

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 963**

51 Int. Cl.:

A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08700170 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2114456**

54 Título: **Estabilización de composiciones acuosas de proteínas con tampones de desplazamiento**

30 Prioridad:

11.01.2007 GB 0700523
31.05.2007 US 941125 P

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

16.06.2015

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

Observaciones :

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

ES 2 537 963 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

Estabilización de composiciones acuosas de proteínas con tampones de desplazamiento

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la estabilidad de proteínas, particularmente a la estabilidad de proteínas en sistemas acuosos, por ejemplo en disolución acuosa o en forma de gel acuoso.

Antecedentes de la invención

10 Muchas proteínas, por ejemplo, las enzimas, anticuerpos o proteínas terapéuticas son inestables, y son susceptibles de una degradación estructural y consiguiente pérdida de actividad mientras se almacenan, particularmente en disoluciones acuosas. Los procesos implicados en la degradación de las proteínas pueden dividirse en físicos (es decir, procesos que afectan a las interacciones no covalentes, tales como pérdida de estructura cuaternaria, terciaria o secundaria, agregación, adsorción superficial) y químicos (es decir, procesos que implican un cambio covalente tales como desamidación, oxidación, intercambio de disulfuro, etc.). Las velocidades de los procesos de degradación son proporcionales a la temperatura. Las proteínas son por lo tanto generalmente más estables a temperaturas más bajas.

15 En general, las proteínas son más estables en ausencia de agua. Las proteínas más comerciales se formulan por lo tanto como polvos liofilizados. Una formulación de proteína comercial liofilizada típica comprende siempre un tampón, tal como tampón de fosfato, y uno o más aditivos. Los aditivos pueden incluir uno o más de los siguientes:

- Agentes de carga: Típicamente azúcares o alditoles, tales como sorbitol o manitol.
- Estabilizantes: típicamente azúcares de reemplazo de agua, tales como trehalosa o sacarosa, que pueden
20 proteger la estructura de la proteína durante la liofilización.
- Modificadores de la tonicidad: Típicamente sales inorgánicas y aminoácidos (comúnmente glicina o arginina). Estos excipientes se usan para ajustar la fuerza iónica. La fuerza iónica es a menudo un parámetro importante de la formulación de la proteína tanto durante el procedimiento de liofilización como en la aplicación específica de la proteína después de la reconstitución.
- Tensioactivos: Pueden ser eficaces para impedir la adsorción de las proteínas sobre superficies sólidas, agregación inducida por agitación y daño durante la liofilización.

30 Se conocen algunas proteínas que se formulan en disoluciones. Históricamente, esto reduce considerablemente el coste de producción a expensas de una baja estabilidad. Las disoluciones acuosas de proteínas se formulan a menudo en una etapa temprana de desarrollo de un producto de proteína, durante la cual las exigencias de estabilidad no son tan estrictas como las del producto final. Típicamente, las disoluciones acuosas de proteínas tienen que almacenarse estrictamente a 4°C. En la mayor parte de los casos, la degradación estructural y pérdida de actividad se producen incluso a esta temperatura durante un periodo de almacenamiento. La estabilidad de formulaciones acuosas puede mejorarse mediante congelación, pero en algunos casos el ciclo de congelación-descongelación puede contribuir al daño de la proteína.

35 Una disolución acuosa de proteína típica se formula en un tampón convencional, lo más comúnmente en tampón de fosfato de pH 6,8 - 7,3, aunque también se usan otros tampones, tales como HEPES, TRIS, carbonato o citrato. Las formulaciones pueden comprender también uno o más de los siguientes aditivos:

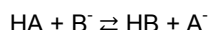
- Modificadores de la tonicidad: típicamente sales inorgánicas y aminoácidos (comúnmente glicina o arginina). Estos excipientes se usan para ajustar la fuerza iónica, un parámetro importante de la formulación de la
40 proteína.
- Tensioactivos: pueden ser eficaces para impedir la adsorción de las proteínas sobre superficies sólidas o la agregación inducida por agitación.
- Estabilizantes: típicamente azúcares de reemplazo de agua, tales como trehalosa o sacarosa.

45 Estos son conocidos por afectar el punto de fusión de las proteínas y pueden por lo tanto mejorar la estabilidad de las proteínas.

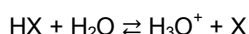
50 Como se ha mostrado anteriormente, la naturaleza de los aditivos en formulaciones comerciales de proteínas puede variar. Sin embargo, la característica común de las formulaciones comerciales de proteínas tanto en formato seco como acuoso es la presencia de un tampón. Se necesita un tampón para mantener el pH de la formulación cercano a un valor dado. Muchas proteínas comerciales se formulan en tampón de fosfato a un pH cercano a 7. En algunos casos, pueden usarse otros tampones y otros pH. Formular a un pH separado de 7 está determinado típicamente

por la necesidad de aumentar la solubilidad de las proteínas, lo que puede lograrse a un pH separado del punto isoeléctrico de la proteína.

La elección del tampón para formular proteínas sigue las reglas bien definidas de los equilibrios ácido-base y la teoría de ácido-base de Brønsted-Lowry. Los equilibrios ácido-base se refieren al intercambio de protones (H^+); a los que también se hace referencia como cationes de hidrógeno) entre dos especies químicas. Mientras que se hace referencia a la especie que dona el protón como el ácido, se hace referencia a la especie que acepta el protón como la base. Así, en el siguiente proceso reversible,



HA actúa como ácido y B^- actúa como base. En el sentido opuesto HB actúa como ácido y A^- actúa como base. La capacidad de un compuesto para donar o aceptar protones se expresa mediante la constante de disociación K_a , que describe el equilibrio entre la forma protonada y desprotonada de un compuesto en disolución acuosa, como sigue:



$$K_{eq} = \frac{[H_3O^+][X^-]}{[HX][H_2O]}$$

Ya que $[H_2O] = \text{constante} = 55,5 \text{ M}$ entonces:

$$K_a = K_{eq}[H_2O] = \frac{[H_3O^+][X^-]}{[HX]}$$

$$pK_a = -\log K_a$$

El pK_a de cualquier especie es función de la temperatura. Mientras que en muchos casos, tales como con fosfato, citrato o acetato, la dependencia de la temperatura es pequeña, algunos tampones (tales como TRIS/HCl) muestran un cambio de pK_a tanto como 0,03 unidades por $^{\circ}C$.

El grado de protonación de una especie química con un valor de pK_a dado depende del pH de la disolución. Si $pH = pK_a$ de la especie en cuestión, entonces 50% de la especie existe en forma protonada y el restante 50% en forma desprotonada. Si el pH es una unidad inferior al pK_a entonces 90% de la especie existe en forma protonada y 10% en forma desprotonada. De manera similar, si el pH es una unidad superior al pK_a entonces 10% de la especie existe en forma protonada y 90% en forma desprotonada. Aunque el tanto por ciento de las formas protonada y desprotonada de un compuesto permanece constante mientras que el pH y la temperatura son constantes, esto es resultado de un equilibrio dinámico entre el compuesto y las moléculas que lo rodean. En otras palabras, hay un intercambio dinámico continuo de protones entre las especies ácido-base en un sistema, mientras que el estado total de protonación de cada especie en la disolución se mantiene constante.

Donando o aceptando protones en el intervalo de pH en torno a su pK_a , la especie actúa como tampón. La presencia de un tampón da como resultado de este modo en pequeños cambios de pH si un ácido o una base se añade a la disolución. La especie ejerce una capacidad máxima de tamponamiento a $pH = pK_a$, y su capacidad para mantener el pH desciende según el pH se aleja del pK_a .

La elección del tampón apropiado depende generalmente del pH que se necesita. La regla generalmente aceptada es que el pK_a del tampón no debe separarse más de una unidad del pH que se necesita para actuar como un tampón eficaz. Preferiblemente, sin embargo, el pK_a está dentro de un intervalo de 0,5 unidades separado del pH que se necesita, para aumentar al máximo la capacidad de tamponamiento de la especie. Lo más preferiblemente, el pK_a del tampón es igual al pH que se necesita de la disolución. En este caso, la proporción de la forma protonada y la forma desprotonada del tampón son 50% respectivamente, y su capacidad de tamponamiento se utiliza en toda su extensión. Tal disolución es entonces la más eficazmente protegida frente a los cambios de pH, tanto en el sentido ácido como en el alcalino.

El documento de patente EP 1314437 describe una composición acuosa que comprende un anticuerpo e histidina, a pH 7,1. Esta composición se dice que es estable con respecto a la agregación. La descripción posterior sugiere que, para usarse, debe añadirse un tampón.

El documento de patente PCT/GB2006/002470 describe un sistema acuoso que comprende una proteína y uno o más agentes estabilizantes. Los agentes estabilizantes tienen grupos ionizables, capaces de intercambiar protones con la proteína y con el producto ionizado de la disociación del agua. 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. El pH de la composición está dentro de un intervalo de estabilidad de proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH; alternativamente, el pH de la composición es no superior a 0,5 unidades más o menos que el pH al que la composición tiene una estabilidad máxima con respecto al pH. La descripción está basada en la observación que, aunque existe invariablemente un intervalo de valores de pH para los que una composición es relativamente estable, la presencia de ciertos excipientes es deseable. Se declara que puede añadirse un tampón.

El documento de patente EP 884053 describe una formulación de insulina monomérica estabilizada frente a la agregación, en la que el agente tamponante es TRIS o arginina.

El documento de patente US 4476118 describe una disolución de insulina con una estabilidad mejorada que contiene iones de cinc.

- 5 Sin embargo, existe una necesidad de mejorar la estabilidad de disoluciones acuosas de proteínas.

Sumario de la invención

10 La presente invención está basada en el descubrimiento de que los tampones con un pK_a al, o cerca del, pH de la disolución son indeseables, cuando se considera la estabilidad de la proteína con respecto al pH. Más bien, la clave de la presente invención es la elección del pH apropiado mientras que se reduce al mínimo la capacidad de la proteína para intercambiar iones. Diversos aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones.

15 La invención se refiere a un recipiente hermético que comprende una composición acuosa que comprende una proteína y dos tampones de desplazamiento, en la que un tampón de desplazamiento tiene un pK_a que es al menos 1 unidad mayor que el pH de la composición, y un tampón de desplazamiento tiene un pK_a que es al menos 1 unidad inferior al pH de la composición, fijándose dicho pH de la composición a un valor al que la composición tiene una estabilidad máxima medible con respecto al pH, en la que uno de los tampones es TRIS, con la condición de que dicha composición contenga no más de 2 mM de un tampón convencional con un pK_a que esté dentro de una unidad de pH del pH de la composición, y en la que cada tampón de desplazamiento esté presente a una concentración de 2 a 200 mM.

