

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 722**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2015 PCT/US2015/036899**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15196187**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2015 E 15809600 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023 EP 3160484**

(54) Título: **Compuestos excipientes reductores de la viscosidad para formulaciones proteicas**

(30) Prioridad:

20.06.2014 US 201462014784 P
24.11.2014 US 201462083623 P
23.03.2015 US 201562136763 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2024

(73) Titular/es:

COMERA LIFE SCIENCES, INC. (100.0%)
12 Gill Street, Suite 4650
Woburn, MA 01801, US

(72) Inventor/es:

SOANE, DAVID S.;
WUTHRICH, PHILIP;
PORTILLA, ROSA CASADO;
MAHONEY, ROBERT P. y
MOODY, MARK

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 965 722 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

Compuestos excipientes reductores de la viscosidad para formulaciones proteicas

Campo de aplicación

Esta solicitud se refiere en general a formulaciones para la administración de biopolímeros.

5 Antecedentes

Los biopolímeros pueden utilizarse con fines terapéuticos o no terapéuticos. Las terapias basadas en biopolímeros, tales como las formulaciones de anticuerpos o enzimas, se utilizan ampliamente en el tratamiento de enfermedades. Los biopolímeros no terapéuticos, tales como enzimas, péptidos y proteínas estructurales, tienen utilidad en aplicaciones no terapéuticas tales como usos domésticos, nutricionales, comerciales e industriales.

10 Los biopolímeros utilizados en aplicaciones terapéuticas deben formularse para permitir su introducción en el organismo para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, en determinadas circunstancias es ventajoso administrar las formulaciones de anticuerpos y biopolímeros proteínicos o peptídicos por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), en lugar de administrar estas formulaciones mediante inyecciones intravenosas (IV). Sin embargo, para lograr un mejor cumplimiento y comodidad del paciente con la inyección SC o IM, el volumen de

15 líquido en la jeringa por lo general se limita a 2 o 3 ccs y la viscosidad de la formulación por lo general es menor que aproximadamente 20 centipoise (cP; 0,02 Pa.s) para que la formulación pueda administrarse utilizando dispositivos médicos convencionales y agujas de pequeño calibre. Estos parámetros de administración no siempre se ajustan bien a los requisitos de dosificación de las fórmulas que se administran.

20 Los anticuerpos, por ejemplo, pueden necesitar ser administrados a niveles de dosis elevados para ejercer su efecto terapéutico previsto. El uso de un volumen de líquido restringido para administrar un nivel de dosis elevado de una formulación de anticuerpo puede requerir una concentración elevada del anticuerpo en el vehículo de administración, que a veces supera un nivel de 150 mg/ml. A este nivel de dosificación, los gráficos de viscosidad frente a concentración de las soluciones proteicas se sitúan más allá de su transición lineal-no lineal, de modo que la viscosidad de la formulación aumenta drásticamente con el incremento de la concentración. Sin embargo, el aumento de la viscosidad no es compatible con los sistemas estándar de administración SC o IM. Las soluciones de productos terapéuticos basados en biopolímeros también son propensas a sufrir problemas de estabilidad, tales como precipitación, turbidez, opalescencia, desnaturalización y formación de geles, agregación reversible o irreversible. Los problemas de estabilidad limitan la vida útil de las soluciones o requieren una manipulación especial.

25 30 Un enfoque para producir formulaciones proteicas inyectables consiste en transformar la solución de proteína terapéutica en un polvo que pueda reconstituirse para formar una suspensión adecuada para la administración SC o IM. La liofilización es una técnica estándar para producir proteínas en polvo. La liofilización, el secado por pulverización e incluso la precipitación seguida de extracción en fluido supercrítico se han utilizado para generar proteínas en polvo para su posterior reconstitución. Las suspensiones en polvo son poco viscosas antes de la redisolución (en comparación con las soluciones a la misma dosis total) y, por lo tanto, pueden ser adecuadas para la inyección SC o IM, siempre que las partículas sean lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de la aguja. Sin embargo, los cristales de proteínas presentes en el polvo tienen el riesgo inherente de desencadenar una respuesta inmunitaria. La incierta estabilidad/actividad de la proteína tras la redisolución plantea otros problemas. Sigue existiendo la necesidad en la técnica de técnicas para producir formulaciones proteicas de baja viscosidad con fines terapéuticos, evitando al mismo tiempo las limitaciones introducidas por las suspensiones proteicas en polvo.

35 40 Además de las aplicaciones terapéuticas de las proteínas descritas anteriormente, biopolímeros tales como enzimas, péptidos y proteínas estructurales pueden utilizarse en aplicaciones no terapéuticas. Estos biopolímeros no terapéuticos pueden producirse a partir de diferentes vías, por ejemplo, derivados de fuentes vegetales, fuentes animales o producidos a partir de cultivos celulares.

45 50 Las proteínas no terapéuticas pueden producirse, transportarse, almacenarse y manipularse como material granular o en polvo o como solución o dispersión, normalmente en agua. Los biopolímeros para aplicaciones no terapéuticas pueden ser proteínas globulares o fibrosas, y determinadas formas de estos materiales pueden tener una solubilidad limitada en agua o presentar una alta viscosidad en el momento de la disolución. Estas propiedades de la solución pueden presentar desafíos para la formulación, manipulación, almacenamiento, bombeo y rendimiento de los materiales no terapéuticos, por lo que existe la necesidad de procedimientos para reducir la viscosidad y mejorar la solubilidad y estabilidad de las soluciones de proteínas no terapéuticas.

55 Las proteínas son biopolímeros complejos, cada uno con una estructura tridimensional plegada de forma única y un mapa de energía superficial (regiones hidrofóbicas/hidrofílicas y cargas). En soluciones proteicas concentradas, estas macromoléculas pueden interactuar fuertemente e incluso entrelazarse de formas complicadas, dependiendo de su forma exacta y de la distribución de la energía superficial. Los "puntos calientes" de fuertes interacciones específicas conducen a la agrupación de proteínas, lo que aumenta la viscosidad de la solución. Para hacer frente

a estos problemas, en las fórmulas bioterapéuticas se utilizan un número de compuestos excipientes, cuyo objetivo es reducir la viscosidad de la solución impidiendo las interacciones localizadas y la agrupación. Estos esfuerzos se adaptan individualmente, a menudo de forma empírica, a veces guiados por simulaciones *in silico*. Pueden proporcionarse combinaciones de compuestos excipientes, pero la optimización de tales combinaciones debe progresar de nuevo empíricamente y caso por caso.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de un enfoque verdaderamente universal para reducir la viscosidad en formulaciones proteicas a una concentración dada en condiciones no lineales. Existe una necesidad adicional en la técnica de lograr esta reducción de la viscosidad preservando al mismo tiempo la actividad de la proteína. Además, sería deseable adaptar el sistema de reducción de la viscosidad para utilizarlo con formulaciones que tengan perfiles de liberación sintonizables y sostenidos, y para utilizarlo con formulaciones adaptadas para la inyección de depósito.

El documento WO2004091658 tiene un resumen, que dice "la presente solicitud se refiere a formulaciones altamente concentradas de anticuerpos y proteínas con viscosidad reducida que son estables, relativamente isotónicas y de baja turbidez. Las formulaciones son especialmente adecuadas para la administración subcutánea.

La solicitud describe además artículos de fabricación que contienen tales formulaciones y el procedimiento para utilizarlos en el tratamiento de trastornos tratables mediante el anticuerpo o la proteína formulados. Las formulaciones comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato".

El documento US2014072559 tiene un resumen, que dice "en una solución acuosa, una composición incluye al menos una proteína, incluyendo al menos un fragmento de anticuerpo, y al menos un agente reductor de viscosidad soluble en agua elegido del grupo que consiste en citidina, 2'-desoxicitidina, uridina, 2'-desoxiuridina, timidina y ribotimidina, solos o como mezcla. La proteína incluye al menos un fragmento de anticuerpo en una concentración mayor o igual a 50 mg/ml".

Resumen de la invención

El alcance de la protección viene determinado por las reivindicaciones, interpretadas por el resto de la memoria descriptiva. Por ejemplo, el término "realización" en esta memoria descriptiva puede entenderse referido a implementaciones dentro del ámbito de protección determinado por las reivindicaciones.

Según un primer aspecto según la reivindicación 1, se proporciona una formulación líquida. Según un segundo aspecto según la reivindicación 11, se proporciona una formulación líquida para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero. Según un tercer aspecto según la reivindicación 13, se proporciona una formulación terapéutica líquida inyectable para su uso en la reducción del dolor en un sitio de inyección de una proteína terapéutica en un mamífero. Según un cuarto aspecto según la reivindicación 14, se proporciona un procedimiento para mejorar un procedimiento relacionado con las proteínas.

También se divulan en la presente memoria formulaciones líquidas que comprenden una proteína y un compuesto excipiente seleccionado del grupo que consiste en aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopeptidos, ácidos orgánicos de cadena corta y poliacídos alifáticos de bajo peso molecular, en los que el compuesto excipiente se agrega en una cantidad que reduce la viscosidad.

En las realizaciones, la formulación es una composición farmacéutica, y la formulación terapéutica comprende una proteína terapéutica, en la que el compuesto excipiente es un compuesto excipiente farmacéuticamente aceptable.

En las realizaciones, la formulación es una formulación no terapéutica, y la formulación no terapéutica comprende una proteína no terapéutica. En las realizaciones, la cantidad reductora de viscosidad reduce la viscosidad de la formulación a una viscosidad menor que la viscosidad de una formulación de control. Según el primer aspecto, la viscosidad de la formulación es al menos aproximadamente un 50 % menor que la viscosidad de la formulación de control. En las realizaciones, la viscosidad de la formulación es al menos aproximadamente un 70 % menor que la viscosidad de la formulación de control, o es al menos aproximadamente un 90 % menor que la viscosidad de la formulación de control. En las realizaciones, la viscosidad es menor que aproximadamente 100 cP (0,1 Pa.s), o es menor que aproximadamente 50 cP (0,05 Pa.s), o es menor que aproximadamente 20 cP (0,02 Pa.s), o es menor que aproximadamente 10 cP (0,01 Pa.s). En las realizaciones, la formulación contiene al menos aproximadamente 25 mg/ml del anticuerpo, o al menos aproximadamente 100 mg/ml del anticuerpo, o al menos aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo, o al menos aproximadamente 300 mg/ml del anticuerpo. Segundo el primer aspecto, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml de cafeína. En las realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, o comprende entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml de cafeína. En las realizaciones, la formulación tiene una estabilidad mejorada en comparación con la formulación de control. Segundo el primer aspecto, el compuesto excipiente es la cafeína. En las realizaciones, la cafeína es un anestésico local inyectable. La amina impedida puede poseer una propiedad farmacológica independiente, y la cafeína puede estar presente en la formulación en una cantidad que tenga un efecto farmacológico independiente. En las realizaciones, la cafeína puede estar presente en la formulación en una cantidad menor que una cantidad terapéuticamente eficaz. La actividad farmacológica independiente puede ser una actividad anestésica local. En las realizaciones, la cafeína que posee la actividad farmacológica independiente se combina con un segundo compuesto excipiente que

