas como parte de un dispositivo médico o como un producto farmacéutico.

La expresión "especies de alto peso molecular" se utiliza aquí para abarcar cualquier especie formada por la agregación de la forma nativa de una especie, tal como una proteína. El término abarca tanto las formas agregadas solubles como insolubles.

50

La expresión "tampón desplazado" se utiliza aquí para abarcar cualquier aditivo presente en una composición de pH especificado que sea capaz de intercambiar protones y que tenga un valor o valores de  $pK_a$  (s) al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo de temperatura pretendido de almacenamiento de la composición. La técnica de aplicar tampones desplazados a formulaciones de productos biológicos se describe en el documento W02008/084237. En esa memoria descriptiva se describe la importancia de los tampones desplazados convencionales y la distinción entre ellos.

55

La expresión "fuerza iónica" se usa en el presente documento como la siguiente función de la concentración de todos los iones en una solución:

$$I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2$$

5 en la que  $c_x$  es la concentración molar de ion  $x$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $z_x$  es el valor absoluto de la carga del ion  $x$ . La suma abarca todos los iones ( $n$ ) presentes en la composición.

10 Muchas proteínas y otras moléculas biológicas experimentan el proceso de agregación, es decir, la formación de HMWS, durante el almacenamiento, especialmente en soluciones acuosas. La agregación es típicamente favorecida por interacciones no covalentes, tales como interacciones carga-carga o interacciones hidrófobas entre los restos de aminoácidos en la superficie de moléculas individuales de proteínas. Tanto la carga como la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos son dependientes del pH. Por ejemplo, el resto de histidina ( $pK_a$  de aproximadamente 6,1) existe predominantemente en la forma cargada a  $\text{pH} < 6,1$  y predominantemente en la forma sin carga a  $\text{pH} > 6,1$ , siendo la forma sin carga considerablemente más hidrófoba que la cargada. En consecuencia, la tendencia de las proteínas y otras moléculas biológicas a agregarse también es dependiente del pH. Por tanto, es importante optimizar el pH de la formulación con el fin de minimizar la tendencia de la proteína a formar dímeros o HMWS. Sin embargo, aparte del pH existen otros parámetros que también son muy importantes para minimizar la tendencia de las proteínas y de otras moléculas biológicas a agregarse. Tales parámetros pueden variar considerablemente dependiendo de la naturaleza del proceso de agregación. La presente invención se refiere a estos parámetros. La importancia de estos parámetros puede ser relativamente baja si la proteína se mantiene a un pH óptimo con respecto a la agregación, pero es muy significativa si la proteína debe ser mantenida a un pH alejado del óptimo, por ejemplo por razones de aceptabilidad de la normativa o para una solubilidad mejorada.

25 Una característica preferida de la presente invención en relación con la disminución de la velocidad de formación de HMWS de las proteínas está en combinar las siguientes características de formulación en la formulación de una proteína:

- Mínima fuerza iónica: la fuerza iónica de la formulación se mantiene mínima, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM.
- Uso de una especie cargada que comprende una zona no polar (hidrófoba) considerable tal como un núcleo de benceno o una cadena alifática de cuatro o más átomos de carbono. El ejemplo preferido de tal compuesto anfifílico que se puede emplear de manera útil en las composiciones de proteínas según la presente invención es el ácido benzoico, particularmente su forma iónica (ion benzoato).
- Opcionalmente, el uso de tampones desplazados para mantener el pH requerido: la formulación está sustancialmente exenta de un tampón convencional, es decir, un compuesto con  $pK_a$  dentro de 1 unidad del pH de la composición al intervalo pretendido de temperatura de almacenamiento de la composición, y comprende uno o más aditivos (tampones desplazados) que son capaces de intercambiar protones con la proteína y que tienen valores de  $pK_a$  de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo pretendido de temperatura de almacenamiento de la composición; la técnica de aplicar tampones desplazados a las formulaciones de compuestos biológicos se describe en el documento PCT/BG2007/000082.