20 Manteniendo una proteína a un pH adecuado, al valor o cerca del valor al que la estabilidad medible es máxima, en la ausencia de un tampón convencional, la estabilidad durante el almacenamiento de la proteína puede aumentar sustancialmente. La estabilidad durante el almacenamiento puede mejorarse adicionalmente de manera general, posiblemente de manera sustancial, mediante el uso de aditivos con valores de pK_a que estén de 1 a 5 unidades separados del pH de la composición en el intervalo de temperaturas previsto de almacenamiento de la composición. La presencia de estos aditivos también mejora la estabilidad al pH de la formulación, y es generalmente preferida.

25 De acuerdo con la presente invención, la composición de proteína no comprende un tampón convencional en una cantidad significativa. En otras palabras, la composición de proteína contiene menos que una cantidad significativa del tampón convencional. Los tampones convencionales se aplican típicamente en composiciones de proteínas a concentraciones de 2-200 mM, más típicamente a una concentración de 5 - 50 mM y lo más típicamente a una concentración de aproximadamente 20 mM. La expresión "tampón convencional" se define por lo tanto en la presente memoria como cualquier especie química con un pK_a separado menos de una unidad, pero preferiblemente menos de 0,5 unidades del pH de la composición, medido en el intervalo de temperaturas previsto de almacenamiento de la composición, que posee una capacidad de tamponamiento para la proteína. La expresión "menos que una cantidad significativa" significa que el tampón convencional está presente en la composición a una concentración inferior a 2 mM.

35 La composición contiene dos aditivos capaces de incluirse en equilibrios ácido-base con valores de pK_a al menos 1 unidad por debajo del pH de la composición, y con valores de pK_a al menos 1 unidad por encima del pH de la composición. Como se usa en la presente memoria, también se hace referencia a una o más unidades por encima o por debajo del pH de la composición en la presente memoria como 1 o más unidades "separadas" del pH de la composición. Tales aditivos pueden proteger la composición de desplazamientos significativos de pH hacia valores ácidos (si el pK_a es inferior al pH de la composición) y hacia valores alcalinos (si el pK_a es superior al pH de la composición).

40 Tales aditivos están adecuadamente presentes en una cantidad tal que la molaridad de cada aditivo es de 2 mM a 200 mM, lo más preferiblemente de 5 mM a 100 mM. En una realización, dos aditivos están presentes a una concentración de 2 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente a una concentración desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 100 mM.

45 Aparte de los aditivos capaces de intercambiar protones con dicha proteína, la composición puede contener otros excipientes para satisfacer los requisitos para el uso previsto de la formulación. Los ejemplos de tales excipientes incluyen sales inorgánicas para ajustar la fuerza iónica, tensioactivos para reducir al mínimo la adsorción superficial de las proteínas, conservantes para mantener la composición en condición estéril, un agente quelante para formar complejos con metales o un inhibidor de la proteasa para asegurar que la proteína no sea digerida lentamente por la actividad de proteasa presente en la muestra. Otro aditivo que puede usarse es un polialcohol, por ejemplo, a una concentración de al menos 0,5%, y típicamente hasta 5% (p/p). Los ejemplos de tales compuestos son sacáridos tales como sacarosa o trehalosa, o alditoles tales como inositol, lactitol, manitol o xilitol.

55 La proteína que está estabilizada de acuerdo con la invención, puede estar en forma microbiológicamente estéril, y está contenida o almacenada de manera práctica en un recipiente estéril hermético tal como un vial, jeringa o cápsula, y almacenada a una temperatura deseada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra las concentraciones relativas de las especies tamponantes de un tampón convencional (A) y tampones desplazados (B1 y B2) en un sistema hipotético para tamponar una composición a pH 7. $pK_a(A) = 7$, $pK_a(B1) = 5$, $pK_a(B2) = 9$. Las líneas de puntos muestran la concentración relativa de las formas desprotonadas de los tampones (es decir, la forma capaz de impedir cambios de pH a valores ácidos); las líneas completas muestran la concentración relativa de las formas protonadas de los tampones (es decir, la forma capaz de impedir cambios de pH a valores alcalinos).

La figura 2 es una curva de valoración de la composición que comprende o un tampón convencional a 20 mM (pK_a 7) o dos tampones de desplazamiento, (pK_a 5 y pK_a 9), ambos a una concentración de 20 mM. La valoración ácida se expresa como adición negativa de aniones de hidróxido.

La figura 3 es una curva de valoración de la composición que comprende o un tampón convencional a 20 mM (pK_a 7) o dos tampones de desplazamiento, (pK_a 5 y pK_a 9), ambos a una concentración de 100 mM.

Descripción detallada de la invención

Se apreciará que esta invención se refiere a la estabilidad de proteínas, particularmente a la estabilidad de proteínas en un entorno acuoso, por ejemplo, en una disolución acuosa o en forma de gel acuoso, y concierne a la estabilidad durante el almacenamiento de las proteínas, por ejemplo, la estabilidad con el tiempo, que incluye la estabilidad a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) y superior.

La expresión "proteína" se usa en la presente memoria para incluir 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. La expresión "polipéptido" está prevista para incluir polipéptidos que comprenden restos que no son aminoácidos unidos de manera covalente, tales como polipéptidos glucosilados, lipoproteínas, etc. En particular, la invención se refiere a moléculas con una o más actividades biológicas de interés, actividad o actividades que dependen de manera crítica de la retención de una estructura tridimensional particular o natural en al menos una parte crítica de la molécula o complejo molecular.

La presente invención permite que se hagan mejoras en la estabilidad durante el almacenamiento de proteínas, seleccionando un pH apropiado de la composición sin el uso de un tampón convencional. La expresión "tampón convencional" se usa en la presente memoria para incluir cualquier compuesto que posea una capacidad de tamponamiento cuando está presente en la composición con un pK_a separado menos de una unidad del pH, pero preferiblemente separado menos de 0,5 unidades, lo más preferiblemente con $pK_a = pH$. Tanto los valores de pK_a como de pH usados en esta definición son los medidos en el intervalo de temperaturas del almacenamiento previsto de la composición de proteína.

Los tampones convencionales están típicamente presentes en composiciones de proteínas a concentraciones de 2-200 mM, más típicamente a una concentración de 5 - 50 mM y lo más típicamente a una concentración de aproximadamente 20 mM. Tales concentraciones de tampones convencionales pueden asegurar una estabilidad razonable de pH, y se puede hacer referencia a ellas por lo tanto como concentraciones significativas con respecto a su acción tamponante. Por lo tanto, aparte de la especificación anterior en términos de su pK_a , la expresión "tampón convencional" comprende adicionalmente un aspecto de "concentración significativa" caracterizado porque dicho tampón convencional está presente a una concentración que es significativa con respecto a una acción tamponante razonable. En otras palabras, una concentración significativa de un tampón convencional es la concentración en la que el tampón convencional proporciona el mecanismo de tamponamiento predominante del sistema.

La presente invención surgió de un análisis de los efectos de especies químicas capaces de intercambiar protones en la estabilidad de las proteínas, y el desarrollo posterior de un modelo que permite la selección de condiciones que aseguran una buena estabilidad a largo plazo de proteínas. El análisis reveló que la presencia de especies ácido-base que están cerca de 50% de estado de protonación es perjudicial para la estabilidad de las proteínas, como se determina por análisis funcionales o análisis estructurales. Por definición, esto significa que la presencia de tampones convencionales, especialmente a altas concentraciones, puede ser perjudicial para la estabilidad de la proteína. Parece que, antes de la presente invención, el efecto adverso de los tampones convencionales sobre la estabilidad durante el almacenamiento de las proteínas no se había apreciado.

Algo de capacidad de tamponamiento limitada puede derivarse de la misma proteína, especialmente en el intervalo de pH de 4,0 a 6,5, debido a las cadenas laterales de ácido aspártico, ácido glutámico e histidina. En algunos casos, especialmente a mayores concentraciones de proteínas (> 20 mg/ml) esto podría ser suficiente para mantener el pH que se necesita, especialmente en una composición estéril en la que los cambios espontáneos de pH son improbables. De acuerdo con la invención, puede usarse uno o más excipientes o aditivos para mantener el pH que se necesita o reducir al mínimo los cambios de pH. A esto se puede hacer referencia como "tamponamiento desplazado", y está basado en la adición de excipientes a la composición de proteína con valores de pK_a fuera del intervalo convencional de tamponamiento, preferiblemente excipientes con pK_a aproximadamente de 1 a 4 unidades por encima o por debajo del pH de la composición. Aunque el "tamponamiento desplazado" no puede asegurar una

fuerte capacidad tamponante al pH que se necesita, comparable con el tampón convencional, puede impedir todavía fluctuaciones significativas de pH lejos del valor que se necesita. La diferencia entre tamponamiento convencional y tamponamiento desplazado se muestra en la figura 1. La gráfica muestra las concentraciones relativas de las especies tamponantes de un tampón convencional (A) y tampones desplazados (B1 y B2) en un sistema hipotético tamponado a pH 7. La líneas de puntos muestran la concentración relativa de las formas desprotonadas de los tampones (es decir, la forma capaz de impedir cambios de pH a valores ácidos); las líneas completas muestran la concentración relativa de las formas protonadas de los tampones (es decir, la forma capaz de impedir cambios de pH a valores alcalinos). La concentración de las especies tamponantes sobre el lado tanto ácido como alcalino refleja la capacidad tamponante del tampón. El tampón convencional (en este caso un compuesto con $pK_a = 7$) es lo más eficaz para mantener el pH 7 que se necesita. Los dos tampones de desplazamiento (en este caso compuestos con pK_a dos unidades por encima y dos unidades por debajo del pH que se necesita) ejercen una capacidad de tamponamiento mínima a pH 7, pero su capacidad de tamponamiento aumenta según el pH se aleja de 7. Así, aunque estas especies son bastante ineficaces en impedir pequeñas influencias en torno al pH que se necesita, pueden impedir fluctuaciones mayores lejos del pH que se necesita. La capacidad de los tampones de desplazamiento para mantener el pH separado de sus valores de pK_a respectivos aumenta con su concentración, como se muestra en la figura 1.

La curva de valoración de la composición valorada con una base (OH^-) o un ácido (H_3O^+) se muestra en la figura 2. En este modelo de ejemplo el pH objetivo es 7, y se muestra la valoración de una composición que comprende 20 mM de un tampón convencional (pK_a 7) y una combinación de dos tampones desplazados (pK_a 5 y pK_a 9), cada uno a una concentración de 20 mM. Las curvas de valoración son teóricas, basadas en los valores de pK_a y concentraciones de las especies presentes, y en la asunción que ningún otro componente de la composición contribuye al tamponamiento de la composición.

Debido a una capacidad tamponante limitada de los tampones desplazados en el pH objetivo, la pendiente de la curva de valoración en el pH objetivo (es decir, 7 en este modelo de ejemplo) en la composición que contiene el tampón convencional es considerablemente menos inclinada cuando se compara con la que contiene la combinación de tampones desplazados. Por lo tanto, la adición de la misma cantidad de NaOH provocará un cambio de pH diferente en presencia de tampón convencional cuando se compara con la de en presencia de tampones de desplazamiento de la misma concentración. Así, en el modelo de ejemplo que se muestra en la figura 2 (en la que el pK_a del tampón convencional es precisamente el mismo que el pH 7 objetivo), la adición de NaOH 5 mM (es decir, la adición de NaOH a la composición, lo que da como resultado un aumento de concentración de 5 mM de cationes de Na^+ en la composición) aumentará el pH de 7,0 a 7,48 en presencia de tampón convencional (20 mM) y a 8,55 en presencia de tampones de desplazamiento (ambos a 20 mM).

Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la eficacia de tamponamiento del tampón desplazado en el pH objetivo puede aumentarse aumentando la concentración de los tampones desplazados. Esto se ilustra en la figura 3 para un tampón convencional de 20 mM y una combinación de tampones desplazados (pK_a 5 y pK_a 9), cada uno a una concentración de 100 mM (compárese con la figura 2, en la que se ilustra la misma situación para tampones desplazados de 20 mM). De manera similar, la eficacia de tamponamiento del tampón convencional es proporcional a la concentración del tampón.

La eficacia de tamponamiento depende de la pendiente de la curva de valoración en el pH objetivo. Cuanto menor sea la pendiente se logra una mejor eficacia de tamponamiento. La pendiente de las curvas de valoración en los modelos de ejemplo anteriores en el pH objetivo (es decir, pH 7) es aproximadamente como sigue:

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 0,017 \text{ mM}^{-1} \text{ en el caso de tampón convencional (100 mM)}$$

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 0,087 \text{ mM}^{-1}$$

en el caso de tampones convencionales (20 mM)

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 0,349 \text{ mM}^{-1} \text{ en el caso de tampón convencional (5 mM)}$$

45

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 0,222 \text{ mM}^{-1} \text{ en el caso de tampones de desplazamiento (cada uno a 100 mM)}$$

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 1,111 \text{ mM}^{-1} \text{ en el caso de tampones de desplazamiento (cada uno a 20 mM)}$$

$$\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} = 4,369 \text{ mM}^{-1} \text{ en el caso de tampones de desplazamiento (cada uno a 5 mM)}$$

Así, aunque en general la eficacia de tamponamiento de los tampones desplazados es considerablemente inferior en el caso de tampones de desplazamiento comparada con la de los tampones convencionales, puede compensarse aumentando la concentración de los tampones desplazados. Por ejemplo, la eficacia de tamponamiento de los tampones desplazados (pKa 5 y 9) a concentraciones de 100 mM, da como resultado una mejor eficacia de tamponamiento cuando se compara con la que se logra mediante un tampón convencional (pKa 7) a una concentración de 5 mM.

Una realización de la presente invención incluye una composición de proteína que está "tamponada esencialmente" por el tampón de desplazamiento. Esto significa que la pendiente de la curva de valoración

$$\left(\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} \right)$$

en el pH de almacenamiento de la composición producida por todos los grupos ionizables de la composición con pKa separado al menos una unidad del pH de la composición es sustancialmente inferior a la de la producida por todos los grupos ionizables de la composición con pKa separado menos de una unidad del pH de la composición. Esto significa que el tampón de desplazamiento contribuye sustancialmente más al tamponamiento de pH de la composición que el tampón convencional. La pendiente de la curva de valoración

$$\left(\frac{d\text{pH}}{d[\text{OH}^-]} \right)$$

en el pH de almacenamiento de la composición producida por todos los grupos ionizables de la composición con pKa separado al menos una unidad del pH de la composición debe ser al menos dos veces inferior, preferiblemente 5 veces inferior, lo más preferiblemente 10 veces inferior, a la de la producida por todos los grupos ionizables de la composición con pKa separado menos de una unidad del pH de la composición.

Un experto en la técnica será capaz de determinar la pendiente de las curvas de valoración teóricamente basándose en las concentraciones de todos los grupos ionizables en la composición y en sus pKa. Alternativamente, la pendiente de las curvas de valoración puede confirmarse experimentalmente midiendo la curva de valoración en dos composiciones en las que los compuestos con grupos ionizables con pKa separados menos de una unidad y más de una unidad del pH de la composición están separados.

En una realización, la composición de proteína del recipiente hermético de la invención comprende dos tampones de desplazamiento que comprenden al menos un tampón de desplazamiento con 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 con un pKa que es al menos 1,5 unidades inferior al pH de la composición a la temperatura deseada. En una realización, la composición de proteína del recipiente hermético de la invención comprende dos tampones de desplazamiento que comprenden al menos un tampón de desplazamiento con 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 con un pKa que es al menos 2 unidades inferior al pH de la composición a la temperatura deseada.

En una realización, la composición de proteína del recipiente hermético de la invención comprende dos tampones de desplazamiento en los que cada tampón de desplazamiento tiene un pKa desde aproximadamente 1 unidad hasta aproximadamente 5 unidades del pH al que la proteína tiene estabilidad a la temperatura deseada. En una realización, la composición de proteína del recipiente hermético de la invención comprende dos tampones de desplazamiento en los que cada tampón de desplazamiento tiene un pKa desde aproximadamente 1 unidad hasta aproximadamente 4 unidades del pH al que la proteína tiene estabilidad a la temperatura deseada. Aparte de la contribución al tamponamiento de pH, la presencia de tampones de desplazamiento mostró en muchos casos tener un efecto beneficioso en la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, en una realización, la actividad proteínica de una proteína en una composición de acuerdo con la invención retiene al menos 40% de su actividad durante al menos una semana, y preferiblemente al menos cuatro semanas a la temperatura deseada (por ejemplo, temperatura ambiente o superior). En otra realización, la actividad proteínica de una proteína en una composición de acuerdo con el recipiente hermético de la invención retiene al menos 50% de su actividad durante al menos una semana a la temperatura deseada, y preferiblemente al menos cuatro semanas a una temperatura deseada (por ejemplo, temperatura ambiente o superior). En otra realización, al menos 40% y preferiblemente al menos 50% de la actividad estructural proteínica de una proteína presente en una composición conforme al recipiente hermético de la

invención, se retiene durante al menos una semana y más preferiblemente durante al menos 4 semanas a la temperatura deseada.

Los compuestos que pueden usarse como tampones de desplazamiento pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos. Pueden ser de naturaleza tanto monomérica como polimérica.

- 5 Algunos ejemplos de compuestos que pueden incorporarse de manera útil en la composición de proteína como aditivos, y que pueden funcionar posiblemente también como tampones de desplazamiento son conocidos, e incluyen, pero no están limitados a: histidina, maleato, sulfito, ciclamato, hidrógenosulfato, serina, arginina, lisina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato, glioxilato, aspartato, glucuronato, aspartato, glutamato, tartrato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, galato, citosina, ácido p-aminobenzoico, sorbato, acetato, propionato, alginato, urato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, bicarbonato, bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2, iminodiacético, ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanosulfónico, piperazina, N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, 2-amino-2-metil-1-propanol, palmitato, creatina, creatinina, y sus sales.

- 20 La elección particular del compuesto dependerá del pH de la composición. Así, por ejemplo, la purina ($pK_a = 9,0$) es un aditivo adecuado en una composición a pH 7,0 (en la que $pK_a - pH = 2,0$), pero no en una composición a pH 8,8 (en la que $pK_a - pH = 0,2$ y la purina por lo tanto se convierte en el tampón convencional). Se entenderá por supuesto por una persona de habilidad normal en la técnica que han de tomarse en cuenta aspectos específicos a proteínas particulares. Por ejemplo, es importante asegurar que los aditivos seleccionados no inhiban la actividad de las proteínas. Muchos de los aditivos sugeridos son productos generalmente reconocidos como seguros "GRAS, por sus siglas en inglés Generally Regarded As Safe" o ingredientes aprobados en productos farmacéuticos. Estos aditivos son particularmente adecuados para la estabilización de proteínas en composiciones farmacéuticas. Otras aplicaciones en las que la seguridad no es una gran preocupación, tales como proteínas en kits de diagnóstico, pueden contar con compuestos que estén fuera de la categoría GRAS.

- 30 En una realización, la invención incluye un recipiente hermético que contiene una composición acuosa que comprende una proteína y dos tampones de desplazamiento con un pK_a al menos 1 unidad más o 1 unidad menos que el pH de la composición en la que tal composición está tamponada esencialmente por el uno o más tampones de desplazamiento. Una composición está "tamponada esencialmente" por uno o más tampones de desplazamiento cuando tales tampones de desplazamiento están presentes en una concentración que proporciona el mecanismo de tamponamiento predominante del sistema.

- 35 Además de permitir la presencia de ciertos materiales que afectan el pH, la composición puede incluir componentes distintos a los de los tampones de desplazamiento o aditivos. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir sales inorgánicas, por ejemplo, para ajustar la fuerza iónica de la composición, un azúcar o alditol, un conservante, un inhibidor de la proteasa, un agente quelante, un detergente iónico o un detergente no iónico. La diferencia entre el pH de la composición y el pK_a del "tampón de desplazamiento" usado en esta invención es de al menos 1 unidad, preferiblemente de al menos 1,5, por ejemplo de al menos 2 y hasta 5 o más.

- 40 Ha de entenderse que puede usarse un tampón convencional, es decir, un tampón que no cumpla con la definición de un tampón de desplazamiento, mientras que el tampón de desplazamiento proporcione el mecanismo de tamponamiento predominante del sistema, es decir, al menos 50%, pero preferiblemente al menos 80%, de la capacidad de tamponamiento del sistema.

- 45 Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que el efecto beneficioso de la presente invención sobre la estabilidad de las proteínas es debido al hecho de que en el estado de protonación de 50%, o en torno al estado de protonación de 50%, lo más probable es que las especies ácido-base intercambien protones con las especies ácido-base que las rodean, tales como algunos aminoácidos en la superficie de la proteína. Tales intercambios pueden ser perjudiciales para la proteína por las siguientes razones:

- Cada intercambio de protones da como resultado la formación de enlaces o la rotura de enlaces. Tales procesos están acompañados por intercambios de energía (por ejemplo, energía de translación de las especies implicadas) entre la proteína y las especies que la rodean, y por cambios en las características de carga de la parte de la proteína en la que se intercambia el protón. Por lo tanto, los intercambios continuos de protones que se producen cuando la proteína está en equilibrio con su entorno acuoso es muy probable que contribuyan a las fluctuaciones de la estructura de la proteína y posterior inestabilidad física de la proteína.

- Diversos procesos químicos que afectan la estabilidad de la proteína, tales como desamidación, implican intercambio de protones. Reducir al mínimo la velocidad de estos procesos puede por lo tanto conducir a la estabilización de la proteína.

La invención es aplicable a proteínas que se disuelven fácilmente en disoluciones acuosas o formas de gel acuoso, o a proteínas presentes en un sistema acuoso como dispersión o suspensión, así como a proteínas unidas a sustratos sólidos tales como adyuvante de vacunas o membrana celular, por medio de interacciones hidrófobas, iónicas o de intercambio de ligando.

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

En términos de estructura secundaria, la invención es aplicable a proteínas que contengan cualquier proporción de hélice alfa, lámina beta y enroscamientos aleatorios.