- disminuye aún más la viscosidad de la formulación. El segundo compuesto excipiente puede seleccionarse del grupo que consiste en teofilina, tiramina, procaína, lidocaína, imidazol, aspartamo, sacarina y acesulfamo potásico. En las realizaciones, la formulación puede comprender un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en conservantes, tensioactivos, azúcares, polisacáridos, arginina, prolina, hialuronidasa, estabilizadores y tampones.
- Se divulgan además en la presente memoria procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero, que comprenden administrar a dicho mamífero una formulación terapéutica líquida, en la que la formulación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína terapéutica, y en la que la formulación comprende además un compuesto excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopéptidos, ácidos orgánicos de cadena corta y poliácidos alifáticos de bajo peso molecular; y en la que la formulación terapéutica es eficaz para el tratamiento de la enfermedad o trastorno. La proteína terapéutica puede ser una proteína PEGilada, y el compuesto excipiente es un poliácido alifático de bajo peso molecular. El excipiente puede ser una amina impedida. La amina impedida puede ser un compuesto anestésico local. La formulación puede administrarse mediante inyección subcutánea, o una inyección intramuscular o una inyección intravenosa. El compuesto excipiente puede estar presente en la formulación terapéutica en una cantidad reductora de la viscosidad, y la cantidad reductora de la viscosidad reduce la viscosidad de la formulación terapéutica a una viscosidad menor que la viscosidad de una formulación de control. La formulación terapéutica puede tener una estabilidad mejorada en comparación con la formulación de control. El compuesto del excipiente puede ser esencialmente puro.
- En la presente memoria se describen además procedimientos para reducir el dolor en un lugar de inyección de una proteína terapéutica en un mamífero que lo necesite, que comprenden: administrar una formulación terapéutica líquida por inyección, en la que la formulación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica, en la que la formulación comprende además un compuesto excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en compuestos anestésicos inyectables locales, en la que el compuesto excipiente farmacéuticamente aceptable se agrega a la formulación en una cantidad que reduce la viscosidad; y en la que el mamífero experimenta menos dolor con la administración de la formulación terapéutica que comprende el compuesto excipiente que con la administración de una formulación terapéutica de control, en la que la formulación terapéutica de control no contiene el compuesto excipiente y es, por lo demás, idéntica a la formulación terapéutica.
- En la presente memoria se describen procedimientos para mejorar la estabilidad de una formulación proteica líquida, que comprenden: preparar una formulación de proteína líquida que comprende una proteína terapéutica y un compuesto excipiente seleccionado del grupo seleccionado del grupo que consiste en aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopéptidos y ácidos orgánicos de cadena corta, y poliácidos alifáticos de bajo peso molecular, en los que la formulación de proteína líquida demuestra una estabilidad mejorada en comparación con una formulación de proteína líquida de control, en los que la formulación de proteína líquida de control no contiene el compuesto excipiente y es por lo demás idéntica a la formulación de proteína líquida. La estabilidad de la formulación líquida puede ser una estabilidad en condiciones de almacenamiento en frío, una estabilidad a temperatura ambiente o una estabilidad a temperatura elevada.
- También se divulgan en la presente memoria formulaciones líquidas que comprenden una proteína y un compuesto excipiente seleccionado del grupo que consiste en aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopéptidos, ácidos orgánicos de cadena corta y poliácidos alifáticos de bajo peso molecular, en los que la presencia del compuesto excipiente en la formulación da como resultado características mejoradas de interacción proteína-proteína medidas por el parámetro de interacción de difusión de proteínas kD, o el segundo coeficiente virial B22. La formulación puede ser una formulación terapéutica, y comprende una proteína terapéutica. La formulación puede ser una formulación no terapéutica, y comprende una proteína no terapéutica.
- Según un cuarto aspecto según la reivindicación 14, se proporciona un procedimiento para mejorar un procedimiento relacionado con proteínas que comprende proporcionar la formulación líquida del primer aspecto, y emplearla en un procedimiento de procesamiento. En las realizaciones, el procedimiento de procesamiento incluye filtración, bombeo, mezcla, centrifugación, separación por membrana, liofilización o cromatografía.
- Descripción detallada**
- En la presente memoria se describen formulaciones y procedimientos para su producción que permiten la administración de soluciones proteicas concentradas. En las realizaciones, los enfoques divulgados en la presente memoria pueden producir una formulación líquida de menor viscosidad o una mayor concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas en la formulación líquida, en comparación con las soluciones proteicas tradicionales.
- En las realizaciones, los enfoques divulgados en la presente memoria pueden dar lugar a una formulación líquida con una estabilidad mejorada en comparación con una solución proteica tradicional. Una formulación estable es aquella en la que la proteína contenida en ella conserva sustancialmente su estabilidad física y química y su eficacia terapéutica o no terapéutica tras su almacenamiento en condiciones de almacenamiento, ya sean condiciones de almacenamiento en frío, condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente o condiciones de almacenamiento a temperatura elevada. Ventajosamente, una formulación estable también puede ofrecer

protección contra la agregación o precipitación de las proteínas disueltas en ella. Por ejemplo, las condiciones de almacenamiento en frío pueden implicar el almacenamiento en un frigorífico o congelador. En algunos ejemplos, las condiciones de almacenamiento en frío pueden implicar un almacenamiento convencional en frigorífico o congelador a una temperatura de 10 °C o menos. En otros ejemplos, las condiciones de almacenamiento en frío implican el almacenamiento a una temperatura de entre 2 ° y 10 °C aproximadamente. En otros ejemplos, las condiciones de almacenamiento en frío implican el almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 4 °C. En otros ejemplos, las condiciones de almacenamiento en frío implican el almacenamiento a una temperatura de congelación como, por ejemplo, 0 °C o inferior. En otro ejemplo, las condiciones de almacenamiento en frío implican el almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -30 °C a aproximadamente 0 °C. Las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente pueden implicar el almacenamiento a temperaturas ambiente, por ejemplo, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C. La estabilidad a temperaturas elevadas, por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50°C, puede utilizarse como parte de un estudio de envejecimiento acelerado para predecir el almacenamiento a largo plazo en condiciones ambientales típicas (10-30 °C).

Es bien sabido para los expertos en la técnica de la ciencia y la ingeniería de polímeros que las proteínas en solución tienden a formar enredos, que pueden limitar la movilidad translacional de las cadenas enredadas e interferir con la eficacia terapéutica o no terapéutica de la proteína. En las realizaciones, los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria pueden suprimir la agrupación de proteínas debido a interacciones específicas entre el compuesto excipiente y la proteína diana en solución. Los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria pueden ser naturales o sintéticos, y es deseable que sean sustancias generalmente reconocidas como seguras ("GRAS") por la FDA.

1. Definiciones

A efectos de la presente divulgación, el término "proteína" se refiere a una secuencia de aminoácidos con una longitud de cadena lo suficientemente larga como para producir una estructura terciaria discreta, que por lo general tiene un peso molecular entre 1-3000 kD. En algunas realizaciones, el peso molecular de la proteína está entre 50-200 kD; en otras realizaciones, el peso molecular de la proteína está entre 20-1000 kD o entre 20-2000 kD. A diferencia del término "proteína", el término "péptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que no tiene una estructura terciaria discreta. Una amplia variedad de biopolímeros se incluyen en el ámbito del término "proteína". Por ejemplo, el término "proteína" puede referirse a proteínas terapéuticas o no terapéuticas, incluidos anticuerpos, aptámeros, proteínas de fusión, proteínas PEGiladas, polipéptidos sintéticos, fragmentos de proteínas, lipoproteínas, enzimas, péptidos estructurales y similares.

Como ejemplos no limitantes, las proteínas terapéuticas pueden incluir proteínas de mamíferos tales como hormonas y prohormonas (por ejemplo, insulina y proinsulina, glucagón, calcitonina, hormonas tiroideas (T3 o T4 u hormona estimulante de la tiroides), hormona paratiroidea, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona del crecimiento, factor liberador de la hormona del crecimiento y similares); factores de coagulación y anticoagulantes (por ejemplo, factor tisular, factor de von Willebrand, factor VIIIC, factor IX, proteína C, activadores del plasminógeno (uroquinasa, activadores del plasminógeno de tipo tisular), trombina); citocinas, quimiocinas y mediadores de la inflamación; interferones; factores estimulantes de colonias; interleucinas (por ejemplo, IL-1 a IL-10); factores de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante, factores de crecimiento neurotrófico, factor de crecimiento similar a la insulina y similares); albúminas; colágenos y elastinas; factores hematopoyéticos (por ejemplo, eritropoyetina, trombopoyetina y similares); factores osteoinductores (por ejemplo, proteína morfogenética ósea); receptores (por ejemplo, integrinas, cadherinas y similares); proteínas de la membrana superficial; proteínas de transporte; proteínas reguladoras; proteínas antigénicas (por ejemplo, un componente viral que actúa como antígeno); y anticuerpos. El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria en su sentido más amplio, para incluir como ejemplos no limitantes los anticuerpos monoclonales (incluidos, por ejemplo, los anticuerpos de longitud completa con una región Fc de inmunoglobulina), las moléculas de cadena simple, los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos, los diacuerpos, las composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitípica y los fragmentos de anticuerpos (incluidos, por ejemplo, Fab, Fv y F(ab')2). Los anticuerpos también pueden denominarse "inmunoglobulinas". Se entiende que un anticuerpo está dirigido contra un "antígeno" proteico o no proteico específico, que es un material biológicamente importante; la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo a un paciente puede formar un complejo con el antígeno, alterando así sus propiedades biológicas de modo que el paciente experimente un efecto terapéutico.

Las proteínas pueden estar PEGiladas, lo que significa que comprenden unidades de polietilenílico ("PEG") y/o polipropilenílico ("PPG"). Las proteínas PEGiladas, o conjugados PEG-proteína, han encontrado utilidad en aplicaciones terapéuticas debido a sus propiedades beneficiosas tales como solubilidad, farmacocinética, farmacodinámica, inmunogenicidad, aclaramiento renal y estabilidad. Ejemplos no limitantes de proteínas pEGiladas son los interferones pEGilados (PEG-IFN), los anti-VEGF PEGilados, los fármacos conjugados con proteínas PEG, Adagen, Pegaspargasa, Pegfilgrastim, Pegloticase, Pegvisomant, epoetina-β PEGilada y Certolizumab pegol.

- Las proteínas PEGiladas pueden sintetizarse por una variedad de procedimientos tales como una reacción de la proteína con un reactivo PEG que tenga uno o más grupos funcionales reactivos. Los grupos funcionales reactivos del reactivo de PEG pueden formar un enlace con la proteína en lugares específicos de la proteína tal como la lisina, la histidina, la cisteína y el extremo N-terminal. Los reactivos típicos de PEGilación tienen grupos funcionales reactivos tales como aldehídos, maleimidas o succinimidas que tienen una reactividad específica con los residuos de aminoácidos de las proteínas. Los reactivos de PEGilación pueden tener una longitud de cadena de PEG de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 unidades de repetición de PEG y/o PPG. Otros procedimientos de PEGilación incluyen la glico-PEGilación, en la que la proteína es primero glicosilada y luego los residuos glicosilados son PEGilados en una segunda etapa. Determinados procedimientos de PEGilación son asistidos por enzimas como la sialiltransferasa y la transglutaminasa.
- Aunque las proteínas PEGiladas pueden ofrecer ventajas terapéuticas sobre las proteínas nativas no PEGiladas, estos materiales pueden tener propiedades físicas o químicas que dificulten su purificación, disolución, filtración, concentración y administración. La PEGilación de una proteína puede conducir a una mayor viscosidad de la solución en comparación con la proteína nativa, y esto generalmente requiere la formulación de soluciones de proteínas PEGiladas a concentraciones más bajas.
- Es deseable formular terapéuticos proteicos en soluciones estables y de baja viscosidad para que puedan administrarse a los pacientes en un volumen mínimo de inyección. Por ejemplo, la inyección subcutánea (SC) o intramuscular (IM) de fármacos generalmente requiere un pequeño volumen de inyección, preferentemente menor que 2 ml. Las vías de inyección SC e IM se adaptan bien a la atención autoadministrada, y se trata de una forma de tratamiento menos costosa y más accesible en comparación con la inyección intravenosa (IV), que sólo se realiza bajo supervisión médica directa. Las formulaciones para inyección SC o IM requieren una baja viscosidad de la solución, generalmente menor que 30 cP (0,03 Pa.s), y preferentemente menor que 20 cP (0,02 Pa.s), para permitir un fácil flujo de la solución terapéutica a través de una aguja de calibre estrecho. Esta combinación de pequeño volumen de inyección y requisitos de baja viscosidad supone un reto para el uso de terapias proteicas PEGiladas en vías de inyección SC o IM.
- Las proteínas que tienen efectos terapéuticos pueden denominarse "proteínas terapéuticas"; las formulaciones que contienen proteínas terapéuticas en cantidades terapéuticamente eficaces pueden denominarse "formulaciones terapéuticas". La proteína terapéutica contenida en una formulación terapéutica también puede denominarse su "principio activo proteico". Por lo general, una formulación terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo proteico y un excipiente, con o sin otros componentes opcionales. En la presente memoria, el término "terapéutico" incluye tanto el tratamiento de trastornos existentes como la prevención de trastornos.
- Un "tratamiento" incluye cualquier medida destinada a curar, sanar, aliviar, mejorar, remediar o afectar de otro modo beneficiosamente al trastorno, incluida la prevención o el retraso de la aparición de los síntomas y/o el alivio o la mejora de los síntomas del trastorno. Entre los pacientes que necesitan un tratamiento se incluyen tanto los que ya padecen un trastorno específico como aquellos para los que es deseable la prevención de un trastorno. Un trastorno es cualquier condición que altere el bienestar homeostático de un mamífero, incluidas las enfermedades agudas o crónicas, o las condiciones patológicas que predisponen al mamífero a una enfermedad aguda o crónica. Ejemplos no limitantes de trastornos incluyen cánceres, trastornos metabólicos (por ejemplo, diabetes), trastornos alérgicos (por ejemplo, asma), trastornos dermatológicos, trastornos cardiovasculares, trastornos respiratorios, trastornos hematológicos, trastornos musculosqueléticos, trastornos inflamatorios o reumáticos, trastornos autoinmunes, trastornos gastrointestinales, trastornos urológicos, trastornos sexuales y reproductivos, trastornos neurológicos, y similares. El término "mamífero" a efectos del tratamiento puede referirse a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, los animales domésticos, los animales de compañía, los animales de granja, los animales deportivos, los animales de trabajo y similares. Por lo tanto, un "tratamiento" puede incluir tanto tratamientos veterinarios como humanos. Por comodidad, el mamífero sometido a dicho "tratamiento" puede denominarse "paciente". En determinadas realizaciones, el paciente puede ser de cualquier edad, incluidos los animales fetales *in utero*.
- El tratamiento puede consistir en proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación terapéutica a un mamífero que la necesite. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la concentración mínima de la proteína terapéutica administrada al mamífero que la necesita para tratar un trastorno existente o prevenir un trastorno previsto (siendo tal tratamiento o prevención una "intervención terapéutica"). Las cantidades terapéuticamente eficaces de diversas proteínas terapéuticas que pueden incluirse como ingredientes activos en la formulación terapéutica pueden ser conocidas en la técnica; o, para las proteínas terapéuticas descubiertas o aplicadas a intervenciones terapéuticas en lo sucesivo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse mediante técnicas estándar llevadas a cabo por quienes tengan conocimientos ordinarios en la técnica, sin utilizar más que la experimentación rutinaria.
- Las proteínas utilizadas para fines no terapéuticos (es decir, fines que no implican tratamientos), tales como aplicaciones domésticas, nutricionales, comerciales e industriales, pueden denominarse "proteínas no terapéuticas". Las formulaciones que contienen proteínas no terapéuticas pueden denominarse "formulaciones no terapéuticas". Las proteínas no terapéuticas pueden derivarse de fuentes vegetales, fuentes animales o producirse

