(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 672 902**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2011 PCT/GB2011/050371**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104557**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 11705985 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2538974**

(54) Título: **Formulaciones de proteína**

(30) Prioridad:

24.02.2010 US 307528 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2018

(73) Titular/es:

ARECOR LIMITED (100.0%)
Chesterford Research Park, Little Chesterford,
Saffron Walden
CB10 1XL, GB

(72) Inventor/es:

JEZEK, JAN y
DERHAM, BARRY KINGSTON

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Formulaciones de proteína

Antecedentes de la invención

Las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales, al poseer múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas, y en consecuencia su formulación plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación debe conservar intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína mientras que al mismo tiempo protege a los múltiples grupos funcionales de la proteína de la degradación. Las rutas de degradación para las proteínas pueden implicar inestabilidad química (concretamente, cualquier proceso que implique la modificación de la proteína por formación o escisión de enlaces que dan como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (concretamente, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede ser el resultado de desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede ser el resultado de desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Muchas proteínas, por ejemplo enzimas, vacunas basadas en proteína recombinante o proteínas terapéuticas son inestables y son susceptibles de degradación estructural y la consiguiente pérdida de actividad cuando se almacenan, particularmente en disoluciones acuosas. Las velocidades de los procesos de degradación son típicamente proporcionales a la temperatura. Las proteínas en general y particularmente las formulaciones acuosas de proteínas son por lo tanto generalmente más estables a menores temperaturas.

Las consideraciones de almacenamiento de formulaciones acuosas de proteínas pueden requerir también que estén presentes conservantes en la formulación para prevenir el crecimiento bacteriano, especialmente si el producto acabado que contiene la formulación se pretende para aplicaciones terapéuticas multidosis. La mayoría de conservantes usados para prevenir el crecimiento bacteriano en formulaciones farmacéuticas que contienen proteína no son compatibles con las formulaciones de proteína. La lista de conservantes disponibles para el científico de formulación de proteínas se estrecha rápidamente a solo unos pocos compuestos. El timerosal, un compuesto organomercúrico aromático, se ha usado desde los años 30 como conservante en una serie de productos biológicos y farmacológicos, particularmente vacunas. Hoy en día, el uso de timerosal está limitado a varias vacunas y, debido a problemas de seguridad, es probable que su futuro uso esté muy limitado.

Los conservantes que se han aprobado por las autoridades reguladoras para otras aplicaciones terapéuticas multidosis incluyen compuestos tales como sales de benzalconio y alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol bencílico, parabenos tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol y m-cresol. Se prefieren generalmente fenol, m-cresol y alcohol bencílico en los productos biológicos basados en proteína multidosis comercializados actualmente.

El ácido benzoico inhibe el crecimiento de moho, levadura y algunas bacterias, y se ha usado como conservante en diversos productos alimentarios. Se ha usado también como agente antifúngico en aplicaciones tópicas. Es conocido que la eficacia del poder antimicrobiano del ácido benzoico disminuye significativamente a pH> 4,5 (http://www.nysaes.cornell.edu/necfe/pubs/pdf/Venture/venture2_chemical.html) debido a la disociación del grupo carboxilato.

En el cribado de conservantes para uso en formulaciones, es necesario determinar cuáles niveles de conservantes son eficaces en la prevención del crecimiento bacteriano en la formulación particular mientras se mantiene la integridad de la proteína, así como la integridad del conservante, en combinación con los otros excipientes en la formulación de proteína. La eficacia del conservante depende de los otros excipientes en la formulación, por ello el científico de formulación debe valorar las condiciones de las formulaciones finales en una prueba de exposición a conservante que satisfaga la prueba de eficacia antimicrobiana de la Farmacopea (USP <51>, vol. 32).

Generalmente, las proteínas no son extremadamente estables en presencia de conservantes. Los conservantes preferidos comprenden típicamente una región hidrófoba, tal como un anillo de benceno, que puede interaccionar con regiones hidrófobas de la proteína conduciendo a una desorganización de la estructura proteica.

Por lo tanto, se necesitan formulaciones acuosas de proteína que tengan una estabilidad proteica mejorada a temperatura ambiente o temperaturas menores en presencia de un conservante, particularmente un conservante aromático, tal como fenol o m-cresol.

Compendio de la invención

La invención se refiere al descubrimiento de que la adición de iones carboxilato aromáticos, tales como iones benzoato, inhibe la inestabilidad proteica causada por conservantes fenólicos. Tal inestabilidad puede manifestarse por sí misma, p.ej., mediante la generación de productos de descomposición o la generación de especies de alto peso molecular, lo que es evidencia de agregación. Por tanto, la invención se refiere a composiciones acuosas que comprenden una proteína, un conservante aromático e iones carboxilato aromáticos, tales como iones benzoato. Las proteínas permanecen estables y son adecuadas para almacenamiento a temperatura ambiente o menor, incluso en

forma acuosa. Preferiblemente, la composición acuosa comprende una proteína, un conservante fenólico e iones benzoato, en la que el pH de la composición es al menos 1 unidad mayor que el pKa del ácido benzoico. La invención proporciona también métodos de reducción de la degradación proteica por productos fenólicos en una formulación acuosa de una proteína susceptible de tal degradación fenólica, que comprenden la etapa de añadir iones carboxilato aromáticos, p.ej. iones benzoato, a la formulación, en los que la formulación se mantiene a un pH que es al menos 1 unidad mayor que el pKa del ácido benzoico.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, las formulaciones acuosas de proteína de la presente invención comprenden iones benzoato u otros iones carboxilato aromáticos y tienen estabilidad mejorada en presencia de conservantes aromáticos que son fenol, m-cresol o alcohol bencílico.