- 10 En términos de estructura terciaria, la invención es aplicable tanto a proteínas globulares como a proteínas fibrosas. La invención es aplicable a proteínas cuya estructura terciaria se mantiene solamente por medio de interacciones no covalentes, así como a proteínas cuya estructura terciaria se mantiene por combinación de interacciones no covalentes y uno o más puentes de disulfuro.

En términos de estructura cuaternaria, la invención es aplicable a proteínas monoméricas así como a proteínas que consisten en dos, tres, cuatro o más subunidades. La invención se aplica también a conjugados de proteínas.

- 15 En términos de componentes estructurales no proteínicos, la invención es aplicable a proteínas que no contengan ningún componente no peptídico, así como a glucoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, metaloproteínas y otras proteínas que contengan complejos en los que la proteína represente al menos 10% de la masa total. Es aplicable a proteínas que no necesiten un cofactor para su función, así como a proteínas que necesiten una coenzima, grupo prostético o un activador para su función.

- 20 La proteína puede ser natural o recombinada, glucosilada o no glucosilada, autolítica o no autolítica. La invención es particularmente aplicable a los siguientes grupos de proteínas.

Hormonas proteicas o peptídicas y factores de crecimiento

- 25 La función de las hormonas proteicas o peptídicas y los factores de crecimiento depende de su habilidad para unirse a un receptor específico. Tal unión está ligada estrechamente a la conformación de la proteína. La retención de la estructura tridimensional de la proteína, o al menos la estructura 3D de dominios clave, es por lo tanto crucial para su función. La retención de las características estructurales y funcionales también es de una importancia primordial para la aprobación regulatoria de las terapias con proteínas. Los ejemplos de hormonas proteicas o peptídicas para terapia incluyen:

insulina (tratamiento de la diabetes)

- 30 glucagón (tratamiento de la diabetes)

hormona de crecimiento humana

gonadotropina

hormona de estimulación tiroidea humana (tratamiento de cáncer de tiroides)

factor de estimulación de colonias de granulocitos (usado como parte de la quimioterapia)

- 35 **Enzimas terapéuticas**

La función de las enzimas terapéuticas depende directamente de su estructura y conformación moleculares. Cambios conformacionales irreversibles y una agregación irreversible conducen a la desactivación de las enzimas terapéuticas. La retención de las características estructurales de la proteína también es un prerrequisito esencial de la aprobación regulatoria. Los ejemplos de hormonas proteicas o peptídicas para terapia incluyen:

- 40 estreptocinasa (agente trombolítico en el tratamiento de accidente cerebrovascular isquémico)

asparraginasa

urato-oxidasa

papaína (desbridamiento de tejidos).

Vacunas

- 45 La actividad inmunógena de las vacunas de proteínas depende (en gran medida) de la integridad estructural de los antígenos de proteínas clave, especialmente en relación con los epítopos conformacionales (en los que se necesitan anticuerpos para unir regiones dispares de la cadena polipeptídica reunidas mediante plegamiento natural). Los cambios conformacionales irreversibles y la agregación irreversible conducen a la inactivación de las vacunas. Las

5 mismas consideraciones se aplican a las proteínas adsorbidas sobre partículas, tales como partículas de alúmina, u otras superficies (no en forma de partículas), cuando regiones sustanciales de cada molécula de proteína están todavía en plena interacción con el agua de disolvente. Esto es de particular importancia en la distribución de vacunas en el tercer mundo, en el que el mantenimiento de la cadena de frío es muy difícil o imposible, parcialmente debido a limitaciones prácticas o logísticas y parcialmente debido al coste. La presente invención puede aplicarse a vacunas de proteínas recombinadas así como a virus atenuados o vacunas enteras, proporcionando los antígenos clave que consisten en cadenas polipeptídicas. Los ejemplos de tales vacunas incluyen:

vacuna contra la hepatitis B

vacuna antipalúdica

10 vacuna contra el virus del papiloma humano

vacuna contra la meningitis A

vacuna contra la meningitis C

vacuna antitosferínica

vacuna antipoliomielítica

15 **Anticuerpos terapéuticos**

La función de los anticuerpos terapéuticos está basada en sus interacciones específicas con antígenos objetivo. Así, para mantener su función, la retención de la estructura tridimensional es esencial para la duración de su periodo de validez. Aunque son generalmente muy estables a temperatura ambiente, debido a la estructura estable y rígida del plegamiento o dominio de la inmunoglobulina, los anticuerpos pueden beneficiarse de la presente invención, aumentando más su estabilidad durante el almacenamiento. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, incluyen:

20 anticuerpo monoclonal anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

anticuerpo monoclonal anti-HER2 (tratamiento del cáncer de mama)

anticuerpo monoclonal anti-CD52 (tratamiento de la leucemia linfocítica crónica)

25 anticuerpo monoclonal anti-CD20 (tratamiento de linfoma agresivo)

Interferones

Los Interferones son polipéptidos bastante inestables de importancia terapéutica, que se usan, por ejemplo, en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La aplicación de la presente invención puede aumentar el periodo de validez y la eficacia del coste de los interferones, que incluyen interferón alfa, interferón beta e interferón gamma.

30 **Otras proteínas terapéuticas**

Lo que sigue son ejemplos de otras proteínas terapéuticas que se pueden beneficiar de la aplicación de la presente invención, en términos de eficacia de coste y un periodo de validez mejorado, particularmente en disolución acuosa:

eritropoyetina (que estimula la producción de eritrocitos)

darbepoyetina alfa (que estimula la producción de eritrocitos)

35 factores de coagulación, principalmente factor VIII y factor IX (tratamiento y control de la hemofilia)

agentes inmunosupresores (tratamiento de varias enfermedades, tales como asma, rinitis alérgica o esclerosis múltiple)

albúmina humana

proteína C (agente antitrombótico)

40 **Proteínas diagnósticas e industriales**

La retención de las características estructurales es crucial para la función de proteínas diagnósticas, particularmente enzimas y anticuerpos. En particular, los patrones de referencia de los kits de los análisis, a través de los que se calibran los análisis y se someten control de calidad (QC), deben estabilizarse rigurosamente, ya que cualquier cambio en su integridad provocará un cambio resultante en la exactitud de todo el kit. Una disminución en la actividad puede conducir a falsos resultados o malas prestaciones (por ejemplo, un transcurso lento del

45

procedimiento). La estabilidad de la actividad funcional de las proteínas diagnósticas a lo largo de la vida del producto es por lo tanto de primordial importancia. Los fabricantes de productos diagnósticos están muy interesados en encontrar soluciones y formulaciones que eliminarían una costosa liofilización, lo que provoca cuellos de botella sustanciales en la elaboración. Ejemplos de proteínas diagnósticas incluyen:

- 5 anticuerpos monoclonales
 anticuerpos policlonales
 conjugados de anticuerpo-enzima
 oxidasas tales como glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa, colesterol-oxidasa
 peroxidasas
- 10 fosfatasa alcalina
 deshidrogenasas tales como glutamato-deshidrogenasa, glucosa-deshidrogenasa
 isomerasas tales como invertasa
 hidrolasas tales como tripsina o quimotripsina
- 15 patrones de referencia para análisis integrales suministrados en forma de kit, tales como hormonas, factores de crecimiento, proteínas microbianas, formas solubles de proteínas estructurales, etc.
 Los ejemplos de proteínas industriales incluyen:
 amilasa
 proteasa
 lipasa
- 20 **Patrones de referencia internacionales de proteínas terapéuticas, vacunas y diagnósticas**
 Los patrones de referencia de proteínas terapéuticas o diagnósticas son de gran importancia para la estandarización de procedimientos terapéuticos y diagnósticos. La estabilidad de los patrones de referencia es de una importancia fundamental. Un amplio intervalo de patrones de referencia basados en proteínas son por lo tanto un objetivo ideal para la presente invención.
- 25 En una realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa de proteína en la que la proteína tiene un pH de 6 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende al menos un tampón de desplazamiento con un pKa que es 7 o superior, y preferiblemente tal tampón de desplazamiento se selecciona de TRIS, purina y citosina. En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa de proteína en la que la proteína tiene un pH de 6 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende al menos
- 30 un tampón de desplazamiento con un pKa que es 5 o inferior, y preferiblemente tal tampón de desplazamiento es lactato.
 En una realización de esta descripción se proporciona una composición acuosa de proteína que es una vacuna contra la hepatitis B, preferiblemente en la que el pH de la proteína que comprende la vacuna contra la hepatitis B es 5 a la temperatura deseada, y preferiblemente en la que al menos un factor de desplazamiento tiene un pKa que es
- 35 6 o superior, o al menos un tampón de desplazamiento tiene un pKa de 4 o inferior, o cualquier combinación de tales tampones de desplazamiento está presente en la composición, en la que el uno o más tampones de desplazamiento se seleccionan preferiblemente de TRIS e histidina.
 En una realización de esta descripción, la composición acuosa de proteína comprende glucosa-oxidasa con un pH de 5 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende además un tampón de desplazamiento con un pKa que es 6 o superior, en la que tal tampón de desplazamiento incluye, pero no está limitado a, TRIS. En otra
- 40 realización de esta descripción, la composición acuosa de proteína comprende glucosa-oxidasa con un pH de 5 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende además un tampón de desplazamiento con un pKa que es 4 o inferior, en la que tal tampón de desplazamiento incluye, pero no está limitado a, lactato.
 En una realización de esta descripción, la composición acuosa de proteína comprende catalasa con un pH de 6,7 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende además un tampón de desplazamiento con un pKa que es 7,7 o superior, en la que tal tampón de desplazamiento incluye, pero no está limitado a TRIS y lisina. En otra realización de esta descripción, la composición acuosa de proteína comprende catalasa con un pH de 6,7 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende además un tampón de desplazamiento con un pKa que es 5,7 o inferior, en la que tal tampón de desplazamiento incluye, pero no está limitado a, lactato y lisina.
- 45

En otra realización de esta descripción, la composición acuosa de proteína comprende uricasa con un pH de 8,6 a la temperatura deseada, y la composición de proteína comprende además un tampón de desplazamiento con un pKa que es 7,3 o inferior, en la que tal tampón de desplazamiento incluye, pero no está limitado a succinato, glicina y citosina.

5 En una realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y uno o más tampones de desplazamiento, en la que cada tampón de desplazamiento tiene un pKa que es al menos 1 unidad superior o inferior al pH de la composición, y más preferiblemente al menos 2 unidades superior o inferior al pH de la composición, con la condición de que dicha composición esté libre sustancialmente de un tampón convencional con un pKa del pH de la composición, en la que la composición comprende preferiblemente menos de
10 aproximadamente 1 mM de tampón convencional, y en la que la composición puede comprender además excipientes adicionales adecuados para estabilizar la proteína y la composición, que incluyen pero no están limitados a, agentes estabilizantes, inhibidores de la proteasa, agentes quelantes, conservantes, azúcares y detergentes.