a partir de cultivos celulares; también pueden ser enzimas o proteínas estructurales. Las proteínas no terapéuticas pueden utilizarse en aplicaciones domésticas, nutricionales, comerciales e industriales tales como catalizadores, nutrición humana y animal, coadyuvantes de procesamiento, limpiadores y tratamiento de residuos.

- 5 Una categoría importante de biopolímeros no terapéuticos son las enzimas. Las enzimas tienen numerosas aplicaciones no terapéuticas, por ejemplo, como catalizadores, ingredientes nutricionales humanos y animales, coadyuvantes de procesamiento, limpiadores y agentes de tratamiento de residuos. Los catalizadores enzimáticos se utilizan para acelerar una variedad de reacciones químicas. Ejemplos de catalizadores enzimáticos para usos no terapéuticos incluyen catalasas, oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Los usos nutricionales humanos y animales de las enzimas incluyen nutracéuticos, fuentes nutritivas de proteínas, 10 quelación o administración controlada de micronutrientes, coadyuvantes para la digestión y suplementos; pueden derivarse de amilasa, proteasa, tripsina, lactasa y similares. Los coadyuvantes de procesamiento enzimáticos se utilizan para mejorar la producción de alimentos y bebidas en operaciones como horneado, elaboración de cerveza, fermentación, procesamiento de jugos y elaboración de vino. Ejemplos de estos coadyuvantes de procesamiento para alimentos y bebidas incluyen las amilasas, las celulasas, las pectinonas, las glucanasas, las lipasas y las 15 lactonas. Las enzimas también pueden utilizarse en la producción de biocombustibles. El etanol para biocombustibles, por ejemplo, puede verse favorecido por la degradación enzimática de materias primas de biomasa tales como los materiales celulosicos y lignocelulosicos. El tratamiento de estas materias primas con celulasas y ligninasas transforma la biomasa en un sustrato que puede fermentarse para obtener combustibles. 20 En otras aplicaciones comerciales, las enzimas se utilizan como detergentes, limpiadores y quitamanchas para la colada, el lavado de vajilla, la limpieza de superficies y la limpieza de equipos. Las enzimas típicas para este fin incluyen proteasas, celulasas, amilasas y lipasas. Además, las enzimas no terapéuticas se utilizan en una variedad procedimientos comerciales e industriales, tales como el ablandamiento de textiles con celulasas, el tratamiento 25 del cuero, el tratamiento de residuos, el tratamiento de sedimentos contaminados, el tratamiento del agua, el blanqueo de la pulpa y el ablandamiento y despegado de la pulpa. Las enzimas típicas para estos fines son las amilasas, las xilaninas, las celulasas y las ligninasas.
- Otros ejemplos de biopolímeros no terapéuticos incluyen proteínas fibrosas o estructurales tales como queratinas, 30 colágeno, gelatina, elastina, fibrofina, actina, tubulina o las formas hidrolizadas, degradadas o derivadas de las mismas. Estos materiales se utilizan en la preparación y formulación de ingredientes alimentarios tales como la gelatina, el helado, el yogur y los dulces; también se agregan a los alimentos como espesantes, modificadores reológicos, mejoradores de la sensación en boca y como fuente de proteínas nutritivas. En la industria cosmética y de cuidado personal, el colágeno, la elastina, la queratina y la queratina hidrolizada se utilizan ampliamente como 35 ingredientes en formulaciones para el cuidado de la piel y el cabello. Otros ejemplos de biopolímeros no terapéuticos son las proteínas del suero, como la betalactoglobulina, la alfa-lactalbúmina y la albúmina sérica. Estas proteínas del lactosuero se producen a gran escala como subproducto de las operaciones lácteas y se han utilizado para diversas aplicaciones no terapéuticas.

2. Formulaciones terapéuticas

- Las formulaciones y procedimientos divulgados en la presente memoria pueden proporcionar formulaciones líquidas estables de viscosidad mejorada o reducida, que comprenden una proteína terapéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz y un compuesto excipiente. En las realizaciones, la formulación puede mejorar la 40 estabilidad al tiempo que proporciona una concentración aceptable de ingredientes activos y una viscosidad aceptable. En las realizaciones, la formulación proporciona una mejora de la estabilidad en comparación con una formulación de control; a efectos de la presente divulgación, una formulación de control es una formulación que contiene el principio activo proteico y que es idéntica en peso seco en todos los aspectos a la formulación terapéutica, excepto en que carece del compuesto excipiente. En las realizaciones, la mejora de la estabilidad de 45 la formulación que contiene proteínas se manifiesta en forma de un menor porcentaje de agregados solubles, partículas, partículas subvisibles o formación de gel, en comparación con una formulación de control.

- Se entiende que la viscosidad de una formulación proteica líquida puede verse afectada por diversos factores, entre los que se incluyen: la naturaleza de la propia proteína (p. ej., enzima, anticuerpo, receptor, proteína de fusión, etc.); su tamaño, estructura tridimensional, composición química y peso molecular; su concentración en la formulación; los componentes de la formulación además de la proteína; el intervalo de pH deseado; las condiciones de almacenamiento de la formulación; y el procedimiento de administración de la formulación al paciente. Las 50 proteínas terapéuticas más adecuadas para su uso con los compuestos excipientes descritos en la presente memoria son preferentemente esencialmente puras, es decir, libres de proteínas contaminantes. En las realizaciones, una proteína terapéutica "esencialmente pura" es una composición proteica que comprende al menos el 90 % en peso de la proteína terapéutica, o preferentemente al menos el 95 % en peso, o más preferentemente, al menos el 99 % en peso, todo ello basado en el peso total de proteínas terapéuticas y proteínas 55 contaminantes en la composición. En aras de la claridad, una proteína agregada como excipiente no debe incluirse en esta definición. Las formulaciones terapéuticas descritas en la presente memoria están pensadas para su uso como formulaciones de grado farmacéutico, es decir, formulaciones destinadas a su uso en el tratamiento de un mamífero, en una forma tal que pueda lograrse la eficacia terapéutica deseada del principio activo proteico, y sin 60 contener componentes que sean tóxicos para el mamífero al que se va a administrar la formulación.

Según el primer aspecto, la formulación terapéutica contiene al menos 100 mg/ml de anticuerpo. En las realizaciones, la formulación terapéutica contiene al menos 200 mg/ml de anticuerpo. En otras realizaciones, la solución de formulación terapéutica contiene al menos 300 mg/ml de anticuerpo. Según el primer aspecto, la cafeína se agrega en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg/ml. En las realizaciones,

5 el compuesto excipiente puede agregarse en una cantidad de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/ml. En las realizaciones, el excipiente puede agregarse en una cantidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mg/ml.

Los compuestos excipientes de diversos pesos moleculares se seleccionan por sus propiedades ventajosas específicas cuando se combinan con el principio activo proteico en una formulación. A continuación se proporcionan ejemplos de formulaciones terapéuticas que comprenden compuestos excipientes. En las realizaciones, los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria se agregan a la formulación terapéutica en una cantidad que reduce la viscosidad. En las realizaciones, una cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 10 % en comparación con una formulación de control; a efectos de la presente divulgación, una formulación de control es

10 una formulación que contiene el principio activo proteico y que es idéntica en peso seco en todos los aspectos a la formulación terapéutica, excepto en que carece del compuesto excipiente. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 30 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos en un

15 50 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad que reduce la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 70 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos en un 90 % en comparación con la formulación de control.

20 25 En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad produce una formulación terapéutica con una viscosidad menor que 100 cP (0,1 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación terapéutica tiene una viscosidad menor que 50 cP (0,05 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación terapéutica tiene una viscosidad menor que 20 cP (0,02 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación terapéutica tiene una viscosidad menor que 10 cP (0,01 Pa.s). El término "viscosidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un valor de viscosidad dinámica cuando se mide mediante los procedimientos divulgados en la presente memoria.

30 35 Las formulaciones terapéuticas de acuerdo con esta divulgación tienen determinadas propiedades ventajosas. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas son resistentes a la degradación por cizallamiento, la separación de fases, el enturbiamiento, la precipitación y la desnaturalización. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas se procesan, purifican, almacenan, jeringan, dosifican, filtran y centrifugan con mayor eficacia, en comparación con una formulación de control. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas se administran a un paciente con una concentración elevada de proteína terapéutica. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas se administran a los pacientes con menos molestias que las que experimentarían con una formulación similar carente del excipiente terapéutico. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas se administran en forma de inyección de depósito. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas prolongan la semivida de la proteína terapéutica en el organismo. Estas características de las formulaciones terapéuticas divulgadas en la presente memoria permitirían la administración de dichas formulaciones mediante inyección intramuscular o subcutánea en una situación clínica, es decir, una situación en la que la aceptación por parte del paciente de una inyección intramuscular incluiría el uso de agujas de pequeño calibre típicas para fines IM/SC y el uso de un volumen inyectado tolerable (por ejemplo, 2-3 cc), y en la que estas condiciones dan lugar a la administración de una cantidad eficaz de la formulación en una única inyección en un único punto de inyección. Por el contrario, la inyección de una cantidad de dosificación comparable de la proteína terapéutica utilizando técnicas de formulación convencionales estaría limitada por la mayor viscosidad de la formulación convencional, de modo que una inyección SC/IM de la formulación convencional no sería adecuada para una situación clínica.