Como se usa en la presente memoria, “conservante” es un compuesto que puede añadirse a una formulación acuosa de proteína para reducir esencialmente la acción microbiana (p.ej. bacteriana). “Conservante” puede significar también una combinación de tales compuestos, p.ej. un par de tales compuestos. Los ejemplos de conservantes aromáticos potenciales incluyen alcoholes aromáticos (concretamente sustancias que contienen tanto un anillo aromático como una función alcohol, no necesariamente conectados directamente) tales como fenol, alcohol bencílico, parabenos tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, m-cresol y clorocresol, preferiblemente fenol, m-cresol y alcohol bencílico. Los “parabenos” son ésteres de ácido carboxílico del ácido 4-hidroxibenzoico. Por ejemplo, el alcohol aromático puede contener una función hidroxilo enlazada directamente con un anillo aromático. Los anillos aromáticos incluyen anillos aromáticos carbocíclicos tales como anillos de fenilo y naftilo y anillos aromáticos heterocíclicos tales como anillos heteroaromáticos de 5-10 miembros que contienen uno o más (p.ej. 1 a 3) heteroátomos seleccionados de N, O y S, especialmente N y particularmente O. Los conservantes aromáticos no deberían contener una función ácido carboxílico.

Son una subclase de conservantes de alcohol aromático los conservantes fenólicos tales como fenol o derivados de fenol (concretamente incluyen al menos un anillo fenilo con –OH enlazado). Son una segunda subclase de conservantes de alcohol aromático los alcoholes bencílicos, tales como alcohol bencílico o derivados de alcohol bencílico. La invención está basada en parte en el descubrimiento de que los conservantes aromáticos pueden causar la degradación proteica, particularmente la degradación de proteínas con superficies hidrófobas expuestas. La invención está basada además en el descubrimiento de que la adición de iones carboxilato aromáticos, tales como iones benzoato, reduce esta degradación. La estabilidad proteica se potencia u optimiza además en presencia de iones carboxilato aromáticos y especialmente iones benzoato cuando el pH de la formulación es de al menos aproximadamente 5,2, preferiblemente al menos aproximadamente 5,5, 6, 6,5 o 7. Adecuadamente, el pH es de aproximadamente 8,5 o menos, p.ej. 8,0 o menos. Por tanto, los intervalos de pH más adecuados incluyen, por ejemplo, 6 a 8,5, p.ej. 6,5 a 8,0. Se señala que el pKa del ácido benzoico es de alrededor de 4,2. Con el mantenimiento del pH a al menos aproximadamente una unidad mayor que el pKa del ácido carboxílico aromático tal como ácido benzoico, se reduce sustancialmente la degradación proteica por los conservantes fenólicos. Adecuadamente, el pH es menor de alrededor de 5, p.ej. menor de alrededor de 4 unidades de pH mayor que el pKa del ácido carboxílico aromático.

Los iones de ácido carboxílico aromático, p.ej. los iones benzoato, se añaden en una cantidad eficaz para reducir la degradación fenólica.

Como se usa en la presente memoria, la referencia a un “carboxilato aromático” particular, p.ej. “benzoato”, incluye la referencia a un ácido carboxílico aromático correspondiente, p.ej. ácido benzoico y viceversa, las especies presentes en la composición (concretamente ácido o anión) de la que se determina el pH.

Puede usarse una serie de compuestos de bajo peso molecular en lugar de benzoato. Los ejemplos de tales compuestos incluyen benzoatos sustituidos y homólogos de benzoato con grupos de puente pequeños entre el anillo aromático y el grupo carboxilato. Los benzoatos sustituidos pueden seleccionarse de compuestos portadores de uno o más sustituyentes en otras posiciones del anillo de benceno. Los homólogos de benzoato incluyen compuestos en que el grupo carboxilato está asociado (concretamente, directa o indirectamente conectado) con un sistema de anillo aromático fusionado, tal como naftaleno, como en el caso de ácido 1-naftoico y ácido 2-naftoico. Es un ejemplo adicional xinafoato (1-hidroxi-2-naftoato).

Los ácidos carboxílicos aromáticos incluyen compuestos en que la función ácido carboxílico está asociada (concretamente, conectada directamente o conectada indirectamente a través de un grupo de puente pequeño) con un anillo aromático. Los anillos aromáticos incluyen anillos aromáticos carbocíclicos tales como anillos de fenilo y naftilo y anillos aromáticos heterocíclicos tales como anillos heteroaromáticos de 5-10 miembros que contienen uno o más (p.ej. 1 a 3) heteroátomos seleccionados de N, O y S, específicamente N y O, particularmente O.

