

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 657**

51 Int. Cl.:

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/47 (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 12157010 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2457590**

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:

18.03.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JEZEK, JAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 657 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

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la estabilidad de una amplia gama de moléculas. En particular, la invención se refiere a la estabilidad de las proteínas y otras moléculas biológicas que presentan formación de dímeros o especies de mayor peso molecular. La invención se refiere también a la estabilidad de una amplia gama de moléculas, que van desde pequeñas moléculas hasta complejos sistemas supramoleculares, en particular a la estabilidad de tales moléculas en las que es un problema la hidrólisis de un enlace entre dos partes conjugadas de la molécula o del sistema. La invención se refiere a la estabilidad de moléculas en sistemas acuosos, por ejemplo en una solución acuosa, en
10 forma de gel acuoso o en estado no líquido como en estado sólido donde está presente agua libre o ligada, 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
20 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
30 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
35 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.

40 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.

45 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.

50 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.

55 El documento WO 2005/089794 A2 describe formulaciones acuosas farmacéuticamente útiles de vacunas

conjugadas de Hib-polisacárido en composiciones que comprenden otras vacunas así como también 0,3 mg de Al^{3+} y 4,5 mg de NaCl (0,077 mmol NaCl) que tienen una fuerza iónica de 308 mM.

Compendio de la invención

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de varios parámetros deseables de formulaciones acuosas de pequeñas moléculas, macromoléculas tales como proteínas y 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 descripción 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.

10 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.

15 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.

20 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.

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

25 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.

30 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 WO2008/084237, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia. En esa memoria descriptiva se describe la importancia de los tampones desplazados convencionales y la distinción entre ellos.

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

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

en la que c_x es la concentración molar de ion x (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.

40 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

45

50 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 descripción se refiere a

tales parámetros. La importancia de tales 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.

5 Una característica preferida de la presente descripción en relación con la disminución de la velocidad de formación de HMWS de proteínas y otras moléculas biológicas está en combinar las siguientes características de formulación en la formulación de una proteína u otras moléculas biológicas o sistemas supramoleculares:

- Mínima fuerza iónica: la fuerza iónica de la formulación se mantiene mínima, tal como menor que 40 mM, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM.

10 • 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 anfílico 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).

15 • 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 molécula biológica 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.

20 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 descripción es aplicable a un pH alejado de ese pH óptimo.

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

25 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.

35 Una formulación típica de una proteína u otra molécula biológica 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.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la presente descripción afecta a un procedimiento para minimizar la formación de dímero o la formación de HMWS de una proteína u otras moléculas biológicas, 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.

50 En otro aspecto de la presente invención, una composición acuosa comprende una proteína u otra molécula biológica 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.

55 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 descripción una composición acuosa comprende una proteína u otra molécula biológica 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 anfífilo reduce aún más la velocidad de formación de dímero o de formación de HMWS. El ejemplo preferido de dicho compuesto anfífilo 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.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente descripción un sistema acuoso comprende una proteína u otra molécula biológica a un pH ajustado a un valor particular, con una tasa reducida de formación de dímero o de formación de HMWS en tales pH, caracterizado además porque (i) la fuerza iónica de la composición es menos de 30 mM, preferiblemente menos de 15 mM, más preferiblemente menos de 10 mM, y (ii) la composición comprende un compuesto cargado que contiene una extensa zona hidrófoba tal como un núcleo de benceno o una cadena alifática de cuatro o más átomos de carbono. El ion benzoato es el excipiente preferido en tal composición. La osmolaridad de tal composición se puede ajustar a un nivel deseado utilizando especies no cargadas tales como azúcares o alcoholes de azúcares.

En otro aspecto, la presente descripción describe un procedimiento para minimizar la formación de dímero o la formación de HMWS de una proteína u otra molécula biológica (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.

La presente descripción 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, Etnarcept). 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:

- 5 • Fuerza iónica mínima: la fuerza iónica de la formulación se mantiene mínima, tal como menor que 40 mM, preferiblemente menor que 20 mM, lo más preferiblemente menor que 10 mM.
- 10 • 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 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 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.

15 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 invención es particularmente aplicable para la estabilización de las sustancias utilizadas en terapia.

20 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, tal como menor que 40 mM, 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.

25 En otro aspecto de la presente invención, 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 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.

30 Típicamente, en una formulación de una proteína terapéutica se necesita alguna concentración de especies iónicas como tampones o antioxidantes. Por lo tanto, la presente invención 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.

45 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 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.

55 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.