15 En una realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa con un pH de aproximadamente 5, que comprende glucosa-oxidasa y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en TRIS y lactato. En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa con un pH de aproximadamente 6,7, que comprende catalasa y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en TRIS, lisina y lactato. En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa con un pH de aproximadamente 8,3, que comprende uricasa y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en succinato, lisina y lactato. En
20 otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa con un pH de aproximadamente 5, que comprende antígeno de la hepatitis B y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en TRIS, histidina y lactato. En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa con un pH de aproximadamente 6, que comprende hormona de crecimiento humana y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en TRIS, citosina, purina y lactato.

25 En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 4 y 5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en histidina, maleato, sulfito, ciclamato, hidrógenosulfato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato o sus sales.

30 En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 4 y 5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en maleato, sulfito, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, bicarbonato, histidina, bis(2-hidroxi
35 etil)iminotris(hidroxi metil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2, iminodiacético, ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanosulfónico, piperazina, N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxi etil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxi etil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico) o sus sales.

40 En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 4,5 y 5,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en histidina, maleato, sulfito, ciclamato, hidrógenosulfato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato o sus sales.

45 En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 4,5 y 5,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en sulfito, aspartamo, bis(2-hidroxi etil)iminotris(hidroxi metil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2, iminodiacético, ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanosulfónico, piperazina, N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxi etil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxi etil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroxi metil)aminometano, N, tris(hidroxi metil)glicina, ácido N-tris(hidroxi metil)metil-3-aminopropanosulfónico o sus sales.
50

En una realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa, ajustándose la composición a un pH entre 4,5 y 5,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, que comprende:

55 a. una proteína seleccionada del grupo que consiste en interferón beta, factor de estimulación de colonias de granulocitos, antígeno de la hepatitis B, vacunas contra la hepatitis A y C, o sus precursores o derivados,

b. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en sulfito, aspartamo, bis(2-hidroxi etil)iminotris(hidroxi metil)metano, ácido N-(2-acetamido)-2, iminodiacético, ácido 2-[(2-amino-2-

oxoetil)amino]etanosulfónico, piperazina, N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico o sus sales; y

- 5 c. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en histidina, maleato, sulfito, ciclamato, hidrógenosulfato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato o sus sales

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 5 y 6, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, purina, lisina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico o sus sales.

10

En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 5 y 6, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en sulfito, arginina, purina, asparragina, treonina, aspartamo, fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico acid, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico o sus sales.

15

20

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa, ajustándose la composición a un pH entre 5 y 6, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, que comprende:

- a. una proteína seleccionada del grupo que consiste en hirudina, iduronidasa o sus precursores o derivados;
- 25 b. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, purina, lisina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, gentisato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico o sus sales; y
- c. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en sulfito, arginina, purina, asparragina, treonina, aspartamo, fosfato, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2, aminoetanosulfónico, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico o sus sales.
- 30

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 5,5 y 6,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, glutamato, gentisato, tartrato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, galato, citosina o sus sales.

35

En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 5,5 y 6,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en serina, arginina, lisina, purina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, triptófano, aspartamo, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ión amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina o sus sales.

40

En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa, ajustándose la composición a un pH entre 5,5 y 6,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, que comprende:

45

- a. una proteína seleccionada del grupo que consiste en galactosidasa, glucocerebrosidasa, aprotinina, colagenasa, hormona de crecimiento humana, desoxirribonucleasa I, antagonista del receptor de interleucina-1, interferón alfa, anticuerpos monoclonales tales como IgG anti-EGFR, IgG que se une a TNF (factor de necrosis tumoral), anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-VRS (virus respiratorio sincitial) vacuna contra la tos ferina acelular, vacuna contra la difteria, vacuna contra el VPH (virus del papiloma humano), vacuna contra la tuberculosis o sus precursores o derivados;
- 50
- b. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aspartato, glutamato, gentisato, tartrato, salicilato, glioxilato, aspartamo, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, galato, citosina o sus sales; y
- 55

c. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en serina, arginina, lisina, purina, asparragina, metionina, treonina, tirosina, triptófano, aspartato, ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxiethyl)amino]-2, hidroxipropanosulfónico, trietanolamina, piperazina-N,N'-bis(ácido 2, hidroxipropanosulfónico), tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina o sus sales.

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 6 y 7, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, glutamato, tartrato, salicilato, fumarato, glioxilato, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, galato, citosina, ácido p-aminobenzoico, sorbato, acetato, propionato, alginato o sus sales.

En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 6 y 7, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, glutamato, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, adenina, ácido p-aminobenzoico, tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, palmitato o sus sales.

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa, ajustándose la composición a un pH entre 6 y 7, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, que comprende:

a. una proteína seleccionada del grupo que consiste en un receptor de TNF, darbepoyetina alfa, inhibidor de alfa-1-antitripsina, péptido natriurético, proteína C, hormona folículoestimulante, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, proteínas morfógenas óseas, factor de crecimiento de los queratinocitos, interleucina-2, interferón gamma, vacuna antirrábica, vacuna antirrotavírica, vacuna antitetánica o sus precursores o derivados;

b. al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en aspartato, glutamato, tartrato, salicilato, fumarato, glioxilato, glucuronato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, galato, citosina, ácido p-aminobenzoico, sorbato, acetato, propionato, alginato o sus sales; y

c. en la que al menos un aditivo se selecciona del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, glutamato, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, adenina, ácido p-aminobenzoico, tris(hidroximetil)aminometano, N, tris(hidroximetil)glicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, palmitato o sus sales.

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 6,5 y 7,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, glutamato, tartrato, fumarato, malato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, glutarato, galato, citosina, ácido p-aminobenzoico, sorbate, acetato, propionato, alginato, urato o sus sales.

En otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa que comprende una proteína y al menos un aditivo, ajustándose la composición a un pH entre 6,5 y 7,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, en la que al menos se selecciona un aditivo del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, glutamato, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, adenina, ácido p-aminobenzoico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, palmitato, creatinina o sus sales.

En aún otra realización de esta descripción, se proporciona una composición acuosa, ajustándose la composición a un pH entre 6,5 y 7,5, sustancialmente libre de un tampón con un pKa dentro de una unidad de pH de dicho pH, que comprende:

a. una proteína seleccionada del grupo que consiste en alefacept, alteplasa, toxina botulínica, hormona paratiroidea, gonadotropina coriónica humana, hormona de estimulación tiroidea, calcitonina, eritropoyetina, vacuna anti-Haemophilus b, vacuna contra la encefalitis japonesa, vacuna contra estafilococos, vacuna antipalúdica o sus precursores o derivados;

b. en la que al menos un aditivo se selecciona del grupo que consiste en aspartato, glutamato, tartrato, fumarato, malato, gluconato, lactato, ácido glicólico, adenina, succinato, ascorbato, benzoato, fenilacetato, glutarato, galato, citosina, ácido p-aminobenzoico, sorbato, acetato, propionato, alginato, urato o sus sales; y

c. en la que al menos un aditivo se selecciona del grupo que consiste en aspartato, serina, arginina, lisina, purina, asparragina, glutamato, metionina, treonina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, alanina, glicina, triptófano, adenina, ácido p-aminobenzoico, ión de amonio, borato, ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico, trietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, palmitato, creatinina o sus sales.

5 En un aspecto de la invención, el recipiente hermético comprende además un sistema acuoso que comprende una proteína, caracterizado porque

a. el sistema no comprende una cantidad significativa de un tampón convencional, es decir, un compuesto con un pK_a cercano al pH de la composición en el intervalo de temperaturas previsto de almacenamiento de la composición; y

10 b. el pH de la composición se fija a un valor al que la composición tiene una estabilidad máxima medible con respecto al pH.

En una realización, un sistema del recipiente hermético conforme a la invención comprende preferiblemente un pH dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH, y preferiblemente ± 1 unidades de pH del pH al que la composición tiene una estabilidad máxima medible con respecto al pH.

15 En otra realización de la invención, el sistema del recipiente hermético de la invención no comprende ningún compuesto con un pK_a dentro de 1 unidad del pH de la composición al intervalo de temperaturas previsto de almacenamiento de la composición, a una concentración superior a 500 μM .

20 De acuerdo con la invención, el sistema del recipiente hermético de la invención puede comprender además: un polialcohol preferiblemente a aproximadamente al menos 0,5% (p/p); una sal inorgánica; un conservante; un inhibidor de la proteasa un tensioactivo; un agente quelante o cualquiera de sus combinaciones.

25 En una realización, el sistema del recipiente hermético de la invención comprende una proteína que está preferiblemente en su estado natural. En otra realización, el sistema del recipiente hermético de la invención comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en una hormona o factor de crecimiento, una enzima, un anticuerpo, un interferón, una proteína inmunógena, o cualquiera de sus combinaciones. En aún otra realización, el sistema del recipiente hermético de la invención es preferiblemente una disolución, suspensión o dispersión acuosa. En una realización, el sistema del recipiente hermético de la invención comprende un adsorbente sólido. En una realización preferida, el sistema del recipiente hermético de la invención comprende un adsorbente sólido en el que el adsorbente sólido incluye, pero no está limitado a, un adyuvante de vacunas tal como alúmina.

30 De acuerdo con la invención, un sistema o composición del recipiente hermético de la invención es adecuado para usar en tratamiento o diagnóstico practicados en humanos o animales.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Materiales

35 Ácido bórico (Fluka, código 15660)

Catalasa (de hígado bovino, Sigma C9322, 2380 U /mg sólido)

Ácido cítrico (Fisher, código C/6200/53)

Citosina (Sigma, código C3506)

Agua desionizada (conductividad $< 10 \mu S cm^{-1}$; grado de reactivo analítico, Fisher o Sanyo Fiestream MultiPure)

40 Hidrógeno-ortofosfato de disodio (Fisher, código S/4520/53)

Maleato disódico (Sigma, código M9009)

Malato disódico (Aldrich, código 233935)

DMSO - dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, código 154938-500)

Glucosa (Fisher, código G050061)

45 Glucosa-oxidasa (Biocatalysts G575P ~150 U /mg sólido)

Vacuna contra la hepatitis B recombinada (Shantha)

Patrón de la hormona de crecimiento humana (somatropina), fue suministrado por National Institute of Biological Standards and Control (Potters Bar, UK). Se obtuvieron más ejemplos para experimentación tras prescripción de un médico de cabecera local.