El anillo aromático más adecuado es fenilo.

Por tanto, los homólogos de benzoato pueden seleccionarse también de compuestos en que hay un grupo de puente entre el anillo aromático y el grupo carboxilato que comprende uno o dos átomos de carbono, opcionalmente sustituido con grupos funcionales que contienen oxígeno (p.ej. hidroxi) y, en el caso de un ligador de dos carbonos,

este puede ser saturado o insaturado. Tales homólogos de benzoato pueden seleccionarse, por ejemplo, de ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido 2-fenilpropanoico, ácido feniláctico y ácido cinámico. Preferiblemente, estos compuestos de bajo peso molecular se usan a un pH al que el grupo ácido carboxílico ionizable esté al menos un 90 % ionizado, concretamente a un pH al menos una unidad mayor que el pKa del grupo carboxilato del ácido carboxílico aromático.

Adecuadamente, el ácido carboxílico aromático no es un aminoácido aromático.

En ciertas realizaciones, el ácido carboxílico aromático comprende dos o más (p.ej. dos) grupos ácido carboxílico como en el ácido ftálico.

Cuando el ácido carboxílico aromático porta más de un grupo carboxilato, como se usa en la presente memoria, las referencias al pKa de dicho ácido carboxílico aromático han de leerse como referencias al menor pKa de cualquier grupo ácido carboxílico de dicho ácido carboxílico aromático.

Adecuadamente, el ácido carboxílico aromático porta un solo grupo carboxilato.

En ciertas realizaciones, se usa una mezcla de dos o más ácidos carboxílico aromáticos, por ejemplo una mezcla de ácido benzoico y ácido fenilacético.

Se da una lista de ácidos carboxílicos aromáticos ejemplares en la Tabla A siguiente:

Tabla A

COMPUESTO (como ácido)	Valor o valores de pKa del grupo o grupos carboxilato
Acido benzoico	4,17
Ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico)	2,98
Ácido 3-hidroxibenzoico	4,08
Ácido 4-hidroxibenzoico	4,58
Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico)	4,41
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vainíllico)	4,5
Ácido ftálico (1,2)	2,98 5,28
Ácido isoftálico (1,3)	3,46 4,46
Ácido tereftálico (1,4)	3,46 4,46
Ácido 1-naftoico	3,70
Ácido 2-naftoico	4,17
Ácido indol-3-acético	4,75
Ácido fenilacético	4,28
Ácido 3-fenilpropiónico	4,66
Ácido trans-cinámico	4,44
Ácido cis-cinámico	3,89
Ácido mandélico	3,85

La cantidad de ácido carboxílico aromático presente en la formulación acuosa de proteína puede variar, y puede estar a una concentración molar que es menor, mayor o aproximadamente la misma que la del conservante aromático. En el caso de un compuesto individual, la cantidad presente puede determinarse por su solubilidad máxima en el medio acuoso a la temperatura y pH de almacenamiento deseados.

La concentración molar de los iones carboxilato aromáticos, por ejemplo iones benzoato, puede ser de al menos

aproximadamente 1 mM, p.ej. en el intervalo de 1-500 mM, preferiblemente 1-200 mM, más preferiblemente 5-100 mM o 5-50 mM, tal como una concentración molar 5 mM, 10 mM o 20 mM.

De forma similar, la cantidad de conservante aromático presente en las formulaciones acuosas de proteína puede variar. La concentración molar del conservante aromático, por ejemplo fenol, puede estar en el intervalo de 5-100 mM, preferiblemente 10-60 mM, más preferiblemente 20-40 mM, tal como concentraciones molares de 20 mM o 30 mM. Un especialista en la materia puede determinar la cantidad de conservante requerida en una formulación particular basándose en el resultado clínico de una prueba de exposición a conservante que satisfaga la prueba de eficacia antimicrobiana de la Farmacopea (USP <51>, Vol. 32).

La invención es aplicable a cualquier proteína (como se describe a continuación) usada en terapia humana o animal que requiera una administración multidosis y la presencia de un conservante aromático. La concentración de proteína en las composiciones para uso terapéutico o profiláctico varía dentro de un amplio intervalo de concentración, desde aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, dependiendo de la indicación y la naturaleza del producto terapéutico. Además, la administración subcutánea multidosis de las proteínas terapéuticas puede requerir concentraciones mayores de 100 mg/ml, tales como 150 mg/ml, 200 mg/ml o 300 mg/ml. La presente invención es aplicable dentro del intervalo completo de concentraciones de proteína entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 300 mg/ml.