Aspectos adicionales de la descripción están definidos por las siguientes cláusulas:

1. Una composición que comprende una molécula biológica que es susceptible de agregación, dimerización o hidrólisis, en donde la fuerza iónica es menor que 40 mM.
2. Una composición según la cláusula 1, en donde la fuerza iónica es menor que 20 mM.
- 5 3. Una composición según la reivindicación 1, en donde la fuerza iónica es menor que 10 mM.
4. Una composición según cualquier cláusula precedente, que es acuosa.
5. Una composición según la cláusula 4, que está sustancialmente exenta de iones divalentes.
6. Una composición según la cláusula 4 ó 5, que comprende un excipiente anfífilico que tiene una zona cargada y una no polar.
- 10 7. Una composición según la cláusula 6, en donde la zona no polar es un núcleo de benceno o una cadena alifática de al menos cuatro carbonos.
8. Una composición según la cláusula 6, en donde el excipiente anfífilico es ácido benzoico.
9. Una composición según cualquiera de las cláusulas 4 a 8, que está sustancialmente exenta de tampones convencionales y comprende uno o más aditivos (tampones desplazados) que son capaces de intercambiar protones con la molécula biológica y tener valores de pK_a al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición.
- 15 10. Una composición acuosa que comprende una molécula biológica, tris(aminometil)hidroximetano y ácido benzoico o anión lactato.
- 20 11. Una composición según la cláusula 10, en donde la concentración de tris(aminometil)hidroximetano es 2 a 20 mM y la concentración de ácido benzoico es 2 a 20 mM.
12. Una composición según la cláusula 10, en donde la concentración de tris(aminometil)hidroximetano es 2 a 20 mM y la concentración de anión lactato es 2 a 20 mM.
13. Una composición según cualquier cláusula 10 a 12, que tiene un pH de 5,5 a 8,0.
- 25 14. Una composición según la cláusula 13, que tiene un pH de 6,0 a 7,5.
15. Una composición según cualquier cláusula precedente, en donde la molécula biológica es una proteína.
16. Una composición según cualquier cláusula precedente, en donde la molécula biológica es una vacuna.
17. Una composición según cualquier cláusula precedente, que comprende además un azúcar o un alcohol de azúcar.
- 30 18. Una composición según cualquier cláusula precedente, que comprende además un agente quelante fisiológicamente aceptable.
19. Una composición según cualquier cláusula precedente, que comprende además un detergente fisiológicamente aceptable.
20. Una composición según cualquier cláusula precedente, para uso terapéutico.

35 La invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1

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 μ 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.

45 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

5 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 |

10

Ejemplo 2

15 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.

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)

Tabla 2

20 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).

| 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

25 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).

| 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 |

Ejemplo 3

La hidrólisis del antígeno polisacárido (polirribosa fosfato-ribosa, PRP) a partir de una proteína portadora es un problema particular de la vacuna contra *Haemophilus influenzae b* (Hib). La extensión de la hidrólisis puede expresarse en: términos del porcentaje de la PRP libre (es decir, no ligada a la proteína portadora) en la formulación.

5 El procedimiento se basa en la separación de PRP libre a partir de PRP ligado y posterior cuantificación de PRP en ambas fracciones por la reacción de Bial (Kabat EA, Mayer, M.: Carbohydrate estimation. En: Experimental immunochemistry. Springfield, IL, C. Thomas, 1961, pág. 526-37). En el experimento descrito en el presente documento, el PRP libre se separaba del PRP ligado precipitando la vacuna Hib con desoxicolato. Después, se llevó a cabo la digestión y el análisis con el tinte de orcinol con el fin de determinar la parte de ribosa presente en cada fracción. Se siguió el siguiente procedimiento: En un tubo de microcentrífuga se pipeteó una muestra pura (200 µl; de 50 µg/ml). Para el blanco, se utilizaron 200 µl de agua analítica. A cada tubo se añadieron 80 µl de desoxicolato (0,1 % peso/vol.) y después se agitaron en vórtex. Estos se incubaron después (30 minutos, a +4 °C). Después de esta incubación, a cada tubo se añadió ácido hidroclicórico (50 µl, 1 M). Todos los tubos se agitaron en vórtex y después se centrifugaron (45 minutos a 5,2 g) a 4 °C. Mientras en un espacio frío se retiraron en cada caso 165 µl de sobrenadante y se pusieron en un tubo de microfuga. Después, se retiró y se desechó el resto de sobrenadante. El volumen de cada sobrenadante se completó hasta 200 µl con la adición de agua para análisis (35 µl). Los sobrenadantes estaban ahora listos para el análisis de la ribosa libre. A temperatura ambiente, a cada gránulo se añadió hidróxido sódico (0,1 M, 200 µl). El gránulo se agitó en vórtex y se agitó usando una pipeta para disolverlo. En cada caso la mitad de la solución de gránulo (100 µl) se tomó en alícuotas en un nuevo tubo de microfuga y el volumen se completó hasta 200 µl con agua analítica (100 µl). Las soluciones de gránulos estaban ahora listas para el análisis de la ribosa ligada a la glicoproteína. En la campana extractora de gases y con el uso de guantes, tanto a los sobrenadantes como a las soluciones de los gránulos se añadieron 200 µl de cloruro férrico en ácido hidroclicórico 10 M. Después, en cada caso, se añadieron 20 µl de solución de tinte de orcinol (10 % en etanol absoluto) en la mezcla incubada a 95 °C durante 40 min. Inmediatamente después de la incubación los tubos se enfriaron en vaso de precipitados de agua fría (+4 °C). Los contenidos se transfirieron a cubetas y se midió la absorbancia a 670 nm. Los valores obtenidos deben tener restados los valores apropiados de los blancos. A los sobrenadantes se les restará el blanco de sobrenadante y a los valores de los gránulos se les restará los blancos de los gránulos (esta diferencia se debe a la presencia de desoxicolato en las muestras de los gránulos, que afecta al valor de la absorbancia). El valor resultante puede usarse entonces en la siguiente ecuación:

$$30 \quad \% \text{ de ribosa libre} = [(\text{Absorbancia-sobrenadante}) / (\text{Absorbancia-sobrenadante} + \text{Absorbancia-gránulo})] \times 100$$

Diversos productos vacunas contra la Hib (por ejemplo, HibTITER, Wyeth) disponibles comercialmente se formulan actualmente en solución salina al 0,9 % como ingrediente clave de la formulación. Se demostró que puede lograrse una mejora significativa en la estabilidad si la vacuna se formula en un entorno de baja fuerza iónica a un pH de aproximadamente 6. La histidina se utilizó como tampón en este caso y como modificador de tonicidad se utilizó 1, 2-propanodiol no cargado. La estabilidad se estudió a 40 °C. En contraste, sólo un 11 % de aumento en PRP libre pudo observarse después de 3 semanas y 40 % después de 13 semanas de incubación un 40 °C en la formulación de base histidina de baja fuerza iónica. Sin embargo, la mejor estabilidad podía lograrse si el tampón de histidina de la formulación de baja fuerza iónica era sustituido por un tampón desplazado basado en la combinación de Tris(aminometil)hidroximetano (10 mM) y lactato sódico (10 mM). Menos de 5 % de aumento de PRP libre se puede observar en tal formulación después de la incubación a 40 °C durante 3 semanas y <25 % después de incubación a 40 °C durante 13 semanas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa para uso en terapia que comprende una vacuna basada en un polisacárido susceptible de escisión hidrolítica de un resto de polisacárido a partir de una proteína portadora, en donde la fuerza iónica de la composición es menor que 30 mM, siendo dicha fuerza iónica calculada usando la fórmula:

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

5

en la que c_x es la concentración molar de ion x (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 dicha vacuna basada en un polisacárido es una vacuna contra el *Haemophilus influenzae* b.

10 3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la fuerza iónica es menor que 20 mM.

4. Una composición según la reivindicación 3, en donde la fuerza iónica es menor que 10 mM.

5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está sustancialmente exenta de iones divalentes.

15 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un excipiente anfifílico que tiene una zona cargada y una no polar.

7. Una composición según la reivindicación 6, en donde la zona no polar es un núcleo de benceno o una cadena alifática de al menos cuatro carbonos.

8. Una composición según la reivindicación 6, en donde el excipiente anfifílico es ácido benzoico.

20 9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está sustancialmente exenta de tampones convencionales y comprende uno o más aditivos (tampones desplazados) que son capaces de intercambiar protones con la molécula biológica y tener valores de pK_a al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición.

25 10. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende especies no iónicas para ajustar la osmolaridad a un nivel requerido.

11. Una composición según la reivindicación 10, cuyas especies no iónicas se seleccionan de azúcares y alcoholes de azúcares.

12. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un agente quelante fisiológicamente aceptable.

30 13. Una composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un detergente fisiológicamente aceptable.

14. Un procedimiento para reducir la tasa de escisión hidrolítica de un resto de polisacárido a partir de una proteína portadora en una vacuna basada en un polisacárido cuyo procedimiento comprende preparar una composición acuosa que comprende dicha vacuna basada en polisacárido en donde la fuerza iónica es menor que 40 mM, calculándose dicha fuerza iónica usando la fórmula:

35

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

en la que c_x es la concentración molar de ion x (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.

40 15. Un procedimiento según la reivindicación 14 en donde dicha vacuna basada en polisacárido es la vacuna contra *Haemophilus influenzae* b.