45 Mediante la combinación de estos parámetros de formulación, la velocidad de la formación no deseable de HMWS puede reducirse sustancialmente. Preferiblemente, la formulación se mantiene a un pH al cual la velocidad de formación de HMWS sea mínima. El pH óptimo se puede establecer experimentalmente. Sin embargo, la invención es aplicable a un pH alejado de ese pH óptimo.

La invención es particularmente aplicable para estabilizar sustancias utilizadas en terapia.

50 La formación de dímeros o de HMWS es muy probable que implique interacciones hidrófobas. Esto significa que las zonas hidrófobas en la superficie de dos o más moléculas de proteínas interactúan y participan en interacciones enlazantes no covalentes. Esto conduce a una agregación gradual. Sin que se desee limitar por la teoría, es útil tener en cuenta que la formación de enlaces hidrófobos se sabe que está impulsada termodinámicamente por el aumento de entropía del sistema por la eliminación de las interacciones desfavorables entre las zonas hidrófobas y el entorno acuoso circundante. Es importante destacar que el aumento de entropía será aún mayor si existe una alta concentración de especies cargadas presentes en el medio acuoso. Por esta razón, la formación de HMWS, si es favorecida principalmente por interacciones hidrófobas, es probablemente para continuar más fácilmente a una elevada fuerza iónica que a una baja fuerza iónica. Particularmente, éste es el caso si la proteína no se mantiene a un pH óptimo con respecto a una agregación mínima.

60 Una formulación típica de una proteína terapéutica contiene un tampón (por ejemplo, fosfato, histidina o citrato) y uno o más de los siguientes excipientes: modificadores de la tonicidad (por ejemplo, sales inorgánicas o aminoácidos), tensioactivos (por ejemplo, Polysorbate 80) y azúcares o polialcoholes (por ejemplo, sacarosa o

manitol). Muchos de estos tampones y excipientes contribuyen considerablemente a la fuerza iónica de la formulación acuosa, por lo que las composiciones de proteínas destinadas a terapia son típicamente de fuerza iónica relativamente alta, tal como mayor que 100 mM, mayor que 150 mM o mayor que 200 mM. Se cree que la importancia de la baja fuerza iónica en la minimización de la agregación de las proteínas, especialmente si la proteína se mantiene fuera del pH óptimo con respecto a la agregación, no se ha considerado, en particular en formulaciones comerciales de proteínas terapéuticas.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención describe un procedimiento para la minimización de la formación de dímero o la formación de HMWS de una proteína, particularmente de tales moléculas usadas en terapia, poniendo la proteína en una formulación de cierto pH con una fuerza iónica mínima, tal como menor que 30 mM, preferiblemente menor que 15 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. Tal procedimiento es particularmente útil si se mantiene la proteína fuera del pH óptimo con respecto a la agregación, por ejemplo por razones de solubilidad mejorada.

En otro aspecto de la presente invención, una composición acuosa comprende una proteína a un pH ajustado a un valor particular, con una velocidad reducida de formación de dímero o formación de HMWS a dicho pH, caracterizada además porque la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, preferiblemente menor que 15 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. La osmolaridad de dicha composición puede ajustarse a un nivel requerido usando especies no iónicas, tales como azúcares o alcoholes de azúcares.

Típicamente, en una formulación de una proteína terapéutica se necesita alguna concentración de especies iónicas como tampones. Por lo tanto, la presente invención puede plantear problemas para garantizar la suficiente capacidad de tamponamiento mientras se minimiza la velocidad de agregación. Tales problemas pueden ser abordados mediante la elección específica de especies iónicas como tampones de la forma siguiente: Dado que la fuerza iónica de una especie iónica es proporcional al cuadrado de la carga de tales especies los iones multivalentes contribuyen de forma considerablemente más enérgica a la fuerza iónica que los monovalentes. El uso de iones monovalentes como tampones es, por tanto, preferible frente a los multivalentes para garantizar un grado de la capacidad de tamponamiento mientras se reduce al mínimo la fuerza iónica de la composición.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención una composición acuosa comprende una proteína a un pH ajustado a un valor particular, con velocidad reducida de formación de dímero o de formación de HMWS a tal pH, caracterizada además porque la composición está sustancialmente exenta de iones multivalentes y la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, preferiblemente menor que 15 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel requerido usando especies no iónicas, tales como azúcares o alcoholes de azúcares.