EL término “proteína” se usa en la presente memoria para incluir moléculas o complejos moleculares que tienen una secuencia aminoacídica de suficiente longitud de cadena para producir una estructura secundaria, e incluye cadenas polipeptídicas sencillas o complejos proteicos que comprenden dos o más polipéptidos. El término “proteína” pretende englobar moléculas que comprenden opcionalmente restos no aminoacídicos ligados covalentemente, tales como péptidos glicosilados, lipoproteínas, proteínas pegiladas o conjugadas. Se incluyen en el término “proteína” metaloproteínas que tienen una estructura tridimensional particular y una actividad biológica de interés, en que actividad y/o estructura son dependientes de la retención de un ión metálico particular en un sitio de unión en la proteína. El metal puede unirse directamente a las cadenas laterales aminoacídicas de la proteína o puede ser parte de un componente químico más complejo que se une a la estructura proteica. Se incluyen también en el término “proteína” los sistemas supramoleculares basados en proteína, definidos como sistemas compuestos por un número discreto de subunidades o componentes moleculares ensamblados. Los ejemplos de tales sistemas supramoleculares incluyen multímeros proteicos, partículas de tipo virus y virus inactivados o atenuados.

Las proteínas usadas en la invención reivindicada son preferiblemente aquellas pretendidas para aplicaciones multidosis, tales como en viales multidosis, plumas de inyección, bombas y otros dispositivos. El conservante es un componente esencial en tales aplicaciones.

Las proteínas usadas en la invención reivindicada tienen preferiblemente una región atractora de fenol. Tales proteínas pueden identificarse o caracterizarse por una superficie hidrófoba o un dominio o región accesible.

Los ejemplos de proteínas usadas en la invención reivindicada incluyen: hormonas y factores de crecimiento proteicos o peptídicos tales como: insulina, glucagón, hormona de crecimiento humana, gonadotropina, hormona estimulante de tiroides humana, factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona paratiroidea, calcitonina y eritropoyetina y también somatropina; enzimas terapéuticas tales como estreptocinasa, asparaginasa y urato oxidasa y vacunas, incluyendo vacunas proteicas recombinantes.

La invención puede emplearse también para mejorar la estabilidad del contenido proteico de vacunas, generalmente tales como vacunas de virus inactivados o atenuados o de célula entera, tales como vacunas para hepatitis B, Haemophilus influenza, difteria, malaria, papiloma humano, meningitis A, meningitis C, Pertussis y polio. Las vacunas ejemplares adicionales incluyen aquellas para hepatitis A, cólera, neumonía y fiebre tifoidea.

Los ejemplos de otras proteínas usadas en la invención reivindicada incluyen anticuerpos terapéuticos, inmunoglobulinas, proteínas de fusión, interferones incluyendo interferón alfa, interferón beta e interferón gamma, factores de coagulación sanguínea tales como factor VIII y factor IX y factor VIIa y péptidos antimicrobianos tales como caspofungina.

La invención es también aplicable a enzimas tales como uricasa y peroxidasa de rábano picante en composiciones para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

Se entenderá que, aunque los ejemplos anteriores representan los tipos preferidos de proteínas usadas en la invención reivindicada, la invención es aplicable a cualquier proteína o sistema que contiene proteína formulado en presencia de un conservante, particularmente cualquiera de tales proteínas con tendencia o que muestre signos de desestabilización en presencia de conservantes. Tales signos de desestabilización pueden ser evidentes, por ejemplo, por la pérdida de actividad proteica después de incubación de la formulación que contiene conservante, respecto a una formulación de control que no contiene el conservante.

La proteína está presente a la concentración pretendida para conseguir su efecto terapéutico u otra función esencial. Preferiblemente, la composición según todos los aspectos de la presente invención comprende un tensioactivo farmacológicamente aceptable tal como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, poloxámero

188 o poloxámero 407.

Preferiblemente, la osmolaridad de la composición según todos los aspectos de la presente invención está entre 150-500 mOsm/l, más preferiblemente entre 220-380 mOsm/l, lo más preferiblemente alrededor de 300 mOsm/l.

Preferiblemente, la composición según todos los aspectos de la presente invención es estéril, consiguiéndose la esterilidad por filtración de la composición antes del relleno final en un envase apropiado, tal como un vial o jeringuilla prellenada, en condiciones estériles, usando un filtro o membrana apropiado, tal como un filtro de 0,22 µm.

Las composiciones según la presente invención pueden contener otros componentes, tales como un agente quelante para complejar metales o un inhibidor de proteasa para asegurar que la proteína no se digiere lentamente por la actividad proteasa presente en la muestra. Otro aditivo que puede usarse es un polialcohol, p.ej. a una concentración de al menos un 0,5 %, y típicamente hasta un 5 % (p/p). Son ejemplos de tales compuestos sacáridos tales como sacarosa o trehalosa o alcoholes de azúcar tales como inositol, lactitol, manitol o xilitol. Los ejemplos adicionales de polialcoholes incluyen 1,2-propanodiol, glicerol, sorbitol y rafinosa. Son polialcoholes preferidos 1,2-propanodiol y manitol.