40 45 50 55 En las realizaciones, el excipiente terapéutico tiene propiedades antioxidantes que estabilizan la proteína terapéutica frente al daño oxidativo. En las realizaciones, la formulación terapéutica se almacena a temperatura ambiente o durante un tiempo prolongado en condiciones de refrigeración sin pérdida apreciable de la potencia de la proteína terapéutica. En las realizaciones, la formulación terapéutica se seca para almacenarla hasta que se necesite; entonces se reconstituye con un disolvente apropiado, por ejemplo, agua. Ventajosamente, las formulaciones preparadas como se describe en la presente memoria pueden ser estables durante un período prolongado de tiempo, de meses a años. Cuando se desean períodos de almacenamiento excepcionalmente largos, las formulaciones pueden conservarse en un congelador (y reactivarse posteriormente) sin temor a la desnaturalización de las proteínas. En las realizaciones, las formulaciones pueden prepararse para un almacenamiento a largo plazo que no requiera refrigeración.

60 Los procedimientos para preparar formulaciones terapéuticas pueden ser familiares para los expertos. Las formulaciones terapéuticas de la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, agregando el compuesto excipiente a la formulación antes o después de agregar la proteína terapéutica a la solución. La formulación terapéutica puede, por ejemplo, producirse combinando la proteína terapéutica y el excipiente a una primera

concentración (más baja) y luego procesarse por filtración o centrifugación para producir una segunda concentración (más alta) de la proteína terapéutica. Las formulaciones terapéuticas pueden hacerse con uno o más de los compuestos excipientes con caótropos, kosmótróplos, hidrotropos y sales. Las formulaciones terapéuticas pueden realizarse con uno o más de los compuestos excipientes mediante técnicas tales como la encapsulación, la dispersión, el liposoma, la formación de vesículas y similares. Los procedimientos para preparar formulaciones terapéuticas que comprenden los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria pueden incluir combinaciones de los compuestos excipientes. En las realizaciones, las combinaciones de excipientes pueden reducir la viscosidad, mejorar la estabilidad o disminuir el dolor en el punto de inyección. Pueden introducirse otros aditivos en las formulaciones terapéuticas durante su fabricación, como conservantes, tensioactivos, azúcares, sacarosa, trehalosa, polisacáridos, arginina, prolina, hialuronidasa, estabilizadores, tampones y similares. Como se utiliza en la presente memoria, un compuesto excipiente farmacéuticamente aceptable es aquel que no es tóxico y es adecuado para la administración animal y/o humana.

3. Formulaciones no terapéuticas

En un aspecto, las formulaciones y procedimientos divulgados en la presente memoria proporcionan formulaciones líquidas estables de viscosidad mejorada o reducida, que comprenden una proteína no terapéutica en una cantidad eficaz y un compuesto excipiente. En las realizaciones, la formulación mejora la estabilidad al tiempo que proporciona una concentración aceptable de ingredientes activos y una viscosidad aceptable. En las realizaciones, la formulación proporciona una mejora de la estabilidad en comparación con una formulación de control; a efectos de la presente divulgación, una formulación de control es una formulación que contiene el principio activo proteico y que es idéntica en peso seco en todos los aspectos a la formulación no terapéutica, excepto en que carece del compuesto excipiente.

Se entiende que la viscosidad de una formulación proteica líquida puede verse afectada por diversos factores, entre los que se incluyen: la naturaleza de la propia proteína (por ejemplo, enzima, proteína estructural, grado de hidrólisis, etc.); su tamaño, estructura tridimensional, composición química y peso molecular; su concentración en la formulación; los componentes de la formulación además de la proteína; el intervalo de pH deseado; y las condiciones de almacenamiento de la formulación.

En las realizaciones, la formulación no terapéutica contiene al menos 25 mg/ml de principio activo proteico. En otras realizaciones, la formulación no terapéutica contiene al menos 100 mg/ml de principio activo proteico. En otras realizaciones, la formulación no terapéutica contiene al menos 200 mg/ml de principio activo proteico. En otras realizaciones más, la solución de formulación no terapéutica contiene al menos 300 mg/ml de principio activo proteico. Generalmente, los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria se agregan a la formulación no terapéutica en una cantidad entre aproximadamente 5 y aproximadamente 300 mg/ml. En las realizaciones, el compuesto excipiente se agrega en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg/ml. En las realizaciones, el compuesto excipiente se agrega en una cantidad de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/ml. En las realizaciones, el excipiente se agrega en una cantidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mg/ml.

Los compuestos excipientes de diversos pesos moleculares se seleccionan por sus propiedades ventajosas específicas cuando se combinan con el principio activo proteico en una formulación. A continuación se proporcionan ejemplos de formulaciones no terapéuticas que comprenden compuestos excipientes.

En las realizaciones, los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria se agregan a la formulación no terapéutica en una cantidad que reduce la viscosidad. En las realizaciones, una cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 10 % en comparación con una formulación de control; a efectos de la presente divulgación, una formulación de control es una formulación que contiene el principio activo proteico y que es idéntica en peso seco en todos los aspectos a la formulación terapéutica, excepto en que carece del compuesto excipiente. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 30 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 50 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad que reduce la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 70 % en comparación con la formulación de control. En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad es la cantidad de un compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación al menos un 90 % en comparación con la formulación de control.

En las realizaciones, la cantidad reductora de la viscosidad produce una formulación no terapéutica con una viscosidad menor que 100 cP (0,1 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación no terapéutica tiene una viscosidad menor que 50 cP (0,05 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación no terapéutica tiene una viscosidad menor que 20 cP (0,2 Pa.s). En otras realizaciones, la formulación no terapéutica tiene una viscosidad menor que 10 cP (0,1 Pa.s). El término "viscosidad", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un valor de viscosidad dinámica.

Las formulaciones no terapéuticas de acuerdo con esta divulgación pueden tener determinadas propiedades ventajosas. En las realizaciones, las formulaciones no terapéuticas son resistentes a la degradación por cizallamiento, separación de fases, enturbiamiento, precipitación y desnaturización. En las realizaciones, las formulaciones terapéuticas pueden procesarse, purificarse, almacenarse, bombearse, filtrarse y centrifugarse con mayor eficacia, en comparación con una formulación de control.

En las realizaciones, el excipiente no terapéutico tiene propiedades antioxidantes que estabilizan la proteína no terapéutica frente al daño oxidativo. En las realizaciones, la formulación no terapéutica se almacena a temperatura ambiente, o durante un tiempo prolongado en condiciones de refrigeración sin pérdida apreciable de potencia de la proteína no terapéutica. En las realizaciones, la formulación no terapéutica se seca para almacenarla hasta que se necesite; entonces puede reconstituirse con un disolvente apropiado, por ejemplo, agua. Ventajosamente, las formulaciones preparadas como se describe en la presente memoria son estables durante un período prolongado de tiempo, de meses a años. Cuando se desean períodos de almacenamiento excepcionalmente largos, las formulaciones se conservan en un congelador (y se reactivan posteriormente) sin temor a la desnaturización de las proteínas. En las realizaciones, las formulaciones se preparan para un almacenamiento a largo plazo que no requiere refrigeración.

Los procedimientos para preparar formulaciones no terapéuticas que comprenden los compuestos excipientes divulgados en la presente memoria pueden ser familiares para los expertos. Por ejemplo, el compuesto excipiente puede agregarse a la formulación antes o después de agregar la proteína no terapéutica a la solución. La formulación no terapéutica puede producirse a una primera concentración (más baja) y luego procesarse por filtración o centrifugación para producir una segunda concentración (más alta). Las formulaciones no terapéuticas pueden hacerse con uno o más de los compuestos excipientes con caótropos, kosmótopos, hidrotropos y sales. Las formulaciones no terapéuticas pueden realizarse con uno o más de los compuestos excipientes mediante técnicas tales como la encapsulación, la dispersión, el liposoma, la formación de vesículas y similares. Pueden introducirse otros aditivos en las formulaciones no terapéuticas durante su fabricación, como conservantes, tensioactivos, estabilizantes y similares.

4. Compuestos excipientes

En la presente memoria se describen varios compuestos excipientes, cada uno de ellos adecuado para su uso con una o más proteínas terapéuticas o no terapéuticas, y cada uno de ellos permite componer la formulación de modo que contenga la(s) proteína(s) a una concentración elevada. Algunas de las categorías de compuestos excipientes que se describen a continuación son: (1) aminas impedidas; (2) aromáticos aniónicos; (3) aminoácidos funcionalizados; y (4) oligopéptidos. Sin estar limitados por la teoría, se cree que los compuestos excipientes descritos en la presente memoria se asocian con determinados fragmentos, secuencias, estructuras o secciones de una proteína terapéutica que, de otro modo, estarían implicados en interacciones interpartículas (es decir, proteína-proteína). La asociación de estos compuestos excipientes con la proteína terapéutica o no terapéutica puede enmascarar las interacciones interproteicas de forma que las proteínas puedan formularse en alta concentración sin causar una viscosidad excesiva de la solución. Ventajosamente, los compuestos excipientes pueden ser solubles en agua, por lo que son adecuados para su uso con vehículos acuosos. En las realizaciones, los compuestos excipientes tienen una solubilidad en agua de >10 mg/ml. En las realizaciones, los compuestos excipientes tienen una solubilidad en agua de >100 mg/ml. En las realizaciones, los compuestos excipientes tienen una solubilidad en agua de >500 mg/ml. Ventajosamente para las proteínas terapéuticas, los compuestos excipientes pueden derivarse de materiales biológicamente aceptables y no inmunogénicos, por lo que son adecuados para su uso farmacéutico. En las realizaciones terapéuticas, los compuestos excipientes pueden metabolizarse en el organismo para producir subproductos biológicamente compatibles y no inmunogénicos.

a. Compuesto excipiente categoría 1: Aminas impedidas

Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con pequeñas moléculas de aminas impedidas como compuestos excipientes. Como se utiliza en la presente memoria, el término "amina impedida" se refiere a una molécula pequeña que contiene al menos un grupo voluminoso o impedido estéricamente, de acuerdo con los ejemplos siguientes. Las aminas impedidas pueden utilizarse en forma de base libre, en forma protonada o en una combinación de ambas. En las formas protonadas, las aminas impedidas pueden asociarse con un contrión aniónico tal como cloruro, hidróxido, bromuro, yoduro, fluoruro, acetato, formiato, fosfato, sulfato o carboxilato. Los compuestos de amina impedida útiles como compuestos excipientes pueden contener grupos de amina secundaria, amina terciaria, amonio cuaternario, piridinio, pirrolidona, pirrolidina, piperidina, morfolina o guanidinio, de manera que el compuesto excipiente tenga una carga catiónica en solución acuosa a pH neutro. Los compuestos de amina impedida también contienen al menos un grupo voluminoso o estéricamente impedido, tal como grupos aromáticos cíclicos, cicloalifáticos, ciclohexílicos o alquílicos. El grupo estéricamente impedido puede ser a su vez un grupo amina, como una dialquilmamina, trialquilamina, guanidinio, piridinio o un grupo de amonio cuaternario. Sin pretender estar ligado por la teoría, se cree que los compuestos de aminas impedidas se asocian con secciones aromáticas de las proteínas, como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina, mediante una interacción catión pi. El grupo catiónico de la amina impedida puede tener afinidad por la estructura pi rica en electrones de los residuos de aminoácidos aromáticos de la proteína, de modo que pueden

proteger estas secciones de la proteína, disminuyendo así la tendencia de dichas proteínas protegidas a asociarse y aglomerarse.