Se ha demostrado experimentalmente que es beneficioso si al menos una de las especies cargadas en tales composiciones de proteínas comprende una zona no polar (hidrófoba) considerable, tal como un núcleo de benceno o una cadena alifática de cuatro o más átomos de carbono. El uso de dicho compuesto anfifílico reduce aún más la velocidad de formación de dímero o de formación de HMWS. El ejemplo preferido de dicho compuesto anfifílico que se pueden emplear útilmente en las composiciones de proteínas según la presente invención es el ácido benzoico, particularmente su forma iónica (ion benzoato). El ácido benzoico comprende un grupo carboxílico, que está predominantemente cargado a  $\text{pH} > 4,2$ , y un núcleo de benceno no polar. También es un excipiente aprobado para formulaciones terapéuticas. Sin que se desee limitar por la teoría, se cree que el efecto beneficioso del ácido benzoico y tipo similar de excipientes se debe a su enlace con las zonas hidrófobas de la proteína a través del núcleo de benceno, mientras la carga se expone a la solución acuosa. Así, una carga se introduce en la zona hidrófoba de la proteína, lo que disminuye la tendencia de la zona hidrófoba para participar en interacciones hidrófobas. Esto da como resultado una menor velocidad de agregación de las proteínas.

En otro aspecto de la presente invención un sistema acuoso comprende una proteína a un pH ajustado a un valor particular, con la velocidad de formación de dímero o de formación de HMWS reducida a tal pH, caracterizado además porque (i) la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, preferiblemente menor que 15 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM, y (ii) la composición comprende un compuesto cargado que contiene una extensa zona hidrófoba tal como un núcleo de benceno o un cadena alifática de cuatro o más átomos de carbono. El ion benzoato es el excipiente preferido de tal composición. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel requerido usando especies sin carga tales como azúcares o alcoholes de azúcares.

La presente invención también proporciona el uso de una composición acuosa que comprende un excipiente anfifílico que tiene una carga y una zona no polar y especies no iónicas para ajustar su osmolaridad y en el que la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, siendo dicha fuerza iónica calculada usando la fórmula:

$$I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2$$

en la que  $c_x$  es la concentración molar de ion  $x$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $z_x$  es el valor absoluto de la carga de ion  $x$  y la suma abarca todos los iones ( $n$ ) presentes en la composición, para reducir la velocidad de dimerización o de formación de especies de alto peso molecular de una proteína terapéuticamente útil a un pH ajustado a un valor particular.

5 En otro aspecto, la presente invención describe un procedimiento para la minimización de formación de dímero o de formación de HMWS de una proteína (i) poniendo la proteína en una formulación de cierto pH con una fuerza iónica mínima, tal como menor que 30 mM, preferiblemente menor que 15 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM, y (ii) añadiendo a la composición un compuesto iónico que contenga una extensa zona hidrófoba tal como un núcleo de benceno o una cadena alifática de cuatro o más átomos de carbono. Tal procedimiento es particularmente útil si la proteína es mantenida fuera del pH óptimo con respecto a la agregación, por ejemplo por razones de solubilidad mejorada.

Además de mejorar la estabilidad de las proteínas por la reducida de formación de HMWS, la presente descripción también se refiere a la estabilidad de moléculas terapéuticas para reducir la velocidad de los procesos hidrolíticos, tal como la escisión de los enlaces amida o de los enlaces éster.

La hidrólisis es un problema de estabilidad particular de muchas clases diferentes de moléculas, que abarcan desde pequeñas moléculas hasta sistemas supramoleculares complejos. Ejemplos de tales procesos no deseables incluyen la escisión de un resto polisacárido de una proteína portadora en diversas vacunas basadas en polisacáridos (por ejemplo, la vacuna Haemophilus influenzae b) o una escisión entre dominios clave de proteínas de fusión (por ejemplo, Etanercept). Típicamente, el mecanismo de tales procesos de degradación es la hidrólisis ácida o básica.