La invención es aplicable a proteínas disueltas libremente en disoluciones acuosas o formas de gel acuosas o a proteínas presentes en un sistema acuoso como una dispersión o suspensión, así como a proteínas enlazadas con sustratos sólidos tales como coadyuvante de vacuna o membrana celular mediante interacciones hidrófobas, iónicas o de intercambio de ligando. La invención es también aplicable a proteínas en estado sólido donde se ha retirado el agua parcial o totalmente de una disolución acuosa por secado o liofilización o secado por pulverización donde sigue presente agua libre o unida.

Por tanto, según la invención, se proporciona un método que comprende retirar parcial o totalmente el agua de una disolución acuosa según la invención; se proporciona también el producto de tal método.

Una formulación “estable” es aquella en que la proteína en la misma retiene sustancialmente su estabilidad e integridad física y química tras almacenamiento. “Estabilidad mejorada” como se usa en la presente memoria significa que una formulación de proteína es más estable en presencia de un conservante y los iones benzoato aromáticos en comparación con la misma formulación de proteína en presencia del conservante solo en las mismas condiciones de prueba.

Están disponibles en la materia diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica (véanse, por ejemplo, Herron J.N., Jiskoot W. y Crommelin J.A. (Eds.) Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins. Plenum Press, Nueva York/Londres, 1995). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada y durante un periodo de tiempo seleccionado. Aunque la estabilidad al almacenamiento a 2-8 y 25 ºC es típicamente de importancia práctica, puede usarse el almacenamiento en condiciones de estrés acelerado, tal como a 40 o 60 ºC, para valorar la estabilidad de la proteína. Las formulaciones de la invención tienen estabilidad mejorada tras almacenamiento a temperaturas que oscilan de la temperatura de refrigeración a la temperatura ambiente durante al menos 1 mes, preferiblemente durante al menos 13 semanas. En una realización preferida de la misma, tales formulaciones tienen estabilidad mejorada tras almacenamiento a temperaturas entre 2 y 8 ºC durante varios meses, p.ej. durante 3 meses, preferiblemente durante al menos 12 meses, lo más preferiblemente durante al menos18 meses. En una realización preferida de la misma, tales formulaciones tienen estabilidad mejorada a temperaturas entre 15 y 25 ºC durante al menos 13 semanas. En otra realización preferida, la composición es estable al almacenamiento a 25 ºC durante un mínimo de 18 semanas. En otra realización, la composición es estable al almacenamiento a 5 ºC durante un mínimo de 26 semanas y preferiblemente al menos 52 semanas.

Como se discute anteriormente, los iones benzoato, el estabilizante preferido según la presente invención, se usan preferiblemente a un pH mayor de aproximadamente 5,2. Pueden usarse tampones, particularmente tampones de desplazamiento, para controlar y mantener el pH. Los tampones de desplazamiento se describen, por ejemplo, en el documento W02008084327A2. En una realización particularmente preferida, se selecciona un sistema de tampón de desplazamiento que comprende benzoato y un segundo tampón. El segundo tampón se selecciona preferiblemente del grupo consistente en TRIS, glicina, arginina y metionina.

En un sistema de tampón de desplazamiento, se prefiere típicamente evitar usar una especie ionizable que tenga un pKa a una 1 unidad de pH del pH seleccionado. Tales tampones de desplazamiento están adecuadamente presentes a una cantidad tal que la molaridad de cada tampón sea al menos 1 mM y/o menor de 1 M, preferiblemente de 2 mM a 200 mM, lo más preferiblemente de 5 mM a 100 mM. En una realización, están preferiblemente presentes uno o más tampones de desplazamiento a una concentración de 1 mM a aproximadamente 1 M; más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM, e incluso más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM.

Por tanto, en una realización, la composición proteica de la invención comprende dos tampones de desplazamiento que comprenden al menos un tampón de desplazamiento que tiene un pKa que es al menos 1 unidad mayor que el pH de la composición a la temperatura deseada, y al menos un tampón de desplazamiento (preferiblemente benzoato) que tiene un pKa que es al menos 1 unidad menor que el pH de la composición a la temperatura deseada.

En una realización, la composición proteica de la invención comprende dos tampones de desplazamiento que comprenden al menos un tampón de desplazamiento que tiene un pKa que es al menos 1,5 unidades mayor que el pH de la composición a la temperatura deseada, y al menos un tampón de desplazamiento que tiene un pKa que es al menos 1,5 unidades menor que el pH de la composición a la temperatura deseada. En una realización, la composición proteica de la invención comprende dos tampones de desplazamiento que comprenden al menos un tampón de desplazamiento que tiene un pKa que es al menos 2 unidades mayor que el pH de la composición a la temperatura deseada, y al menos un tampón de desplazamiento que tiene un pKa que es al menos 2 unidades menor que el pH de la composición de la temperatura deseada. Con fines de claridad, cuando un tampón de desplazamiento posee una pluralidad de pKa, el pH de la solución no está a 1, 1,5 o 2, según sea el caso, de cada pKa.