- Los compuestos excipientes de amina impedida pueden tener una estructura química que comprenda grupos imidazol, imidazolina o imidazolidina, o sales de los mismos, tales como imidazol, 1-metilimidazol, 4-metilimidazol, cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio, histamina, 4-metilhistamina, alfa-metilhistamina, betahistina, beta-alanina, 2-metil-2-imidazolina, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, ácido úrico, urato potásico, betazol, carnosina, aspartamo, sacarina, acesulfamo potásico, xantina, teofilina, teobromina, cafeína y anserina. El compuesto excipiente de amina impedida puede seleccionarse del grupo que consiste en dimetiletanolamina, dimetilaminopropilamina, trietanolamina, dimetilbencilamina, dimetilciclohexilamina, dietilciclohexilamina, diciclohexilmethylamina, biguanida de hexametileno, poli(biguanida de hexametileno), imidazol, dimetilglicina, agmatina, diazabicielo[2.2.2]octano, tetrametiletilendiamina, N,N-dimetiletanolamina, fosfato de etanolamina, glucosamina, cloruro de colina, fosfocolina, niacinamida, isonicotinamida, N,N-dietil nicotinamida, sal sódica de ácido nicotínico, tiramina, 3-aminopiridina, 2,4,6-trimetilpiridina, 3-piridina metanol, nicotinamida adenosina dinucleótido, biotina, morfolina, N-metilpirrolidona, 2-pirrolidinona, procaína, lidocaína, aducto diciandiamida-taurina, 2-piridiletilamina, aducto diciandiamida-bencilamina, aducto diciandiamida-alquilamina, aductos diciandiamida-aminometano-ácido fosfónico. Un compuesto de amina impedida consistente con esta divulgación se formula como una sal de amonio protonada. Un compuesto de amina impedida consistente con esta divulgación se formula como una sal con un anión inorgánico o un anión orgánico como el contraíón. Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas se formulan con una combinación de cafeína con un ácido benzoico, un ácido hidroxibenzoico o un ácido bencenosulfónico como compuestos excipientes. El compuesto excipiente de amina impedida puede metabolizarse en el organismo para producir subproductos biológicamente compatibles. Según el primer aspecto, la cafeína está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En algunas realizaciones, la cafeína está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 120 mg/ml.
- Determinados compuestos excipientes de aminas impedidas pueden poseer otras propiedades farmacológicas. A modo de ejemplo, las xantinas son una categoría de aminas impedidas que tienen propiedades farmacológicas independientes, incluidas propiedades estimulantes y broncodilatadoras cuando se absorben sistémicamente. Algunas xantinas representativas son la cafeína, la aminofilina, la 3-isobutil-1-metilkantina, la paraxantina, la pentoxifilina, la teobromina, la teofilina y similares. Se entiende que las xantinas metiladas afectan a la fuerza de contracción cardiaca, la frecuencia cardiaca y la broncodilatación. El compuesto excipiente de xantina puede estar presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 30 mg/ml o menos.
- Otra categoría de aminas impedidas con propiedades farmacológicas independientes son los compuestos anestésicos inyectables locales. Los compuestos anestésicos inyectables locales son aminas impedidas que tienen una estructura molecular de tres componentes: (a) un anillo aromático lipofílico, (b) un enlace intermedio éster o amida, y (c) una amina secundaria o terciaria. Se entiende que esta categoría de aminas impedidas interrumpe la conducción neuronal al inhibir la afluencia de iones de sodio, induciendo así la anestesia local. El anillo aromático lipofílico de un compuesto anestésico local puede estar formado por átomos de carbono (por ejemplo, un anillo de benceno) o puede comprender heteroátomos (por ejemplo, un anillo de tiofeno). Los compuestos anestésicos inyectables locales representativos incluyen, pero no se limitan a, amilocaina, articaína, bupivacaína, butacaína, butanilicaína, clorprocaina, cocaína, ciclometicaína, dimetocaína, editocaína, hexilcaína, isobucaína, levobupivacaína, lidocaína, metabutetamina, metabutoxicaína, mepivacaína, meprilcaína, propoxicaína, prilocaina, procaína, piperocaína, tetracaína, trimecaína y similares. Los compuestos anestésicos inyectables locales pueden tener múltiples beneficios en las formulaciones terapéuticas proteicas, tales como la reducción de la viscosidad, la mejora de la estabilidad y la reducción del dolor tras la inyección. En algunas realizaciones, el compuesto anestésico local está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 50 mg/ml o menos.
- Una amina impedida con propiedades farmacológicas independientes puede utilizarse como compuesto excipiente de acuerdo con las formulaciones y procedimientos descritos en la presente memoria. Los compuestos excipientes que poseen propiedades farmacológicas independientes pueden estar presentes en una cantidad que no tenga un efecto farmacológico y/o que no sea terapéuticamente eficaz. Los compuestos excipientes que poseen propiedades farmacológicas independientes pueden estar presentes en una cantidad que tenga un efecto farmacológico y/o que sea terapéuticamente eficaz. Una amina impedida con propiedades farmacológicas independientes puede utilizarse en combinación con otro compuesto excipiente que haya sido seleccionado para disminuir la viscosidad de la formulación, donde la amina impedida con propiedades farmacológicas independientes se utiliza para impartir los beneficios de su actividad farmacológica. Por ejemplo, se puede utilizar un compuesto anestésico inyectable local para disminuir la viscosidad de la formulación y también para reducir el dolor tras la inyección de la formulación. La reducción del dolor de la inyección puede deberse a las propiedades anestésicas; también puede requerirse una menor fuerza de inyección cuando los excipientes reducen la viscosidad. Alternativamente, se puede utilizar un compuesto anestésico local inyectable para impartir el beneficio farmacológico deseable de disminución de la sensación local durante la inyección de la formulación, mientras se combina con otro compuesto excipiente que reduce la viscosidad de la formulación.

b. Compuesto excipiente categoría 2: Aromáticos aniónicos

Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con compuestos de moléculas pequeñas aromáticas aniónicas como compuestos excipientes. Los compuestos excipientes aromáticos aniónicos pueden contener un grupo funcional aromático como fenilo, bencilo, arilo, alquilbencilo, hidroxibencilo, fenólico, hidroxiarilo, grupo heteroaromático o un grupo aromático fusionado. Los compuestos excipientes aromáticos aniónicos también pueden contener un grupo funcional aniónico como carboxilato, óxido, fenóxido, sulfonato, sulfato, fosfonato, fosfato o sulfuro. Aunque los excipientes aromáticos aniónicos podrían describirse como un ácido, una sal sódica u otros, se entiende que el excipiente puede utilizarse en una variedad de formas de sal. Sin estar limitado por la teoría, se cree que un compuesto excipiente aromático aniónico es una molécula voluminosa, con impedimentos estéricos, que puede asociarse con segmentos catiónicos de una proteína, de modo que pueden proteger estas secciones de la proteína, disminuyendo así las interacciones entre las moléculas de proteína que hacen viscosa la formulación que contiene proteína.

Ejemplos de compuestos excipientes aromáticos aniónicos incluyen compuestos tales como ácido salicílico, ácido aminosalicílico, ácido hidroxibenzoico, ácido aminobenzoico, ácido paraaminobenzoico, ácido bencenosulfónico, ácido hidroxibencenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido hidroquinona sulfónico, ácido sulfanílico, ácido vainílico, vainillina, aducto vainillina-taurina, aminofenol, ácido antranílico, ácido cinámico, ácido cumárico, monofosfato de adenosina, ácido indol acético, urato potásico, ácido furano dicarboxílico, ácido furano-2-acrílico, ácido 2-furanpropiónico, fenilpiruvato sódico, hidroxifenilpiruvato sódico, ácido dihidroxibenzoico, ácido trihidroxibenzoico, pirogalol, ácido benzoico y las sales de los ácidos anteriores. Los compuestos excipientes aromáticos aniónicos pueden formularse en forma de sal ionizada. Un compuesto aromático aniónico puede formularse tal como sal de una amina impidiada, como el hidroxibenzoato de dimetilciclohexilamonio. Los compuestos excipientes aromáticos aniónicos pueden formularse con diversos contraíones, tales como cationes orgánicos. Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con compuestos excipientes aromáticos aniónicos y cafeína. Los compuestos excipientes aromáticos aniónicos pueden metabolizarse en el organismo para dar lugar a subproductos biológicamente compatibles.

c. Compuesto excipiente categoría 3: Aminoácidos funcionalizados

Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con uno o más aminoácidos funcionalizados, donde puede utilizarse como compuesto excipiente un aminoácido funcionalizado único o un oligopéptido que comprenda uno o más aminoácidos funcionalizados. Los compuestos de aminoácidos funcionalizados comprenden moléculas ("precursores de aminoácidos") que pueden hidrolizarse o metabolizarse para producir aminoácidos. Los aminoácidos funcionalizados pueden contener un grupo funcional aromático tal como fenilo, bencilo, arilo, alquilbencilo, hidroxibencilo, hidroxiarilo, grupo heteroaromático o un grupo aromático fusionado. Los compuestos de aminoácidos funcionalizados pueden contener aminoácidos esterificados, tales como ésteres de metilo, etilo, propilo, butilo, bencilo, cicloalquilo, glicerilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, PEG y PPG. Los compuestos de aminoácidos funcionalizados pueden seleccionarse del grupo que consiste en el éster etílico de arginina, el éster metílico de arginina, el éster hidroxietil de arginina y el éster hidroxipropílico de arginina. El compuesto aminoácido funcionalizado puede ser un compuesto iónico cargado en solución acuosa a pH neutro. Por ejemplo, un solo aminoácido puede derivatizarse formando un éster, como un acetato o un benzoato, y los productos de hidrólisis serían ácido acético o ácido benzoico, ambos materiales naturales, más el aminoácido. Los compuestos excipientes de aminoácidos funcionalizados pueden metabolizarse en el organismo para producir subproductos biológicamente compatibles.

d. Compuesto excipiente categoría 4: Oligopéptidos

Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con oligopéptidos como compuestos excipientes. El oligopéptido puede diseñarse de forma que la estructura tenga una sección cargada y una sección voluminosa. Los oligopéptidos pueden constar de entre 2 y 10 subunidades peptídicas. El oligopéptido puede ser bifuncional, por ejemplo un aminoácido catiónico acoplado a uno no polar, o uno aniónico acoplado a uno no polar. Los oligopéptidos pueden constar de entre 2 y 5 subunidades peptídicas. Los oligopéptidos pueden ser homopéptidos tales como el ácido poliglutámico, el ácido poliaspártico, la poli-lisina, la poli-arginina y la poli-histidina. Los oligopéptidos pueden tener una carga catiónica neta. Los oligopéptidos pueden ser heteropéptidos, como Trp2Lys3. El oligopéptido puede tener una estructura alternante, tal como un patrón de repetición ABA. El oligopéptido puede contener aminoácidos tanto aniónicos como catiónicos, por ejemplo, Arg-Glu. Sin estar limitados por la teoría, los oligopéptidos comprenden estructuras que pueden asociarse con proteínas de tal manera que reduce las interacciones intermoleculares que conducen a soluciones de alta viscosidad; por ejemplo, la asociación oligopéptido-proteína puede ser una interacción carga-carga, dejando que un aminoácido algo no polar interrumpe el enlace de hidrógeno de la capa de hidratación alrededor de la proteína, reduciendo por tanto la viscosidad. El excipiente oligopéptido está presente en la composición en una concentración de aproximadamente 50 mg/ml o menos.

e. Compuesto excipiente categoría 5: Ácidos orgánicos de cadena corta

Como se usa en la presente memoria, el término "ácidos orgánicos de cadena corta" se refiere a compuestos de ácidos orgánicos C2-C6 y sus sales, ésteres o lactonas. Esta categoría incluye ácidos carboxílicos saturados e insaturados, ácidos carboxílicos hidroxifuncionalizados y ácidos carboxílicos lineales, ramificados o cílicos. El grupo ácido del ácido orgánico de cadena corta es un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un ácido fosfónico o una sal de los mismos.