Ácido clorhídrico (Fisher, código J/4310/17)

5 Peróxido de hidrógeno (Sigma, código H1009)

Ácido D,L-láctico (Fluka, código 1077141)

Lactoperoxidasa (de leche bovina, DMV International: 1.050 unidades/mg por el método ABTS a pH 5,0)

Lisina (Sigma, código L5501)

Ácido nicotínico (Sigma, código N4126)

10 PBS - disolución salina tamponada con fosfato (Sigma D1408)

Yoduro potásico (Fisher, código 5880/53)

Cloruro sódico (Fisher, código C/3160/63)

Citrato sódico (Sigma, código S1804)

Hidróxido sódico (Fisher, código J/7800/15)

15 Dihidrógeno-ortofosfato sódico (Fisher, código S/3760/60)

Lactato sódico (Fluka, código 71723)

Urato sódico (Sigma, código U2875)

Almidón (Acros Organics, código 177132500)

Ácido succínico (Fluka, código 14079)

20 TMB - Tetrametilbencidina (Sigma T-2885)

Base TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano (Fisher Bioreagents, código BPE152-1)

Uricasa (Sigma, código U0880)

25 A menos que se indique de otra manera, los tampones de fosfato de concentración y pH dados (X mM, pH Y) usados en este trabajo se prepararon mezclando hidrógeno-ortofosfato disódico (X mM) con dihidrógeno-ortofosfato sódico (X mM) para lograr el pH Y que se necesitaba.

A menos que se indique de otra manera, los tampones de citrato/fosfato de concentración y pH dados (X mM, pH Y) usados en este trabajo se prepararon mezclando hidrógeno-ortofosfato disódico (X mM) con ácido cítrico (X mM) para lograr el pH Y que se necesitaba.

Plan experimental total

30 En cada ejemplo, se preparó una disolución acuosa de una enzima dada con aditivos seleccionados en un vial de vidrio de 2 ml. Cada disolución se analizó para determinar la actividad o integridad estructural de la proteína. Los viales se sellaron luego, y se incubaron a una temperatura dada durante un periodo dado de tiempo. La disolución se analizó luego de nuevo, y la recuperación de la actividad o integridad estructural se expresó como el tanto por ciento del resultado original (es decir, preincubación). Se usaron temperaturas superiores a la ambiente para que fueran más exigentes que el trabajo a temperatura ambiente, y para proporcionar más rápidamente una indicación de la estabilidad de la proteína.

Ejemplo 1 - Glucosa-oxidasa (de *Penicillium* sp.) a 59 °C

40 Se determinó la estabilidad de la glucosa-oxidasa en disoluciones acuosas a una concentración de 350 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia como en ausencia de tampones convencionales, y en presencia de tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de glucosa-oxidasa en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones:

- citrato 10 mM (pH 5,4); se preparó mezclando citrato sódico (10 mM) con ácido cítrico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml,

se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,4 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

- 5 • nicotinato 10 mM (pH 5,2); se preparó disolviendo ácido nicotínico (10 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,2 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 10 • lactato 10 mM (pH 5,0); se preparó mezclando lactato sódico (10 mM) con ácido láctico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 15 • TRIS 10 mM (pH 5,3); se preparó disolviendo base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,3 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 20 • lactato 10 mM + TRIS 10 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo ácido láctico (10 mM) y base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- proteína pura (pH 4,9); se preparó disolviendo glucosa-oxidasa (350 µg/ml) directamente en agua y ajustando del pH con ácido clorhídrico (10 mM).

25 Las disoluciones se incubaron a 59 °C durante 22 horas y luego se analizaron para determinar la actividad de glucosa-oxidasa restante. Esto se llevó a cabo conforme al procedimiento siguiente: Se añadieron 50 µl de la muestra (que contenía 350 µg/ml de glucosa-oxidasa) a 50 ml de agua desionizada. Se añadieron luego los siguientes reactivos: 10 ml de mezcla de reactivos (5,5 partes de dihidrógeno-ortofostato sódico 0.1 M, pH 6 + 4 partes de almidón al 2% p/p + 0,5 partes de enzima lactoperoxidasa de 1 mg/ml); 5 ml de yoduro potásico 100 mM y 5 ml de disolución de glucosa al 20% p/p. Se mezclaron juntos rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la glucosa. Después de 5 min, se añadió 1 ml de ácido clorhídrico 5 M para detener la reacción. Se leyó entonces la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro Unicam UV-visible. Si la intensidad del color era demasiado grande para permitir una lectura precisa, la muestra se diluyó con un volumen definido de agua desionizada para devolver el color a la escala. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, con referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a una temperatura elevada).

35 Todas las formulaciones se ensayaron a su pH óptimo con respecto a la estabilidad de la glucosa-oxidasa. Nicotinato (pK_a=4,90) y citrato (pK_a1 = 3,14, pK_a2 = 4,78, pK_a3 = 6,39) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando una recuperación de la actividad de glucosa-oxidasa de 25% (citrato) y 23% (nicotinato) después de incubación a 59 °C durante 22 horas. Se observó una recuperación considerablemente mayor en ausencia de tampón convencional. La recuperación fue aproximadamente de 54% si la proteína se incubó en agua pura ajustada a pH 4,9. Se observó incluso una mejor recuperación en presencia de un componente con pK_a al menos una unidad superior al pH de la composición. En presencia de TRIS (pK_a=8,30) se logró una recuperación de 68%, y en presencia de purina (pK_a = 8,90) se logró una recuperación de 72%. De manera similar, se logró una mejor estabilidad en presencia de un componente con pK_a al menos una unidad inferior al pH de la composición - en presencia de lactato (pK_a=3,85) se logró una recuperación de 69%. Se logró una recuperación de 73% en la mezcla de tampones desplazados de dos componentes que contenía lactato (pK_a = 3,85) y TRIS (pK_a = 8,30). La formulación de tampones desplazados de dos componentes fue por lo tanto óptima, porque dio como resultado la mejor estabilidad de la enzima y aseguró una mejor estabilidad al pH debido al efecto tamponante tanto del lado ácido como del lado alcalino del pH de la composición.

Ejemplo 2 - Glucosa-oxidasa (de *Penicillium sp.*) at 40 °C

Se determinó la estabilidad de la glucosa-oxidasa en disoluciones acuosas a una concentración de 350 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia como en ausencia de tampones convencionales, y en presencia de tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de glucosa-oxidasa en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones:

- 55 • citrato 10 mM (pH 5,2); se preparó mezclando citrato sódico (10 mM) con ácido cítrico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,2 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

- citrato 200 mM (pH 5,0); se preparó mezclando citrato sódico (200 mM) con ácido cítrico (200 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 5 • succinato 10 mM (pH 5,2); se preparó disolviendo ácido succínico (10 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,2 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 10 • succinato 200 mM (pH 5,2); se preparó disolviendo ácido succínico (200 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,2 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 15 • nicotinato 10 mM (pH 5,2); se preparó disolviendo ácido nicotínico (10 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,2 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 20 • lactato 10 mM (pH 4,7); se preparó mezclando lactato sódico (10 mM) con ácido láctico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 4,7 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- lactato 200 mM (pH 4,7); se preparó mezclando lactato sódico (200 mM) con ácido láctico (200 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 4,7 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 25 • TRIS 10 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 30 • TRIS 200 mM (pH 5,5); se preparó disolviendo base Trizma (200 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,5 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 35 • lactato 10 mM + TRIS 10 mM (pH 4,7); se preparó disolviendo ácido láctico (10 mM) y base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 4,7 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 40 • lactato 200 mM + TRIS 200 mM (pH 5,3); se preparó disolviendo ácido láctico (200 mM) y base Trizma (200 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió glucosa-oxidasa a esta formulación para lograr una concentración de 350 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la glucosa-oxidasa y, si fuera necesario, se ajustó a 5,3 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

Las disoluciones se incubaron a 40 °C durante 26 semanas y luego se analizaron para determinar la actividad de glucosa-oxidasa restante. Esto se llevó a cabo conforme al procedimiento descrito en el ejemplo 1.

45 Todas las formulaciones se ensayaron a su pH óptimo con respecto a la estabilidad de la glucosa-oxidasa. Nicotinato ($pK_a=4,90$), citrato ($pK_{a1} = 3,14$, $pK_{a2} = 4,78$, $pK_{a3} = 6,39$) y succinato ($pK_{a1} = 4,16$, $pK_{a2} = 5,61$) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando, a una concentración 10 mM, una recuperación de la actividad de glucosa-oxidasa de 0% (citrato 10 mM), 52% (nicotinato 10 mM) y 47% (succinato 10 mM) después de incubación a 40 °C durante 26 semanas. Se observó una recuperación considerablemente mejor de la actividad de glucosa-oxidasa en ausencia de tampones convencionales y en presencia de al menos un tampón desplazado. La recuperación fue de 91% en presencia de lactato 10 mM ($pK_a = 3,85$) y de 70% en presencia de TRIS 10 mM ($pK_a = 8,30$). La presencia de tanto TRIS (10 mM) como lactato (10 mM) dio como resultado una recuperación de 90%. A 50 concentraciones de 200 mM de tampones convencionales la recuperación fue como sigue: citrato - 46%, succinato - 55%. A concentraciones de 200 mM de tampones convencionales la recuperación fue como sigue: lactato - 76%, TRIS - 91%, TRIS y lactato - 92%. La formulación de tampones desplazados de dos componentes fue por lo tanto óptima, porque dio como resultado una mejor estabilidad de la enzima a ambas concentraciones ensayadas, y

aseguró una mejor estabilidad al pH debido al efecto tamponante tanto del lado ácido como del lado alcalino del pH de la composición.

Ejemplo 3 - Catalasa (de hígado bovino) at 52 °C

5 Se determinó la estabilidad de la catalasa en disoluciones acuosas a una concentración de 100 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia como en ausencia de tampones convencionales, y en presencia de tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de la catalasa en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones:

10 • citrato 10 mM (pH 6,4); se preparó mezclando citrato sódico (10 mM) con ácido cítrico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y, si fuera necesario, se ajustó a 6,4 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

15 • maleato 10 mM (pH 6,5); se preparó disolviendo maleato sódico (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y, si fuera necesario, se ajustó a 6,5 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

20 • lactato 10 mM (pH 6,4); se preparó mezclando lactato sódico (10 mM) con ácido láctico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y, si fuera necesario, se ajustó a 6,4 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

• TRIS 10 mM (pH 6,7); se preparó disolviendo base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y, si fuera necesario, se ajustó a 6,7 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

25 • lactato 10 mM + TRIS 10 mM (pH 6,9); se preparó disolviendo ácido láctico (10 mM) y base Trizma (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y, si fuera necesario, se ajustó a 6,9 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

30 • proteína pura (pH 6,8); se preparó disolviendo catalasa (100 µg/ml) directamente en agua y ajustando del pH con ácido clorhídrico (10 mM).

35 Las disoluciones se incubaron a 52 °C durante 42 horas y luego se analizaron para determinar la actividad de catalasa restante. Esto se llevó a cabo conforme al procedimiento siguiente: se añadieron 2 ml de peróxido de hidrógeno (30 mM en agua) a 18 ml de PBS en un recipiente de polipropileno de 125 ml. Se añadieron 100 µl de muestra (que contenía 100 µg/ml de catalasa) y se mezclaron. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente exactamente durante 30 min. Mientras tanto, los siguientes reactivos se mezclaron en una cubeta plástica para las medidas espectrofotométricas:

- 2,73 ml de tampón de citrato/fosfato (0,1 M, pH 5,0)
- 100 µl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO)
- 100 µl de lactoperoxidasa

40 Después del periodo de incubación de 30 min, se añadieron 70 µl de la mezcla que contenía la catalasa a la cubeta, y se leyó la absorbancia en aproximadamente 30 s. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, con referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a una temperatura elevada).