La hidrólisis también puede ser parte del mecanismo de procesos más complejos, tales como la desamidación de asparagina o la isomerización de aspartato. Por consiguiente, la presente descripción también es aplicable en la estabilización de varias moléculas con respecto a procesos de este tipo que comprenden la hidrólisis como parte de su mecanismo molecular.

La hidrólisis es una reacción química durante la cual la molécula de agua se divide en iones hidrógeno e hidróxido que van a participar en la escisión de un enlace covalente determinado. Se sabe que la hidrólisis es un proceso muy dependiente del pH. Sin embargo, la transferencia de protón de moléculas distintas del agua también puede estar involucrada en el mecanismo de la escisión hidrolítica. Se sabe que, generalmente, la hidrólisis depende fuertemente del pH. La optimización de pH es, por tanto, esencial para reducir la velocidad de la hidrólisis. Sin embargo, otros parámetros de la formulación pueden conseguir una reducción adicional en la velocidad de la hidrólisis. La presente descripción se refiere a los parámetros clave de formulación adicionales que se pueden utilizar para reducir aún más la velocidad de los procesos hidrolíticos en formulaciones de una amplia gama de moléculas y sistemas más complejos.

Otra característica preferida de la presente descripción en relación con la reducción de la velocidad de hidrólisis está en la combinación de las siguientes características de formulación en la formulación de una molécula determinada o de un sistema más complejo:

- Fuerza iónica mínima: la fuerza iónica de la formulación se mantiene mínima, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM.
- Uso de tampones desplazados para mantener el pH requerido: la formulación está sustancialmente exenta de un tampón convencional, es decir, un compuesto con  $\text{pK}_a$  dentro de 1 unidad del pH de la composición en el intervalo pretendido de temperatura de almacenamiento de la composición, y comprende uno o más aditivos (tampones desplazados) que son capaces de intercambiar protones con otras moléculas y que tienen valores de  $\text{pK}_a$  de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo pretendido de temperatura de almacenamiento de la composición; la técnica de la aplicación de tampones desplazados a formulaciones de compuestos biológicos se describe en el documento W02008/084237.

Mediante la combinación de estos parámetros de formulación, puede reducirse de forma sustancial la velocidad del proceso hidrolítico no deseable. Preferiblemente, la formulación se mantiene a un pH en el que la velocidad de hidrólisis sea mínima. El pH óptimo se puede establecer experimentalmente. Sin embargo, la descripción es aplicable a un pH alejado de tal pH óptimo.

La descripción es particularmente aplicable para la estabilización de las sustancias utilizadas en terapia.

60 En un aspecto, la presente descripción describe un procedimiento para la minimización de la velocidad del proceso hidrolítico en una molécula o en un sistema supramolecular poniendo la molécula o el sistema en una formulación de cierto pH con fuerza iónica mínima, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. Preferiblemente, el pH de la composición se ajusta a un nivel en el que la velocidad del proceso hidrolítico no deseable sea mínima.

También se describe una composición acuosa que comprende una molécula o un sistema supramolecular, a un pH

ajustado a un valor particular, caracterizada además porque la fuerza iónica de la composición es menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel requerido usando especies no iónicas tales como azúcares o alcoholes de azúcares. Preferiblemente, el pH de la composición se ajusta a un nivel en el que la velocidad del proceso hidrolítico no deseable sea mínima.