Además de las cuatro categorías de excipientes anteriores, las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con ácidos orgánicos de cadena corta, por ejemplo, las formas ácidas o salinas del ácido sórbico, el ácido valérico, el ácido propiónico, el ácido caproico y el ácido ascórbico como compuestos excipientes. Algunos ejemplos de compuestos excipientes de esta categoría son el sorbato potásico, la taurina, el propionato cálcico, el propionato magnésico y el ascorbato sódico.

f. Compuesto excipiente categoría 6: Poliácidos alifáticos de bajo peso molecular

Las soluciones de alta concentración de proteínas PEGiladas terapéuticas o no terapéuticas pueden formularse con determinados compuestos excipientes que permiten una menor viscosidad de la solución, donde dichos compuestos excipientes son poliácidos alifáticos de bajo peso molecular. Como se utiliza en la presente memoria, el término "poliácidos alifáticos de bajo peso molecular" se refiere a poliácidos alifáticos orgánicos que tienen un peso molecular < aproximadamente 1500, y que tienen al menos dos grupos ácidos, donde se entiende que un grupo ácido es una unidad estructural donadora de protones. Ejemplos no limitantes de grupos ácidos incluyen grupos carboxilato, fosfonato, fosfato, sulfonato, sulfato, nitrato y nitrito. Los grupos ácidos en el poliácido alifático de bajo peso molecular pueden estar en forma de sal aniónica como carboxilato, fosfonato, fosfato, sulfonato, sulfato, nitrato y nitrito; sus contraiones pueden ser sodio, potasio, litio y amonio. Ejemplos específicos de poliácidos alifáticos de bajo peso molecular útiles para interactuar con proteínas PEGiladas como se describe aquí incluyen ácido maleico, ácido tartárico, ácido glutárico, ácido malónico, ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido aspártico, ácido glutámico, ácido alendrónico, ácido etidrónico y sales de los mismos. Otros ejemplos de poliácidos alifáticos de bajo peso molecular en su forma de sal aniónica son el fosfato (PO_4^{3-}), el fosfato de hidrógeno (HPO_4^{3-}), el fosfato de dihidrógeno (H_2PO_4^-), el sulfato (SO_4^{2-}), el bisulfato (HSO_4^-), el pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), el carbonato (CO_3^{2-}) y el bicarbonato (HCO_3^-). El contraíón de las sales aniónicas puede ser ion de Na, Li, K o amonio. Estos excipientes también pueden utilizarse en combinación con otros excipientes. Como se utiliza en la presente memoria, el poliácido alifático de bajo peso molecular también puede ser un alfa hidroxiácido, donde hay un grupo hidroxilo adyacente a un primer grupo ácido, por ejemplo ácido glicólico, ácido láctico y ácido glucónico y sales de los mismos. El poliácido alifático de bajo peso molecular puede ser una forma oligomérica que lleve más de dos grupos ácidos, por ejemplo ácido poliacrílico, polifosfatos, polipéptidos y sales de los mismos. El excipiente poliácido alifático de bajo peso molecular puede estar presente en la composición en una concentración de aproximadamente 50 mg/ml o menos.

5. Soluciones de proteínas/excipientes: Propiedades y procedimientos

En determinadas realizaciones, las soluciones de proteínas terapéuticas o no terapéuticas se formulan con los compuestos excipientes identificados anteriormente, tales como aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopéptidos, ácidos orgánicos de cadena corta para dar lugar a una mejora de las características de interacción proteína-proteína según lo medido por el parámetro de interacción de difusión de proteínas, KD, o el segundo coeficiente viral, B22. Como se utiliza en la presente memoria, una "mejora" de las características de interacción proteína-proteína conseguida mediante formulaciones que utilizan los compuestos excipientes identificados anteriormente significa una disminución de las interacciones proteína-proteína. Estas mediciones de KD y B22 pueden realizarse mediante técnicas estándar en la industria, y pueden ser un indicador de la mejora de las propiedades de la solución o de la estabilidad de la proteína en solución. Por ejemplo, un valor de KD muy negativo puede indicar que la proteína tiene una fuerte interacción atractiva y esto puede provocar agregación, inestabilidad y problemas reológicos. Cuando se formula en presencia de algunos de los compuestos excipientes identificados anteriormente, la misma proteína puede tener un valor KD menos negativo, o un valor KD cercano o superior a cero.

En realizaciones, algunos de los compuestos excipientes descritos anteriormente, tales como aminas impedidas, aromáticos aniónicos, aminoácidos funcionalizados, oligopéptidos, ácidos orgánicos de cadena corta, y/o poliácidos alifáticos de bajo peso molecular se utilizan para mejorar un procedimiento relacionado con proteínas, tal como la fabricación, procesamiento, llenado estéril, purificación, y análisis de soluciones que contienen proteínas, utilizando procedimientos de procesamiento como filtración, jeringa, transferencia, bombeo, mezclado, calentamiento o enfriamiento por transferencia de calor, transferencia de gas, centrifugación, cromatografía, separación por membrana, concentración centrífuga, filtración de flujo tangencial, filtración de flujo radial, filtración de flujo axial, liofilización y electroforesis en gel. Estos procesos y procedimientos de procesado pueden tener una eficacia mejorada debido a la menor viscosidad, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada de las proteínas en la solución durante las etapas de fabricación, procesado, purificación y análisis. Además, los procedimientos relacionados con los equipos, como la limpieza, la esterilización y el mantenimiento de los equipos de

procesamiento de proteínas, pueden verse facilitados por el uso de los excipientes identificados anteriormente debido a la disminución de la suciedad, la desnaturalización, la viscosidad y la solubilidad de la proteína.

Las soluciones de alta concentración de proteínas terapéuticas formuladas con los compuestos excipientes descritos anteriormente pueden administrarse a los pacientes mediante jeringas precargadas.

5 Ejemplos

Materiales:

- Gammaglobulina bovina (BGG), pureza > 99 %, Sigma Aldrich
- Histidina, Sigma Aldrich
- Los demás materiales descritos en los ejemplos siguientes proceden de Sigma Aldrich, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Preparación de formulaciones que contienen compuestos excipientes y proteína de prueba

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica, o una proteína no terapéutica que se utilizaría en una formulación no terapéutica. Tales formulaciones se prepararon en clorhidrato de histidina 50 mM con diferentes compuestos excipientes para medir la viscosidad de la siguiente manera.

El clorhidrato de histidina se preparó primero disolviendo 1,94 g de histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en agua destilada y ajustando el pH a aproximadamente 6,0 con ácido clorhídrico 1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y diluyendo después hasta un volumen final de 250 ml con agua destilada en un matraz aforado. A continuación, los compuestos excipientes se disolvieron en HCl de histidina 50 mM. Las listas de excipientes se proporcionan a continuación en los ejemplos 4, 5, 6 y 7. En algunos casos, los compuestos excipientes se ajustaron a pH 6 antes de disolverlos en HCl de histidina 50 mM. En este caso, los compuestos del excipiente se disolvieron primero en agua desionizada a aproximadamente 5 % en peso y el pH se ajustó a aproximadamente 6,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. A continuación, la solución salina preparada se introdujo en un horno de convección de laboratorio a aproximadamente 150 grados Fahrenheit (aproximadamente 65 grados C) para evaporar el agua y aislar el excipiente sólido.

Una vez preparadas las soluciones de excipiente en HCl de histidina 50 mM, se disolvió la proteína de prueba (gammaglobulina bovina (BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) en una proporción aproximada de 0,336 g de BGG por 1 ml de solución de excipiente. El resultado fue una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en HCl de histidina 50 mM con excipiente se formularon en viales de 20 ml y se dejaron agitar a 100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche.

A continuación, las soluciones de BGG se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugaron durante diez minutos a 2300 rpm en una microcentrifuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

Ejemplo 2: Medición de la viscosidad

Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se describe en el ejemplo 1 se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados C. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron 2 etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y el posterior periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra.

Ejemplo 3: Medición de la concentración de proteínas

La concentración de la proteína en las soluciones experimentales se determinó midiendo la absorbancia de la solución de proteína a una longitud de onda de 280 nm en un espectrómetro UV/VIS (Perkin Elmer Lambda 35). En primer lugar, el instrumento se calibró a cero de absorbancia con un tampón de histidina 50 mM a pH 6. A continuación, las soluciones de proteínas se diluyeron por un factor de 300 con el mismo tampón de histidina y se registró la absorbancia a 280 nm. La concentración final de la proteína en la solución se calculó utilizando el valor del coeficiente de extinción de 1,264 ml/(mg x cm).

Ejemplo 4: Formulaciones con compuestos excipientes de aminas impedidas

Las formulaciones que contenían 280 mg/ml de BGG se prepararon como se describe en el ejemplo 1, con algunas muestras que contenían compuestos excipientes agregados. En estas pruebas, las sales de clorhidrato de dimetilciclohexilamina (DMCHA), diciclohexilmetilamina (DCHMA), dimetilaminopropilamina (DMAPA), trietanolamina (TEA), dimetiletanolamina (DMEA) y niacinamida se probaron como ejemplos de compuestos excipientes de aminas impedidas. También se probaron una sal de ácido hidroxibenzoico de DMCHA y un aducto

de taurina-dicandiamida como ejemplos de compuestos excipientes de aminas impedidas. La viscosidad de cada solución proteica se midió como se describe en el ejemplo 2, y los resultados se presentan en la tabla 1 a continuación, mostrando el beneficio de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 1

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
4,1	Ninguno	0	79 (0,079)	0 %
4,2	DMCHA-HCl	28	50 (0,050)	37 %
4,3	DMCHA-HCl	41	43 (0,043)	46 %
4,4	DMCHA-HCl	50	45 (0,045)	43 %
4,5	DMCHA-HCl	82	36 (0,036)	54 %
4,6	DMCHA-HCl	123	35 (0,035)	56 %
4,7	DMCHA-HCl	164	40 (0,040)	49 %
4,8	DMAPA-HCl	87	57 (0,057)	28 %
4,9	DMAPA-HCl	40	54 (0,054)	32 %
4,10	DCHMA-HCl	29	51 (0,051)	35 %
4,11	DCHMA-HCl	50	51 (0,051)	35 %
4,14	TEA-HCl	97	51 (0,051)	35 %
4,15	TEA-HCl	38	57 (0,057)	28 %
4,16	DMEA-HCl	51	51 (0,051)	35 %
4,17	DMEA-HCl	98	47 (0,047)	41 %
4,20	DMCHA-hidroxibenzoato	67	46 (0,046)	42 %
4,21	DMCHA-hidroxibenzoato	92	42 (0,042)	47 %
4,22	Producto del ejemplo 8	26	58 (0,058)	27 %
4,23	Producto del ejemplo 8	58	50 (0,050)	37 %
4,24	Producto del ejemplo 8	76	49 (0,049)	38 %
4,25	Producto del ejemplo 8	103	46 (0,046)	42 %
4,26	Producto del ejemplo 8	129	47 (0,047)	41 %
4,27	Producto del ejemplo 8	159	42 (0,042)	47 %
4,28	Producto del ejemplo 8	163	42 (0,042)	47 %
4,29	Niacinamida	48	39 (0,039)	51 %
4,30	N-metil-2-pirrolidona	30	45 (0,045)	43 %
4,31	N-Metil-2-pirrolidona	52	52 (0,052)	34 %

5

Ejemplo 5: Formulaciones con compuestos excipientes aromáticos aniónicos

Se prepararon formulaciones de 280 mg/ml de BGG como se describe en el ejemplo 1, con algunas muestras que contenían compuestos excipientes agregados. La viscosidad de cada solución se midió como se describe en el ejemplo 2, y los resultados se presentan en la tabla 2 a continuación, mostrando el beneficio de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 2

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
5,1	Ninguno	0	79 (0,079)	0 %
5,2	Aminobenzoato de sodio	43	48 (0,048)	39 %
5,3	Hidroxibenzoato de sodio	26	50 (0,050)	37 %
5,4	Sulfanilato de sodio	44	49 (0,049)	38 %
5,5	Sulfanilato de sodio	96	42 (0,042)	47 %
5,6	Acetato de indol sódico	52	58 (0,058)	27 %
5,7	Acetato de indol sódico	27	78 (0,078)	1 %
5,8	Ácido vanílico, sal sódica	25	56 (0,056)	29 %
5,9	Ácido vanílico, sal sódica	50	50 (0,050)	37 %
5,10	Salicilato de sodio	25	57 (0,057)	28 %
5,11	Salicilato de sodio	50	52 (0,052)	34 %
5,12	Monofosfato de adenosina	26	47 (0,047)	41 %
5,13	Monofosfato de adenosina	50	66 (0,066)	16 %
5,14	Benzoato de sodio	31	61 (0,061)	23 %
5,15	Benzoato de sodio	56	62 (0,062)	22 %

Ejemplo 6: Formulaciones con compuestos excipientes oligopéptidos

Los oligopéptidos (n=5) fueron sintetizados por NeoBioLab Inc. con una pureza > 95 % con el extremo N como amina libre y el extremo C como ácido libre. Los dipéptidos (n=2) fueron sintetizados por LifeTein LLC con una pureza del 95 %. Se prepararon formulaciones de 280 mg/ml de BGG como se describe en el ejemplo 1, con algunas muestras que contenían los oligopéptidos sintéticos como compuestos excipientes agregados. La viscosidad de cada solución se midió como se describe en el ejemplo 2, y los resultados se presentan en la tabla 3 a continuación, mostrando el beneficio de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 3