45 Citrato ($pK_{a1} = 3,14$, $pK_{a2} = 4,78$, $pK_{a3} = 6,39$) y maleato ($pK_{a1} = 1,83$, $pK_{a2} = 6,20$) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando una recuperación de la actividad de catalasa de 12% (citrato) y 13% (maleato) después de incubación a 52 °C durante 42 horas. Se observó una estabilidad considerablemente mejorada en ausencia de tampones convencionales. La recuperación fue aproximadamente de 48% si la proteína se incubó en agua pura ajustada a pH 6,8. Se observó una recuperación similar en presencia de componentes con pK_a al menos una unidad superior o una unidad inferior al pH de la composición. La recuperación fue como sigue: 45% en presencia de TRIS ($pK_a = 8,30$), 44% en presencia de lactato ($pK_a = 3,85$), 39% en presencia de purina ($pK_a = 8,9$), 47% en presencia tanto de TRIS ($pK_a = 8,30$) como de lactato ($pK_a = 3,85$). Aunque la recuperación fue comparable entre la formulación sin excipientes (es decir, solamente agua con ajuste de pH) y las formulaciones que contenían

tampones desplazados, todavía es preferible usar los tampones desplazados debido a un mejor control a lo largo del pH en su presencia.

Ejemplo 4 - Catalasa (de hígado bovino) at 40 °C

5 Se determinó la estabilidad de la catalasa en disoluciones acuosas a una concentración de 100 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia como en ausencia de tampones convencionales, y en presencia de tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de la catalasa en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones (todas las formulaciones contenían NaCl 200 mM para mejorar la solubilidad de la enzima):

- 10 • citrato 10 mM (pH 6,8); se preparó mezclando citrato sódico (10 mM) con ácido cítrico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,8 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 15 • maleato 10 mM (pH 6,8); se preparó disolviendo maleato (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,8 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 20 • fosfato 10 mM (pH 6,8); se preparó disolviendo dihidrógenofosfato sódico (10 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,8 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 25 • lactato 10 mM (pH 6,4); se preparó mezclando lactato sódico (10 mM) con ácido láctico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,4 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 30 • purina 10 mM (pH 6,4); se preparó disolviendo purina (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,4 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 35 • lisina 10 mM (pH 6,6); se preparó disolviendo lisina (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 6,6 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- lactato 10 mM + purina 10 mM (pH 7,0); se preparó disolviendo ácido láctico (10 mM) y purina (10 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió catalasa a esta formulación para lograr una concentración de 100 µg/ml, y se añadió cloruro sódico para lograr una concentración de 200 mM; se comprobó el pH después de la adición de la catalasa y el cloruro sódico y, si fuera necesario, se ajustó a 7,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- proteína pura (pH 6,4); se preparó disolviendo catalasa (100 µg/ml) directamente en una disolución de cloruro sódico 200 mM y ajustando el pH con ácido clorhídrico (10 mM).

40 Las disoluciones se incubaron a 40 °C durante 7 días y luego se analizaron para determinar la actividad de catalasa restante. Esto se llevó a cabo conforme al procedimiento descrito en el ejemplo 3.

45 Citrato ($pK_{a1} = 3,14$, $pK_{a2} = 4,78$, $pK_{a3} = 6,39$), maleato ($pK_{a1} = 1,83$, $pK_{a2} = 6,20$) y fosfato ($pK_{a1} = 2,16$, $pK_{a2} = 7,10$) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando una recuperación de la actividad de catalasa de 4% (citrato o maleato) y 2% (fosfato) después de incubación a 40 °C durante 7 días. La recuperación de la actividad de catalasa fue igualmente mala (3%) en ausencia de tampón convencional (es decir, en disolución de cloruro sódico ajustada a pH 6,4). Se observó una estabilidad mejorada considerablemente en formulaciones de tampones desplazados. La recuperación fue de 11% en presencia de lisina ($pK_{a1} = 2,25$, $pK_{a2} = 9,2$, $pK_{a3} = 10,8$), 58% en presencia de lactato ($pK_a = 3,85$), 63% en presencia de purina ($pK_a = 8,90$) y 61 % en presencia de tanto lactato como purina. Las formulaciones de tampones desplazados son de este modo la mejor elección para asegurar la

50 estabilidad de la catalasa.

Ejemplo 5 - Uricasa

Se determinó la estabilidad de la uricasa se disoluciones acuosas a 250 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia como en ausencia de tampones convencionales, y en presencia de

tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de la uricasa en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones:

- 5 • borato 20 mM (pH 8,6); se preparó disolviendo bórico (20 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió uricasa a esta formulación para lograr una concentración de 250 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la uricasa y, si fuera necesario, se ajustó a 8,6 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 10 • purina 20 mM (pH 8,6); se preparó disolviendo purina (20 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió uricasa a esta formulación para lograr una concentración de 250 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la uricasa y, si fuera necesario, se ajustó a 8,6 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 15 • succinato 20 mM (pH 8,6); se preparó disolviendo ácido succínico (20 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió uricasa a esta formulación para lograr una concentración de 250 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la uricasa y, si fuera necesario, se ajustó a 8,6 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- 20 • citosina 20 mM (pH 9,0); se preparó disolviendo citosina (20 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió uricasa a esta formulación para lograr una concentración de 250 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la uricasa y, si fuera necesario, se ajustó a 9,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).
- glicina 20 mM (pH 9,0); se preparó disolviendo glicina (20 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió uricasa a esta formulación para lograr una concentración de 250 µg/ml, se comprobó el pH después de la adición de la uricasa y, si fuera necesario, se ajustó a 9,0 con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M).

25 Las disoluciones se incubaron a 60 °C durante 18 horas y luego se analizaron para determinar la actividad de uricasa restante. Esto se llevó a cabo conforme al procedimiento siguiente: Las siguientes disoluciones se mezclaron en una cubeta de 1 cm:

- 1,5 ml de tampón de borato (25 mM, pH 8,5); se preparó ajustando el pH de ácido bórico 25 mM usando hidróxido sódico (5 M).
- 0,8 ml de urato sódico (2 mM).

30 Se añadieron 40 µl de muestra (que contenía 250 µg/ml de uricasa) y se mezclaron rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la uricasa. Después de 5 min, se añadieron los siguientes reactivos en este orden particular (el primer reactivo debe añadirse a los 5 minutos exactamente, el tiempo de la adición de los otros reactivos es menos crucial):

- 0,8 ml de tampón de citrato/fosfato (0,5 M, pH 4,0) se preparó mezclando ácido cítrico 0,5 mM con hidrógenofosfato disódico 0,5 mM para lograr el pH que se necesitaba.
- 35 • 100 µl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO).
- 100 µl de lactoperoxidasa (1 mg/ml, disueltos en agua).

40 La disolución resultante se mezcló completamente, y se leyó la absorbancia a 630 nm, usando un espectrofotómetro Unicam UV-visible (tipo: Helios gamma). Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, con referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a una temperatura elevada).

45 Borato ($pK_a = 9,27$), y purina ($pK_a = 8,90$) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando una recuperación máxima de la actividad de uricasa de 48% (borato) y 52% (purina) después de incubación a 60 °C durante 18 horas. Se observó una mejor estabilidad de la uricasa en ausencia de tampones convencionales y en presencia de tampones desplazados. La recuperación fue de 72% en presencia de succinato ($pK_{a1} = 4,16$, $pK_{a2} = 5,51$), 64% en presencia de glicina ($pK_{a1} = 2,43$, $pK_{a2} = 9,84$), y 78% en presencia de citosina ($pK_{a1} = 4,5$, $pK_{a2} = 12,2$). El uso de tampones desplazados es de este modo óptimo para asegurar la estabilidad de la uricasa.

Ejemplo 6 - vacuna contra la hepatitis B recombinada

50 Se determinó la estabilidad de la vacuna contra la hepatitis B recombinada en presencia de un adyuvante apropiado (suspensión de hidróxido de aluminio), en disoluciones acuosas a 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio. Estas concentraciones son las mismas que las del producto de vacuna comercial. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas en presencia de tampones convencionales, y en presencia de tampones

desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad del antígeno de la hepatitis B en esa formulación en particular. Se comparó la estabilidad en las siguientes formulaciones (todas las formulaciones contenían fosfato sódico 40 mM para asegurar la unión óptima de la vacuna sobre la alúmina):

- 5 • succinato 40 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo ácido succínico (40 mM) y dihidrógenofosfato sódico (40 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió antígeno de la hepatitis B adsorbido sobre adyuvante de hidróxido de aluminio a la formulación, para lograr 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio en la formulación.
- 10 • malato 10 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo malato sódico (40 mM) y dihidrógenofosfato sódico (40 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió antígeno de la hepatitis B adsorbido sobre adyuvante de hidróxido de aluminio a la formulación, para lograr 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio en la formulación.
- 15 • lactato 40 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo lactato sódico (40 mM) y dihidrógenofosfato sódico (40 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió antígeno de la hepatitis B adsorbido sobre adyuvante de hidróxido de aluminio a la formulación, para lograr 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio en la formulación.
- 20 • lactato 40 mM + TRIS 40 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo ácido láctico (40 mM), base Trizma (40 mM) y dihidrógenofosfato sódico (40 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió antígeno de la hepatitis B adsorbido sobre adyuvante de hidróxido de aluminio a la formulación, para lograr 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio en la formulación.
- 25 • histidina 40 mM (pH 5,0); se preparó disolviendo histidina (40 mM) y dihidrógenofosfato sódico (40 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió antígeno de la hepatitis B adsorbido sobre adyuvante de hidróxido de aluminio a la formulación, para lograr 20 µg/ml de proteína y 0,5 mg/ml de hidróxido de aluminio en la formulación.

Las disoluciones se incubaron a 55 °C durante 4 semanas y luego se analizaron para determinar la actividad antigénica restante. La actividad antigénica de la vacuna contra la hepatitis B se determinó usando el kit de diagnóstico AUSZYME monoclonal (Abbott Laboratories; no. de catálogo 1980-64). La actividad antigénica se determinó tanto en la vacuna entera como en el sobrenadante después de la centrifugación (13.000 rpm, 5 min). La actividad antigénica se expresó como tanto por ciento con respecto al valor medido de la vacuna refrigerada sin tratar.

30 Succinato ($pK_{a1} = 4,16$, $pK_{a2} = 5,51$) y malato ($pK_{a1} = 3,40$, $pK_{a2} = 5,11$) se ensayaron como tampones convencionales, mostrando una recuperación máxima de antígeno de la hepatitis B de 64% (succinato) y 57% (malato) después de incubación a 55 °C durante 4 semanas. Se observó una estabilidad considerablemente mejor en presencia de tampones desplazados. 88% en presencia de TRIS ($pK_a = 8,10$), 91% en presencia de lactato ($pK_a = 3,85$), 93% en la presencia combinada de TRIS y lactato y 98% en presencia de histidina ($pK_{a1} = 1,78$, $pK_{a2} = 6,10$, $pK_{a3} = 9,26$).