Típicamente, en una formulación de una proteína terapéutica se necesita alguna concentración de especies iónicas como tampones o antioxidantes. Por lo tanto, la presente descripción puede plantear problemas en garantizar una suficiente capacidad tampón, mientras se minimiza la velocidad de hidrólisis. Tales problemas pueden ser abordados por el uso de iones monovalentes como tampones o antioxidantes evitando al mismo tiempo los multivalentes para garantizar un grado de capacidad de amortiguación mientras se reduce al mínimo la fuerza iónica de la composición. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente descripción una composición acuosa comprende una molécula o un sistema supramolecular, a un pH ajustado a un valor particular, caracterizada además porque la composición está sustancialmente exenta de iones multivalentes y la fuerza iónica de la composición es menor que 40 mM, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel requerido usando especies no iónicas tales como azúcares o alcoholes de azúcares. Preferiblemente, el pH de la composición se ajusta a un nivel en el que la velocidad del proceso hidrolítico no deseable sea mínima.

Se ha demostrado experimentalmente que con el fin de reducir aún más la velocidad de hidrólisis es beneficioso utilizar tampones desplazados mientras se mantiene la composición sustancialmente exenta de tampones convencionales. Por lo tanto, en otro aspecto de la presente descripción una composición acuosa comprende una molécula o un sistema supramolecular, a un pH ajustado a un valor particular, caracterizada además porque la composición está sustancialmente exenta de tampón convencional y comprende uno o más aditivos que son capaces de intercambiar protones con la proteína y que tienen valores de  $pK_a$  de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo pretendido de temperatura de almacenamiento de la composición; la fuerza iónica de la composición es preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel requerido usando especies no iónicas, tales como azúcares o alcoholes de azúcares. Preferiblemente, el pH de la composición se ajusta a un nivel en el que la velocidad del proceso hidrolítico no deseable sea mínima.

Varios procesos hidrolíticos son catalizados por la transferencia de protón en el sitio de escisión favorecido por moléculas distintas del agua, por ejemplo moléculas de tampones. Sin que se desee limitar por la teoría, se cree que la ventaja de usar tampones desplazados en lugar de tampones convencionales en las composiciones de moléculas que sean propensas a la escisión hidrolítica está en minimizar la velocidad de transferencia de protones desde las moléculas de tampones convencionales hacia o desde el sitio de escisión.

La invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos:

#### **Ejemplo 1 (Referencia)**

La formación de HMWS fue seguida en una solución de alfa-glucosidasa (12,5 mg/ml) usando el siguiente procedimiento cromatográfico de exclusión por tamaño: La fase móvil era fosfato de sodio 25 mM (pH 6,2) que contenía NaCl 150 mM. La fase móvil se filtró antes de usar. El cromatógrafo de líquidos (Agilent serie 1100) estaba equipado con un detector de 214 nm, una columna de protección y una columna BioSep SEC-S2000 de 7,8 x 300 mm. El caudal se mantuvo en 0,45 ml/min. Se inyectaron 20  $\mu$ l de muestras acuosas de alfa-glucosidasa. El nivel de especies de alto peso molecular se expresó como el porcentaje del área total de pico de todos los picos con un tiempo de elución más corto que el del pico principal frente al área del pico principal.

La velocidad de agregación se estudió a 25 °C en presencia de tampón TRIS 4 mM. La fuerza amortiguadora del tampón TRIS a pH<6,5 es mínima, pero se originó suficiente capacidad de tamponamiento a partir de la propia enzima relativamente concentrada a dicho pH. Se encontró que el pH óptimo con respecto a la formación mínima de HMWS era alrededor de 6,5. La velocidad de agregación era mayor tanto a pH menor como a pH más alto. El aumento de la fuerza iónica dio como resultado un aumento considerable de la velocidad de HMWS, especialmente fuera del pH óptimo (Tabla 1). Así, mientras que el aumento de la fuerza iónica dio como resultado sólo un aumento moderado de la velocidad de agregación a pH 6,5 el incremento era considerablemente más alto tanto a pH mayor como a pH más bajo.