Aparte de la contribución al tamponamiento del pH, se mostró en muchos casos que la presencia de tampones de desplazamiento tiene un efecto beneficioso sobre la estabilidad proteica. Por ejemplo, en una realización, la actividad proteica de una proteína en una composición de acuerdo con la invención retiene al menos un 40 % de su actividad durante al menos una semana, y preferiblemente al menos cuatro semanas, a una temperatura deseada (p.ej., temperatura ambiente o mayor). En otra realización, la actividad proteica de una proteína en una composición de acuerdo con la invención retiene al menos un 50 % de su actividad durante al menos una semana a la temperatura deseada, y preferiblemente al menos cuatro semanas a una temperatura deseada (p.ej., temperatura ambiente o mayor). En otra realización, se retiene al menos un 40 % y preferiblemente al menos un 50 % de la actividad estructural proteica de una proteína presente en una composición según la invención durante al menos una semana, y más preferiblemente durante al menos 4 semanas a la temperatura deseada.

De acuerdo con la presente invención, la composición proteica preferiblemente no comprende un tampón convencional en una cantidad significativa. En otras palabras, la composición proteica contiene menos de una cantidad significativa de tampón convencional. Los tampones convencionales se aplican típicamente a composiciones proteicas a concentraciones de 2-200 mM, más típicamente a 5-50 mM y lo más típicamente a una concentración aproximadamente 20 mM. El término “tampón convencional” se define por lo tanto en la presente memoria como cualquier especie química con un pKa separado menos de una unidad, pero preferiblemente menos de 0,5 unidades, del pH de la composición medido en el intervalo de temperatura de almacenamiento pretendido de la composición que posee capacidad de tamponación de la proteína. El término “menos de una cantidad significativa” significa que el tampón convencional está presente en la composición a una concentración menor de 5 mM, pero preferiblemente menor de 2 mM.

La invención es aplicable a la estabilización de una proteína a lo largo de su vida de producto, incluyendo aislamiento o expresión, purificación, transporte y almacenamiento.

Aspectos adicionales de la invención incluyen:

- el uso de iones carboxilato aromáticos para aumentar la estabilidad de una composición acuosa que comprende una proteína y un conservante aromático que es fenol, m-cresol o alcohol bencílico, y

- un método de aumentar la estabilidad de una composición acuosa que comprende una proteína y un conservante aromático que es fenol, m-cresol o alcohol bencílico, que comprende añadir a la composición iones carboxilato aromáticos.

EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1: Efecto del ión benzoato sobre la velocidad de agregación en composiciones acuosas de hormona de crecimiento humana (hGH) a 40 ºC en presencia de fenol como conservante.

Se siguió la formación de especie de alto peso molecular (HMWS) en disoluciones acuosas de hGH (15 mg/ml) usando el siguiente método de HPLC de exclusión por tamaño: Se preparó la fase móvil mezclando 97 partes (v/v) de fosfato de sodio 63 mM (pH 7,0) con 3 partes (v/v) de propan-2-ol. Se filtró la fase móvil antes de su uso. Se equipó el cromatógrafo líquido (Agilent 1100 series) con un detector de 214 nm, columna de protección y una columna BioSep SEC-S2000 de 7,8 x 300 mm. Se mantuvo el caudal a 0,6 ml/min. Se inyectaron15 µl de muestras acuosas de hGH. Se expresó el porcentaje de HMWS como la relación del área total de todos los picos con tiempo de elución más corto que la forma monomérica de hGH frente al área de pico total, ignorando los picos correspondientes a los excipientes. Se incubaron las disoluciones de hGH a 40 ºC y se valoró la presencia de HMWS en puntos temporales específicos. Además, se valoraron en las muestras visualmente los signos de precipitación visibles. Se estudió el efecto del anión benzoato (en la forma de benzoato de potasio) sobre la velocidad de agregación en dos disoluciones de fondo diferentes:

Disolución de fondo 1: histidina (10 mM), manitol (264 mM), poloxámero 188 (3 mg/ml), fenol (30 mM), pH 6,1.

Disolución de fondo 2: lactato (100 mM), TRIS (20 mM), poloxámero 188 (3 mg/ml), fenol (30 mM), pH 6,1.

Se muestra la velocidad de formación de HMWS a 40 ºC en la Tabla 1. Se mostró que la presencia de anión benzoato 10 mM daba como resultado una menor velocidad de formación de HMWS tanto en la disolución de fondo

1 como en la disolución de fondo 2.

Tabla 1. Efecto de los componentes de formulación sobre la velocidad de formación de especies de alto peso molecular (HMWS) en composiciones acuosas de hGH después de incubación a 40 ºC.

Parámetros/componentes de formulación		HMWS (%)		
Disolución de fondo	Benzoato (mM)	T0	40 ºC (4 semanas)	40 ºC (9 semanas)
Disolución de fondo 1	0	1,3	9,0	22,5
Disolución de fondo 1	10	1,2	6,5	17,5
Disolución de fondo 2	0	1,2	6,1	15,0
Disolución de fondo 2	10	1,4	4,7	10,8

Ejemplo 2: Efecto de los carboxilatos aromáticos y otros compuestos sobre la estabilidad de uricasa a 60 ºC en presencia de conservantes fenol y m-cresol.