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
6,1	Ninguno	0	79 (0,079)	0 %
6,2	ArgX5	100	55 (0,055)	30 %
6,3	ArgX5	50	54 (0,054)	32 %
6,4	HisX5	100	62 (0,062)	22 %
6,5	HisX5	50	51 (0,051)	35 %
6,6	HisX5	25	60 (0,060)	24 %
6,7	Trp2Lys3	100	59 (0,059)	25 %
6,8	Trp2Lys3	50	60 (0,060)	24 %
6,9	AspX5	100	102 (0,0102)	-29 %
6,10	AspX5	50	82 (0,082)	-4 %
6,11	Dipéptido LE (Leu-Glu)	50	72 (0,072)	9 %
6,12	Dipéptido YE (Tyr-Glu)	50	55 (0,055)	30 %
6,13	Dipéptido RP (Arg-Pro)	50	51 (0,051)	35 %
6,14	Dipéptido RK (Arg-Lys)	50	53 (0,053)	33 %
6,15	Dipéptido RH (Arg-His)	50	52 (0,052)	34 %

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
6,16	Dipéptido RR (Arg-Arg)	50	57 (0,057)	28 %
6,17	Dipéptido RE (Arg-Glu)	50	50 (0,050)	37 %
6,18	Dipéptido LE (Leu-Glu)	100	87 (0,087)	-10 %
6,19	Dipéptido YE (Tyr-Glu)	100	68 (0,068)	14 %
6,20	Dipéptido RP (Arg-Pro)	100	53 (0,053)	33 %
6,21	Dipéptido RK (Arg-Lys)	100	64 (0,064)	19 %
6,22	Dipéptido RH (Arg-His)	100	72 (0,072)	9 %
6,23	Dipéptido RR (Arg-Arg)	100	62 (0,062)	22 %
6,24	Dipéptido RE (Arg-Glu)	100	66 (0,066)	16 %

Ejemplo 8: Síntesis del excipiente de guanil taurina

Guanil taurina se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el documento U.S. Pat. No. 2,230,965. Se mezclaron 3,53 partes de taurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con 1,42 partes de diciandiamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se machacaron en un mortero hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación, la mezcla se colocó en un matraz y se calentó a 200 °C, durante 4 horas. El producto se utilizó sin purificación adicional.

Ejemplo 9: Formulaciones proteicas que contienen compuestos excipientes

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica, o una proteína no terapéutica que se utilizaría en una formulación no terapéutica. Tales formulaciones se prepararon en una solución tampón acuosa de clorhidrato de histidina 50 mM con diferentes compuestos excipientes para medir la viscosidad de la siguiente manera. La solución tampón de clorhidrato de histidina se preparó primero disolviendo 1,94 g de histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en agua destilada y ajustando el pH a aproximadamente 6,0 con ácido clorhídrico 1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y diluyendo después hasta un volumen final de 250 ml con agua destilada en un matraz aforado. A continuación, los compuestos excipientes se disolvieron en la solución tampón de HCl de histidina 50 mM. En la tabla 4 figura una lista de los compuestos excipientes. En algunos casos, los compuestos excipientes se disolvieron en HCl de histidina 50 mM y el pH de la solución resultante se ajustó con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio concentrado o ácido clorhídrico para alcanzar un pH 6 antes de la disolución de la proteína modelo. En algunos casos, los compuestos excipientes se ajustaron a pH 6 antes de disolverlos en HCl de histidina 50 mM. En este caso, los compuestos del excipiente se disolvieron primero en agua desionizada a aproximadamente 5 % en peso y el pH se ajustó a aproximadamente 6,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. A continuación, la solución salina preparada se introdujo en un horno de convección de laboratorio a aproximadamente 150 grados Fahrenheit (65 grados C) para evaporar el agua y aislar el excipiente sólido. Una vez preparadas las soluciones de excipientes en HCl de histidina 50 mM, se disolvió la proteína de prueba, la gammaglobulina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), en una proporción que permitiera alcanzar una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en HCl de histidina 50 mM con excipiente se formularon en viales de 20 ml y se dejaron agitar a 100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche. A continuación, las soluciones de BGG se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugaron durante diez minutos a 2300 rpm en una microcentrifuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se ha descrito anteriormente se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados C. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron 2 etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y el posterior periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra. Las viscosidades de las soluciones con excipiente se normalizaron con respecto a la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente. La viscosidad normalizada es la relación entre la viscosidad de la solución de proteína modelo con excipiente y la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente.

TABLA 4

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad normalizada cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
9,1	DMCHA-HCl	120	0,44 (0,00044)	56 %
9,2	Niacinamida	50	0,51 (0,00051)	49 %
9,3	Isonicotinamida	50	0,48 (0,00048)	52 %
9,4	Tiramina HCl	70	0,41 (0,00041)	59 %
9,5	Histamina HCl	50	0,41 (0,00041)	59 %
9,6	Imidazol HCl	100	0,43 (0,00043)	57 %
9,7	2-metil-2-imidazolina HCl	60	0,43 (0,00043)	57 %
9,8	cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio	100	0,48 (0,00048)	52 %
9,9	HCl de procaína	50	0,53 (0,00053)	47 %
9,10	3-aminopiridina	50	0,51 (0,00051)	49 %
9,11	2,4,6-trimetilpiridina	50	0,49 (0,00049)	51 %
9,12	3-piridina metanol	50	0,53 (0,00053)	47 %
9,13	Nicotinamida adenina dinucleótido	20	0,56 (0,00056)	44 %
9,15	Fenilpiruvato sódico	55	0,57 (0,00057)	43 %
9,16	2-Pirrolidinona	60	0,68 (0,00068)	32 %
9,17	Morfolina HCl	50	0,6 (0,0006)	40 %
9,18	Sulfato de agmatina	55	0,77 (0,00077)	23 %
9,19	yoduro de 1-butil-3-metilimidazolio	60	0,66 (0,00066)	34 %
9,21	Nitrato de L-anserina	50	0,79 (0,00079)	21 %
9,22	cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio	65	0,89 (0,00089)	11 %
9,23	N,N-dietil nicotinamida	50	0,67 (0,00067)	33 %
9,24	Ácido nicotínico, sal sódica	100	0,54 (0,00054)	46 %
9,25	Biotina	20	0,69 (0,00069)	31 %

Ejemplo 10: Preparación de formulaciones que contienen combinaciones de excipientes y proteínas de prueba

- 5 Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente primario, un compuesto excipiente secundario y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica, o una proteína no terapéutica que se utilizaría en una formulación no terapéutica. Los compuestos excipientes primarios se seleccionaron de entre compuestos con funcionalidad tanto aniónica como aromática, como se indica a continuación en la tabla 5. Los compuestos excipientes secundarios se seleccionaron a partir de compuestos con carga no iónica o catiónica a pH 6 y anillos de imidazolina o benceno, como se indica a continuación en la tabla 5. Las formulaciones de estos excipientes se prepararon en una solución tampón de clorhidrato de histidina 50 mM para medir la viscosidad de la siguiente manera. El clorhidrato de histidina se preparó primero disolviendo 1,94 g de histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en agua destilada y ajustando el pH a aproximadamente 6,0 con ácido clorhídrico 1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y diluyendo después hasta un volumen final de 250 ml con agua destilada en un matraz aforado. A continuación, los compuestos individuales del excipiente primario o secundario se disolvieron en HCl de histidina 50 mM. Las combinaciones de excipientes primarios y secundarios se disolvieron en HCl de histidina 50 mM y el pH de la solución resultante se ajustó con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio concentrado o ácido clorhídrico para alcanzar un pH 6 antes de la disolución de la proteína modelo. Una vez preparadas las soluciones de excipientes como se ha descrito anteriormente, se disolvió la proteína de prueba (gammaglobulina bovina (BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en cada solución de prueba en una proporción para alcanzar una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en HCl de histidina 50 mM con excipiente se formularon en viales de 20 ml y se dejaron agitar a 100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche. A continuación, las soluciones de BGG se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugaron durante diez minutos a 2300 rpm en una microcentrifuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se ha descrito anteriormente se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados C. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron dos etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y un período posterior de recogida de mediciones de 20 segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra. Las viscosidades de las soluciones con excipiente se normalizaron con respecto a la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente, y se resumieron en la tabla 5 a continuación. La viscosidad normalizada es la relación entre la viscosidad de la solución de proteína modelo con excipiente y la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente. El ejemplo muestra que una combinación de excipientes primarios y secundarios puede dar un mejor resultado que un único excipiente.

TABLA 5

Número de prueba	Excipiente primario		Excipiente secundario		Viscosidad normalizada cP (Pa.s)
	Nombre	Concentración (mg/ml)	Nombre	Concentración (mg/ml)	
10,1	Ácido salicílico	30	Ninguno	0	0,79 (0,00079)
10,2	Ácido salicílico	25	Imidazol	4	0,59
10,3	Ácido 4-hidroxibenzoico	30	Ninguno	0	0,61 (0,00061)
10,4	Ácido 4-hidroxibenzoico	25	Imidazol	5	0,57 (0,00057)
10,5	Ácido 4-hidroxibenceno sulfónico	31	Ninguno	0	0,59 (0,00059)
10,6	Ácido 4-hidroxibenceno sulfónico	26	Imidazol	5	0,7 (0,0007)
10,7	Ácido 4-hidroxibenceno sulfónico	25	Cafeína	5	0,69 (0,00069)
10,8	Ninguno	0	Cafeína	10	0,73 (0,00073)
10,9	Ninguno	0	Imidazol	5	0,75 (0,00075)

15 **Ejemplo 11: Preparación de formulaciones que contienen combinaciones de excipientes y proteínas de prueba**

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente primario, un compuesto excipiente secundario y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica, o una proteína no terapéutica que se utilizaría en una formulación no terapéutica. 20 Los compuestos excipientes primarios se seleccionaron de entre compuestos con funcionalidad tanto aniónica como aromática, como se indica a continuación en la tabla 6. Los compuestos excipientes secundarios se seleccionaron a partir de compuestos con carga no iónica o catiónica a pH 6 y anillos de imidazolina o benceno, como se indica a continuación en la tabla 6. Las formulaciones de estos excipientes se prepararon en agua destilada para medir la viscosidad de la siguiente manera. Las combinaciones de excipientes primarios y secundarios se disolvieron en agua destilada y el pH de la solución resultante se ajustó con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio concentrado o ácido clorhídrico para alcanzar un pH 6 antes de la disolución de la proteína modelo. Una vez preparadas las soluciones de excipientes en agua destilada, se disolvió la proteína de prueba (gammaglobulina bovina (BGG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) en una proporción que permitiera alcanzar una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en agua destilada con excipiente se formularon en viales de 20 ml y se dejaron agitar a 100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche. A continuación, las soluciones de BGG se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugaron durante diez minutos a 2300 rpm en una microcentrifuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

35 Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se ha descrito anteriormente se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados C. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron dos etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y un período posterior de recogida de mediciones de 20 segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la

5 viscosidad de la muestra. Las viscosidades de las soluciones con excipiente se normalizaron con respecto a la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente, y se resumieron en la tabla 6 a continuación. La viscosidad normalizada es la relación entre la viscosidad de la solución de proteína modelo con excipiente y la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente. El ejemplo muestra que una combinación de excipientes primarios y secundarios puede dar un mejor resultado que un único excipiente.

TABLA 6

Número de prueba	Excipiente primario		Excipiente secundario		Viscosidad normalizada cP (Pa.s)
	Nombre	Concentración (mg/ml)	Nombre	Concentración (mg/ml)	
11,1	Ácido salicílico	20	Ninguno	0	0,96 (0,00096)
11,2	Ácido salicílico	20	Cafeína	5	0,71 (0,00071)
11,3	Ácido salicílico	20	Niacinamida	5	0,76 (0,00076)
11,4	Ácido salicílico	20	Imidazol	5	0,73 (0,00073)

Ejemplo 12: Preparación de formulaciones que contienen compuestos excipientes y PEG

10 Materiales: Todos los materiales se adquirieron en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente y PEG, donde el PEG pretendía simular una proteína terapéutica PEGilada que se utilizaría en una formulación terapéutica. Tales formulaciones se prepararon mezclando volúmenes iguales de una solución de PEG con una solución del excipiente. Ambas soluciones se prepararon en un tampón Tris compuesto por 10 mM de Tris, 135 mM de NaCl y 1 mM de ácido trans-cinámico a un pH de 7,3.