**Tabla 1**

Formación de HMWS (%) a 25 °C (3 semanas) en la formulación acuosa de alfa-glucosidasa (12,5 mg/ml) en presencia de tampón TRIS 4 mM y la concentración indicada de NaCl.

pH	NaCl 0 mM	NaCl 25 mM	NaCl 100 mM
5,5	4,13	9,94	34,68
6,0	1,07	3,12	8,92
6,5	0,44	1,36	3,26
7,0	1,06	4,80	5,11
7,5	4,36	7,99	22,68
8,0	10,01	32,32	45,96

5

**Ejemplo 2**

Se estudió el efecto del ácido benzoico sobre la velocidad de formación de HMWS a 25 °C y a 40 °C (2 semanas) en una solución de alfa-glucosidasa (12,5 mg/ml) utilizando el procedimiento cromatográfico de exclusión por tamaño descrito en el Ejemplo 1. La velocidad de agregación se estudió en presencia de tampón TRIS 2 mM. Aparte del ácido benzoico y/o TRIS, ninguna otra especie cargada estaba presente en la formulación.

10

Se demostró que la presencia de ácido benzoico reducía la velocidad de formación de HMWS tanto a 25 °C (Tabla 2) como a 40 °C. El efecto era más marcado a pH 7,5, es decir, alejado del pH óptimo con respecto a la agregación mínima, que a pH óptimo (pH 6,5)

15

**Tabla 2**

Formación de HMWS (%) a 25 °C (4 semanas) en la formulación acuosa de alfa-glucosidasa (12,5 mg/ml) en presencia de tampón Tris (2 mM) bien en presencia o bien en ausencia de ácido benzoico (2 mM).

20

pH	Sin ácido benzoico 2 mM	Con ácido benzoico 2 mM
6,5	1,93	0,92
7,0	2,23	0,83
7,5	2,40	0,98

**Tabla 3**

Formación de HMWS (%) a 40 °C (2 semanas) en la formulación acuosa de alfa-glucosidasa (12,5 mg/ml) en presencia de tampón Tris (2 mM) bien en presencia o bien en ausencia de ácido benzoico (2 mM).

25

pH	Sin ácido benzoico 2 mM	Con ácido benzoico 2 mM
6,5	16,82	3,76
7,0	18,16	3,80
7,5	25,09	4,08

## REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa terapéuticamente útil que comprende una proteína a un pH ajustado a un valor particular, con la velocidad de dimerización o de formación de especies de alto peso molecular reducida a dicho pH, caracterizada porque la composición comprende un excipiente anfifílico que tiene una carga y una zona no polar y especies no iónicas para ajustar su osmolaridad y en donde la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, siendo dicha fuerza iónica calculada usando la fórmula:

$$I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2$$

10 en la que  $c_x$  es la concentración molar de ion  $x$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $z_x$  es el valor absoluto de la carga de ion  $x$  y la suma abarca todos los iones ( $n$ ) presentes en la composición.

2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la fuerza iónica es menor que 15 mM.
3. Una composición según la reivindicación 1, en donde la fuerza iónica es menor que 10 mM.
4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está sustancialmente exenta de iones divalentes.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la zona no polar es un núcleo de benceno.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la zona no polar es una cadena alifática de al menos cuatro carbonos.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el excipiente anfifílico es ácido benzoico.
8. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la proteína es una vacuna.
9. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde las especies no iónicas para ajustar la osmolaridad son azúcares o alcoholes de azúcares.
10. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un agente quelante fisiológicamente aceptable.
11. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un detergente fisiológicamente aceptable.
12. Uso de una composición acuosa que comprende un excipiente anfifílico que tiene una carga y una zona no polar y especies no iónicas para ajustar su osmolaridad y en donde la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, siendo dicha fuerza iónica calculada usando la fórmula:

$$I = \sum_{X=1}^n c_x z_x^2$$

45 en la que  $c_x$  es la concentración molar de ion  $x$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $z_x$  es el valor absoluto de la carga de ion  $x$  y la suma abarca todos los iones ( $n$ ) presentes en la composición, para reducir la velocidad de dimerización o de formación de especies de elevado peso molecular de una proteína terapéuticamente útil a un pH ajustado a un valor particular.

13. Uso según la reivindicación 12, en donde la zona no polar es un núcleo de benceno.
14. Uso según la reivindicación 12, en donde el excipiente anfifílico es ácido benzoico.
15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la proteína es una vacuna.