Se obtuvo uricasa de Sigma (U0880). Se formuló la enzima a 100 µg/ml. Se practicaron las medidas de actividad enzimática en una placa de 96 pocillos usando un ensayo óptico: se mezclaron 10 µl de la formulación con 100 µl de disolución diluyente de enzima (tampón borato 25 mM, pH 8,5) y 50 µl de sustrato (urato de sodio 2 mM). Se equilibró la mezcla a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min Después de 5 min, se añadieron los siguientes reactivos en este orden particular a cada muestra (el primer reactivo debe añadirse exactamente a los 5 min, el momento de adición de los otros reactivos es menos crucial): 50 µl de tampón citrato/fosfato (0,5 M, pH 4,0); 15 µ de TMB (3 mg/ml, disuelto en DMSO) y entonces 15 µl de lactoperoxidasa (1 mg/ml, disuelta en agua). Se mezcló concienzudamente la disolución resultante y se leyó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas. Se calibró la densidad óptica usando un intervalo de concentraciones de una disolución enzimática de referencia. Se llevaron a cabo todas las medidas por triplicado y se registró el valor medio. Se encontró en los experimentos preliminares que la estabilidad de la enzima era óptima a un pH de alrededor de 8,0, con un mínimo efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad. Se estudió la conservación de la actividad enzimática en una formulación de fondo que contenía histidina 10 mM y 1,2-propanodiol 300 mM, ajustada a pH 8. Con la excepción de las muestras de control, las disoluciones enzimáticas contenían fenol (30 mM) o alcohol bencílico (30 mM) como conservante. Se estudió el efecto de los excipientes estabilizantes comparando la estabilidad de uricasa en la disolución que contiene el conservante solo con la disolución que contiene tanto conservante como componente estabilizador. Se seleccionó la concentración de los aditivos ensayados basándose en su solubilidad en disoluciones acuosas.

Se mostró (Tabla 2) que la presencia de conservantes (fenol o alcohol bencílico) daba como resultado el deterioro de la estabilidad de uricasa a 60 ºC. Mientras que se observaba un 78,9 % de la actividad original de la enzima después de incubación a 60 ºC durante 6 horas en ausencia de conservantes, la recuperación de actividad era del 55,6 % en presencia de fenol y de 57,5 % en presencia de alcohol bencílico. La presencia de un carboxilato aromático como excipiente adicional en las composiciones que contienen conservante daba como resultado la reducción del efecto desestabilizante de los conservantes. En contraposición, la presencia de un carboxilato carbocíclico no aromático (iones de ácido ciclohexanocarboxílico) causaba un aumento del efecto desestabilizante.

Tabla 2. Efecto de los componentes de formulación sobre la estabilidad de uricasa a 60 ºC en una composición de fondo consistente en histidina (10 mM) y 1,2-propanpdiol (300 mM), pH 8,0. La estabilidad se expresa como porcentaje de la actividad medida después de incubación a 60 ºC durante 6 horas con respecto a la actividad medida en una muestra recién preparada.

Muestra (con respecto a la presencia de un conservante y aditivos adicionales)	**Conservante**	
	Actividad de recuperación	
	Fenol (30 mM)	Alcohol bencílico (30 mM)
Sin conservante, sin aditivo	78,9 %	78,9 %
Conservante, sin aditivo	55,6 %	57,7%
Aditivos probados (todos en presencia de conservante)		

Ácido ciclohexanocarboxílico (20 mM)	28,5 %	41,9 %
Ácido mandélico (20 mM)	68,6 %	85,8 %
Ácido ftálico (10 mM)	67,8 %	75,8 %
Ácido trans-cinámico (5 mM)	58,5 %	69,0 %
Ácido fenilacético (5 mM)	57,7 %	66,6 %
Ácido benzoico (20 mM)	67,2 %	79,3 %

Ejemplo 3: Efecto de los carboxilatos aromáticos sobre la estabilidad de peroxidasa de rábano picante (HRP) a 60 ºC en presencia de un conservante

Se obtuvo HRP de Sigma (P8250). Se formuló la enzima a 0,5 mg/ml. Se practicaron medidas de la actividad enzimática en una placa de 96 pocillos usando un ensayo óptico: se mezclaron 20 µl de la formulación con 180 µl de disolución de diluyente enzimático (ABTS 1,82 mM, peróxido de hidrógeno 28 mM en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0). Se mezcló la disolución resultante concienzudamente y se leyó la absorbancia a 630 nm usando un lector de placas después de 5 min. Se calibró la densidad óptica usando un intervalo de concentraciones de una disolución enzimática de referencia. Se llevaron a cabo todas las medidas por triplicado y se registró el valor medio. Se encontró que la estabilidad de la enzima en los experimentos preliminares era óptima a un pH de alrededor de 7,0 y relativamente independiente de la fuerza iónica. Se estudió la conservación de la actividad enzimática en formulaciones de fondo que contenían TRIS 10 mM y 1,2-propanodiol (300 mM) a pH 7,0. Con la excepción de las disoluciones de control, las disoluciones contenían m-cresol (30 mM). Se estudió el efecto de los excipientes estabilizantes comparando la estabilidad de HRP en la disolución que contiene el conservante solo con la de la disolución que contiene tanto el conservante como el componente estabilizante. Se seleccionó la concentración de los aditivos ensayados basándose en su solubilidad en disoluciones acuosas.