35 Ejemplo 7 - Hormona de crecimiento humana

Se determinó la estabilidad de la hormona de crecimiento humana en disoluciones acuosas a una concentración de 1,25 µg/ml. Se comparó la estabilidad entre disoluciones preparadas tanto en presencia de tampones convencionales como en presencia de tampones desplazados. En cada caso, el pH de la formulación fue óptimo con respecto a la estabilidad de la hormona de crecimiento humana en esa formulación en particular. La estabilidad se comparó en las siguientes formulaciones:

- 40 • citrato 20 mM (pH 6,0); se preparó mezclando ácido cítrico (20 mM) con citrato sódico para lograr el pH que se necesitaba; se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
- 45 • TRIS 20 mM (pH 6,0); se preparó disolviendo base Trizma (20 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M); se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
- lactato 20 mM (pH 6,0); se preparó mezclando lactato sódico (10 mM) con ácido láctico (10 mM) para lograr el pH que se necesitaba; se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
- 50 • lactato 20 mM + TRIS 20 mM (pH 6,0); se preparó disolviendo ácido láctico (20 mM) y base Trizma (20 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.

- citosina 20 mM (pH 6,0); se preparó disolviendo citosina (20 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
 - 5 • purina 20 mM (pH 6,0); se preparó disolviendo purina (20 mM) en agua y ajustando el pH con ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico (5 M); se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
 - citosina 10 mM + purina 10 mM (pH 6,0); se preparó codisolviendo citosina (10 mM) y purina (10 mM) en agua y ajustando el pH con hidróxido sódico (5 M); se añadió hormona de crecimiento humana a esta formulación, para lograr una concentración de 1,25 mg/ml.
- 10 Las disoluciones se incubaron a 40 °C durante 5 semanas y luego se analizaron para determinar la proteína intacta restante, usando el siguiente método de HPLC de fase inversa: la fase móvil se preparó mezclando 71 partes (en volumen) de una disolución de TRIS (0,05 M, en agua ajustada con ácido clorhídrico a un pH de 7,5) y 29 partes (en volumen) de alcohol n-propílico. La fase móvil se filtró antes de su uso. El cromatógrafo líquido (Agilent 1100 series) se equipó con un detector de 214 nm y una columna de 4,6 × 250 mm (Phenomenex 00G-4167-E0) empaquetada con gel de sílice con butilsililo, con una granulometría de 5 µm y una porosidad de 30 nm, mantenida a 45°C.
- 15 El caudal se mantuvo a 0,5 ml/min. Se inyectaron 15 µl de muestras acuosas de hormona de crecimiento humana (típicamente de 1-2,5 mg/ml).
- Citrato ($pK_{a1} = 3,14$, $pK_{a2} = 4,78$, $pK_{a3} = 6,39$) se ensayó como tampón convencional, mostrando una recuperación estructural de la hormona de crecimiento humana de 5% después de incubación a 40 °C durante 5 semanas. Se observó una recuperación considerablemente mejor de la hormona de crecimiento humana en presencia de tampones desplazados: 39,8% en presencia de TRIS ($pK_a = 8,10$), 38,2% en presencia de lactato ($pK_a = 3,85$), 42,2% en presencia de TRIS y lactato, 51,3% en presencia de citosina ($pK_{a1} = 4,5$, $pK_{a2} = 12,2$), 49,1% en presencia de purina ($pK_a = 8,90$) y 48,1 % en presencia de purina y citosina.
- 20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un recipiente hermético que contiene una composición acuosa que comprende una proteína y dos tampones de desplazamiento, en la que un tampón de desplazamiento tiene un pKa que es al menos 1 unidad mayor que el pH de la composición, y un tampón de desplazamiento tiene un pKa que es al menos 1 unidad inferior al pH de la composición, fijándose dicho pH de la composición a un valor al que la composición tiene una estabilidad máxima medible con respecto al pH, en la que uno de los tampones es TRIS, con la condición de que dicha composición contenga no más de 2 mM de un tampón convencional con un pKa que esté dentro de una unidad de pH del pH de la composición, y en la que cada tampón de desplazamiento esté presente a una concentración de 2 a 200 mM.
- 10 **2.** Un recipiente hermético conforme a la reivindicación 1, en el que la composición acuosa comprende un tensioactivo.
- 3.** Un recipiente hermético conforme a la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que cada tampón de desplazamiento de la composición acuosa tiene un pKa que es de 1 a 5 unidades superior o inferior al pH de la composición.
- 15 **4.** Un recipiente hermético conforme a la reivindicación 3, en el que cada tampón de desplazamiento de la composición acuosa tiene un pKa que es de 1 a 4 unidades superior o inferior al pH de la composición.
- 5.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada tampón de desplazamiento de la composición acuosa está presente a una concentración de 5 a 100 mM.
- 6.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa
- 20 (i) la proteína es un antígeno de la hepatitis B y el pH es aproximadamente 5; o
(ii) la proteína es la hormona de crecimiento humana y el pH es aproximadamente 6.
- 7.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es una enzima terapéutica.
- 25 **8.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es un anticuerpo terapéutico.
- 9.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es una hormona de crecimiento humana.
- 10.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es una vacuna.
- 30 **11.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es un factor de coagulación.
- 12.** Un recipiente hermético conforme a la reivindicación 11, en el que en la composición acuosa la proteína es un factor de coagulación seleccionado de factor VIII y factor IX.
- 35 **13.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es insulina.
- 14.** Un recipiente hermético conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la composición acuosa la proteína es interferón.
- 15.** Un recipiente hermético conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la composición acuosa es para usar en tratamiento o diagnóstico practicados en humanos o animales.

40

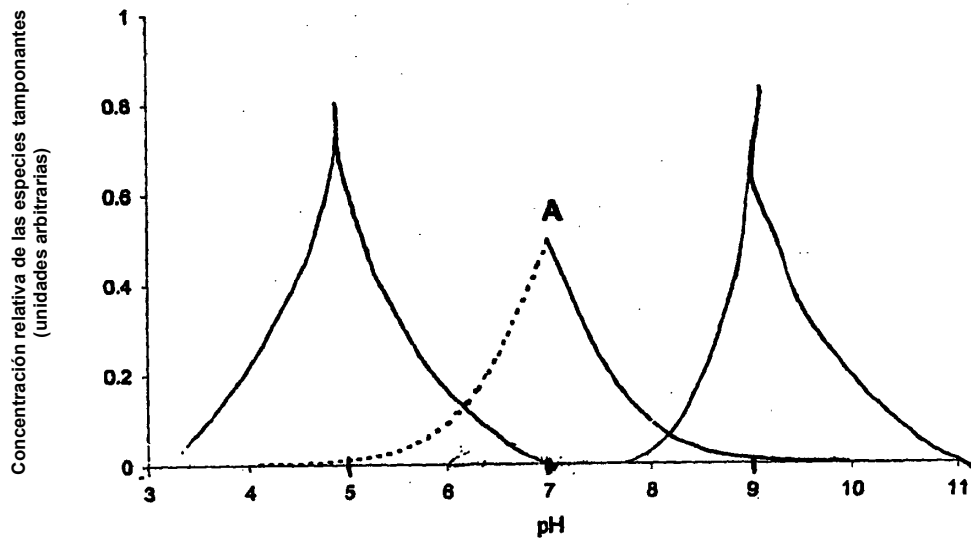


FIGURA 1

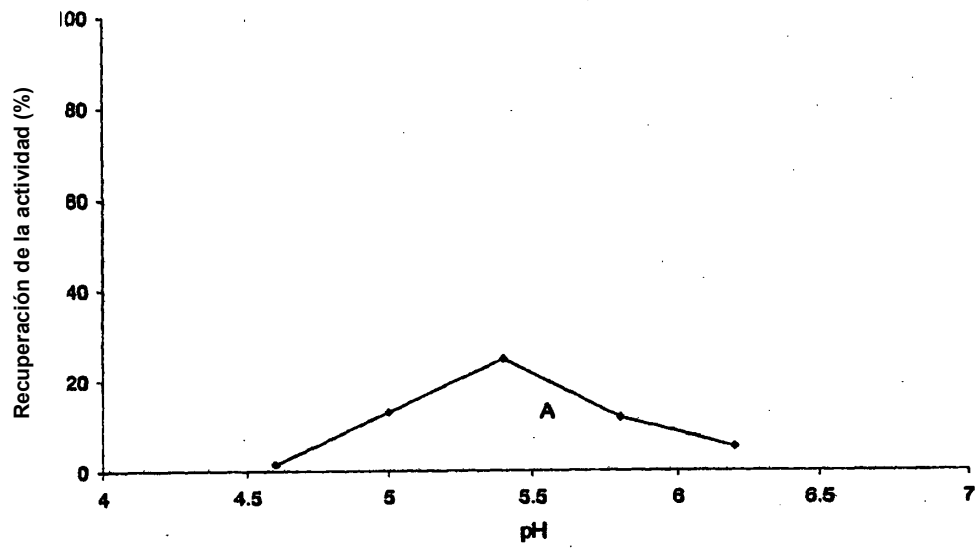


FIGURA 2

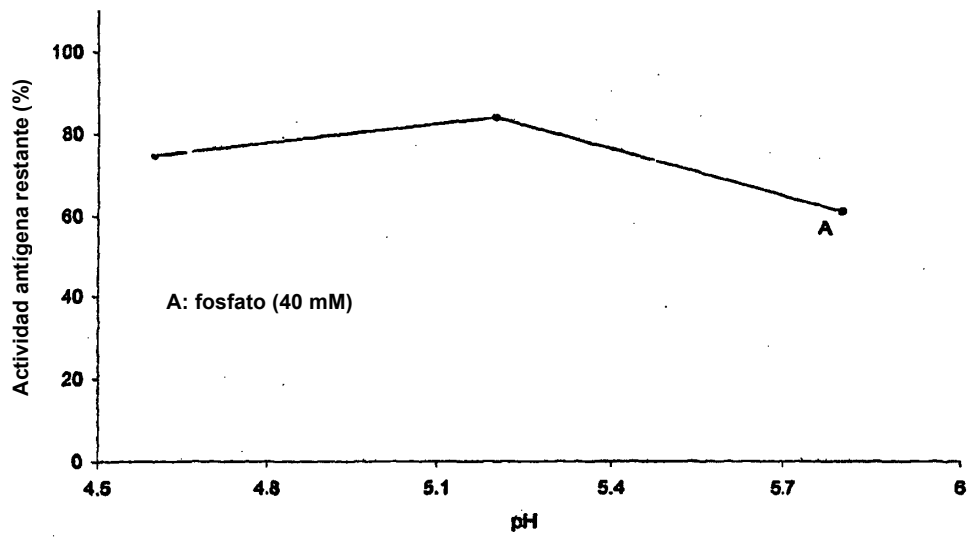


FIGURA 3