Se mostró (Tabla 3) que la presencia de un conservante seleccionado (m-cresol) daba como resultado un ligero deterioro de la estabilidad de HRP A 60 ºC. Mientras que se observaba un 90,2 % de la actividad original de la enzima después de incubación a 60 ºC durante 6 horas en ausencia de conservante, la recuperación de actividad era de un 79,5 % en presencia de m-cresol. La presencia de un carboxilato aromático como excipiente adicional en las composiciones que contienen conservante daba como resultado la reducción del efecto desestabilizante de los conservantes.

Tabla 3. Efecto de los componentes de formulación sobre la estabilidad de HRP a 60 ºC en una composición de fondo consistente en TRIS (10 mM) y 1,2-propanodiol (300 mM), pH 7,0. La estabilidad se expresa como porcentaje de actividad medido después de incubación a 60 ºC durante 6 horas con respecto a la actividad medida en una muestra recién preparada.

Muestra (con respecto a la presencia de m-cresol como conservante y aditivos adicionales)	**m-cresol como conservante**
	Recuperación de actividad
Sin conservante, sin aditivo	90,2 %
Conservante, sin aditivo	79,5 %
Aditivos ensayados (todos en presencia de conservante)	
Ácido fenilacético (5 mM)	97,0 %
Ácido benzoico (20 mM)	99,3 %

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende una proteína, un conservante aromático e iones carboxilato aromáticos, en la que el conservante aromático es fenol, m-cresol o alcohol bencílico.

2. Una composición de la reivindicación 1, en la que los iones carboxilato aromáticos se seleccionan de iones benzoato, benzoatos sustituidos y homólogos de benzoato con grupos de puente pequeños entre el anillo aromático y el grupo carboxilato.

3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el pH de la composición es al menos una unidad mayor que el pKa del grupo carboxilato del carboxilato aromático.

4. Una composición de la reivindicación 1, en la que los iones carboxilato aromático son iones benzoato y en la que preferiblemente los iones benzoato derivan de ácido benzoico ionizado al menos al 90 %.

5. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en la que el pH de la composición es de al menos aproximadamente 5,2, por ejemplo al menos aproximadamente 5,5, preferiblemente al menos aproximadamente 6,0 y/o la composición comprende además un tampón seleccionado del grupo consistente en TRIS, glicina, arginina y metionina.

6. Una composición según cualquier reivindicación anterior, en la que la concentración molar de iones carboxilato aromáticos es de al menos 1 mM, por ejemplo de 5 a 50 mM.

7. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína es una proteína terapéutica para aplicación multidosis; y/o la proteína selecciona del grupo consistente en hormonas peptídicas y factores de crecimiento, enzimas terapéuticas, interferones de vacunas y factores sanguíneos; y/o la composición comprende uno o más agentes estabilizantes de proteína, tales como inhibidores de proteasa, agentes quelantes, azúcares o detergentes.

8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la proteína es el contenido de proteína de una vacuna que contiene un virus inactivado o atenuado o una vacuna de célula entera.

9. Una composición según cualquier reivindicación precedente, para uso en terapia o diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

10. Un envase sellado que contiene una composición según cualquier reivindicación precedente.

11. Un método de reducción de la degradación proteica por conservantes fenólicos en una formulación acuosa que comprende un conservante fenólico y una proteína susceptible de degradación fenólica, que comprende la etapa de añadir iones carboxilato aromáticos a la formulación, en el que la formulación se mantiene a un pH al menos 1 unidad mayor que el pKa del correspondiente ácido carboxílico aromático, en el que el conservante es fenol, m-cresol o alcohol bencílico.

12. Un método según la reivindicación 11, en el que los iones carboxilato aromáticos son iones benzoato y el pH es de al menos aproximadamente 5,2; y/o se retiene al menos un 50 % de actividad proteica durante al menos una semana a una temperatura deseada, preferiblemente durante al menos cuatro semanas a una temperatura deseada.

13. Uso de iones carboxilato aromáticos para aumentar la estabilidad de una composición acuosa que comprende una proteína y un conservante aromático, en el que el conservante aromático es fenol, m-cresol o alcohol bencílico.

14. Un método para aumentar la estabilidad de una composición acuosa que comprende una proteína y un conservante aromático, que comprende añadir a la composición iones carboxilato aromáticos, por ejemplo iones benzoato, en el que el conservante aromático es fenol, m-cresol o alcohol bencílico; y en el que preferiblemente el pH de la composición acuosa es de al menos aproximadamente 5,2 y/o aproximadamente 8,5 o menos.