15 La solución de PEG se preparó mezclando 3 g de Poli(óxido de etileno) de Mw promedio ~1.000.000 (Aldrich Catálogo # 372781) con 97 g de la solución tampón Tris. La mezcla se agitó durante toda la noche para su completa disolución.

20 Un ejemplo de preparación de la solución de excipiente es el siguiente: Se preparó una solución de aproximadamente 80 mg/ml de ácido cítrico en el tampón Tris disolviendo 0,4 g de ácido cítrico (Aldrich cat. # 251275) en 5 ml de la solución tampón Tris y se ajustó el pH a 7,3 con una cantidad mínima de solución de NaOH 10 M.

La solución de excipiente de PEG se preparó mezclando 0,5 ml de la solución de PEG con 0,5 ml de la solución de excipiente y se mezcló utilizando un vórtex durante unos segundos. Se preparó una muestra de control mezclando 0,5 ml de la solución de PEG con 0,5 ml de la solución tampón Tris.

Ejemplo 13: Mediciones de la viscosidad de formulaciones que contienen compuestos excipientes y PEG

25 Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados C. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un periodo de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron dos etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y un periodo posterior de recogida de mediciones de 20 segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra.

30 Los resultados presentados en la tabla 7 muestran el efecto de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 7

Número de prueba	Excipiente	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa. s)	Reducción de la viscosidad
13,1	Ninguno	0	104,8 (0,1048)	0 %
13,2	Ácido cítrico Sal Na	40	56,8 (0,0568)	44 %
13,3	Ácido cítrico Sal Na	20	73,3 (0,0733)	28 %
13,4	fosfato de glicerol	40	71,7 (0,0717)	30 %
13,5	fosfato de glicerol	20	83,9 (0,0839)	18 %

Número de prueba	Excipiente	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa. s)	Reducción de la viscosidad
13,6	Etilendiamina	40	84,7 (0,0847)	17 %
13,7	Etilendiamina	20	83,9 (0,0839)	15 %
13,8	Sal EDTA/K	40	67,1 (0,0671)	36 %
13,9	Sal EDTA/K	20	76,9 (0,0769)	27 %
13,10	Sal EDTA/Na	40	68,1 (0,0681)	35 %
13,11	Sal EDTA/Na	20	77,4 (0,0774)	26 %
13,12	Ácido D-glucónico/Sal K	40	80,32 (0,08032)	23 %
13,13	Ácido D-glucónico/Sal K	20	88,4 (0,0884)	16 %
13,14	Ácido D-glucónico/Sal Na	40	81,24 (0,08124)	23 %
13,15	Ácido D-glucónico/Sal Na	20	86,6 (0,0866)	17 %
13,16	Ácido láctico/sal K	40	80,42 (0,08042)	23 %
13,17	Ácido láctico/sal K		85,1 (0,0851)	19 %
13,18	Ácido láctico/sal Na	40	86,55 (0,08655)	17 %
13,19	Ácido láctico/sal Na	20	87,2 (0,0872)	17 %
13,20	Ácido etidrónico/sal K	24	71,91 (0,07191)	31 %
13,21	Ácido etidrónico/sal K	12	80,5 (0,0805)	23 %
13,22	Ácido etidrónico/sal Na	24	71,6 (0,0716)	32 %
13,23	Ácido etidrónico/sal Na	12	79,4 (0,0794)	24 %

Ejemplo 14: Preparación de BSA PEGilada con 1 cadena de PEG por molécula de BSA

A un vaso de precipitados se le agregaron 200 ml de una solución salina tamponada con fosfato (Aldrich Cat. # P4417) y 4 g de BSA (Aldrich Cat. # A7906) y se mezcla con una barra magnética. A continuación, 400 mg de metoxipolietylenglicol maleimida, MW=5.000, (Aldrich Cat. # 63187). La mezcla de reacción se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se añadieron 20 gotas de HCl 0,1 M para detener la reacción. El producto de reacción se caracterizó mediante SDS-Page y SEC, que mostraron claramente la BSA PEGilada. La mezcla de reacción se colocó en un tubo de centrífuga Amicon con un corte de peso molecular (MWCO) de 30.000 y se concentró a unos pocos mililitros. A continuación, la muestra se diluyó 20 veces con un tampón de histidina, 50 mM a un pH de aproximadamente 6, y se concentró hasta obtener un fluido de alta viscosidad. La concentración final de la solución proteica se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción para la BSA de 0,6678. Los resultados indicaron que la concentración final de BSA en la solución era de 342 mg/ml.

Ejemplo 15: Preparación de BSA PEGilada con múltiples cadenas de PEG por molécula de BSA

Se preparó una solución de 5 mg/ml de BSA (Aldrich A7906) en tampón fosfato, 25 mM a pH de 7,2, mezclando 0,5 g de la BSA con 100 ml del tampón. A continuación se agregó 1 g de un propionaldehído metoxi PEG Mw=20.000 (JenKem Technology, Plano, TX 75024) seguido de 0,12 g de cianoborohidruro sódico (Aldrich 156159). Se dejó que la reacción prosiguiera durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se diluyó 13 veces con un tampón Tris (10 mM Tris, 135 mM NaCl a pH=7,3) y se concentró utilizando tubos de centrífuga Amicon con un MWCO de 30.000 hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 150 mg/ml.

Ejemplo 16: Preparación de lisozima PEGilada con múltiples cadenas de PEG por molécula de lisozima

Se preparó una solución de 5 mg/ml de lisozima (Aldrich L6876) en tampón fosfato, 25 mM a pH de 7,2, mezclando 0,5 g de la lisozima con 100 ml del tampón. A continuación se agregó 1 g de un metoxi PEG propionaldehído Mw=5.000 (JenKem Technology, Plano, TX 75024) seguido de 0,12 g de cianoborohidruro sódico (Aldrich 156159). Se dejó que la reacción prosiguiera durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla de

reacción se diluyó 49 veces con el tampón fosfato, 25 mM a pH de 7,2, y se concentró utilizando tubos de centrífuga Amicon MWCO de 30.000. La concentración final de la solución proteica se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción para la lisozima de 2,63. La concentración final de lisozima en la solución fue de 140 mg/ml.

5 **Ejemplo 17: Efecto de los excipientes en la viscosidad de la BSA PEGilada con 1 cadena de PEG por molécula de BSA**

Se prepararon formulaciones de BSA PEGilada (del ejemplo 14 anterior) con excipientes agregando 6 o 12 miligramos de la sal del excipiente a 0,3 ml de la solución de BSA PEGilada. La solución se mezcló agitándola suavemente y la viscosidad se midió con un RheoSense microVisc equipado con un canal A10 (100 micras de profundidad) a una velocidad de cizallamiento de 500 s-1. Las mediciones del viscosímetro se realizaron a temperatura ambiente.

10 Los resultados presentados en la tabla 8 muestran el efecto de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 8

Número de prueba	Excipiente	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa. s)	Reducción de la viscosidad
17,1	Ninguno	0	228,6 (0,2286)	0 %
17,2	Sal Na sulfatada de alfa-ciclodextrina	20	151,5 (0,1515)	34 %
17,3	K acetato	40	89,5 (0,0895)	60 %

15 **Ejemplo 18: Efecto de los excipientes en la viscosidad de la BSA PEGilada con múltiples cadenas de PEG por molécula de BSA**

20 Se preparó una formulación de BSA PEGilada (del ejemplo 15 anterior) con sal Na de ácido cítrico como excipiente agregando 8 miligramos de la sal del excipiente a 0,2 ml de la solución de BSA PEGilada. La solución se mezcló agitándola suavemente y la viscosidad se midió con un RheoSense microVisc equipado con un canal A10 (100 micras de profundidad) a una velocidad de cizallamiento de 500 s-1. Las mediciones del viscosímetro se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados presentados en la tabla 9 muestran el efecto de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 9

Número de prueba	Excipiente agregado	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
18,1	Ninguno	0	56,8 (0,0568)	0 %
18,2	Ácido cítrico Sal Na	40	43,5 (0,0435)	23 %

25 **Ejemplo 19: Efecto de los excipientes en la viscosidad de la lisozima PEGilada con múltiples cadenas de PEG por molécula de lisozima**

30 Se preparó una formulación de lisozima PEGilada (del ejemplo 16 anterior) con acetato de potasio como excipiente agregando 6 miligramos de la sal del excipiente a 0,3 ml de la solución de lisozima PEGilada. La solución se mezcló agitándola suavemente y la viscosidad se midió con un RheoSense microVisc equipado con un canal A10 (100 micras de profundidad) a una velocidad de cizallamiento de 500 s-1. Las mediciones del viscosímetro se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados presentados en la siguiente tabla muestran el beneficio de los compuestos excipientes agregados en la reducción de la viscosidad.

TABLA 10

Número de prueba	Excipiente	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad
19,1	Ninguno	0	24,6 (0,0246)	0 %
19,2	K acetato	20	22,6 (0,0226)	8 %

Ejemplo 20: Formulaciones proteicas que contienen combinaciones de excipientes

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente o una combinación de dos compuestos excipientes y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica. Estas formulaciones se prepararon en tampón histidina 20 mM con diferentes compuestos excipientes para medir la viscosidad de la siguiente manera. Las combinaciones de excipientes se disolvieron en 20 mM de histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y el pH de la solución resultante se ajustó con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio concentrado o ácido clorhídrico para alcanzar un pH 6 antes de la disolución de la proteína modelo. Los compuestos excipientes para este ejemplo se enumeran a continuación en la tabla 11. Una vez preparadas las soluciones de excipientes, se disolvió la proteína de prueba (gammaglobulina bovina o "BGG" (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) en una proporción para alcanzar una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en las soluciones excipientes se formularon en tubos de polipropileno estériles de 5 ml y se dejaron agitar a 80-100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche. A continuación, las soluciones de BGG se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugaron durante aproximadamente diez minutos a 2.300 rpm en una microcentrífuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se ha descrito anteriormente se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados centígrados. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un período de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron dos etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y un período posterior de recogida de mediciones de 20 segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra. Las viscosidades de las soluciones con excipiente se normalizaron a la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente, y los resultados se muestran en la tabla 11 a continuación. La viscosidad normalizada es la relación entre la viscosidad de la solución de proteína modelo con excipiente y la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente.

TABLA 11

Prueba #	Excipiente A		Excipiente B		Viscosidad normalizada cP (Pa.s)
	Nombre	Conc. (mg/ml)	Nombre	Conc. (mg/ml)	
20,1	Ninguno	0	Ninguno	0	1 (0,001)
20,2	Aspartamo	10	Ninguno	0	0,83 (0,00083)
	Sacarina	60	Ninguno	0	0,51 (0,00051)
20,4	Acesulfamo K	80	Ninguno	0	0,44 (0,00044)
20,5	Teofilina	10	Ninguno	0	0,84 (0,00084)
20,6	Sacarina	30	Ninguno	0	0,58 (0,00058)
20,7	Acesulfamo K	40	Ninguno	0	0,61 (0,00061)
20,8	Cafeína	15	Taurina	15	0,82 (0,00082)
20,9	Cafeína	15	Tiramina	15	0,67 (0,00067)

Ejemplo 21: Formulaciones proteicas con excipientes para reducir la viscosidad y el dolor de la inyección

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente, un segundo compuesto excipiente y una proteína de prueba, donde la proteína de prueba pretendía simular una proteína terapéutica que se utilizaría en una formulación terapéutica. El primer compuesto excipiente, el Excipiente A, se seleccionó de un grupo de compuestos con propiedades anestésicas locales. El primer excipiente, el Excipiente A, y el segundo excipiente, el Excipiente B, se enumeran en la tabla 12. Estas formulaciones se prepararon en tampón de histidina 20 mM utilizando el Excipiente A y el Excipiente B de la siguiente manera, para poder medir sus viscosidades. Los excipientes en las cantidades indicadas en la tabla 12 se disolvieron en 20 mM de histidina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y las soluciones resultantes se ajustaron al pH con pequeñas cantidades de hidróxido de sodio concentrado o ácido clorhídrico para alcanzar un pH 6 antes de la disolución de la proteína modelo. Una vez preparadas las soluciones excipientes, se disolvió la proteína de prueba (gammaglobulina bovina ("BGG") (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) en la solución excipiente en una proporción que permitiera alcanzar una concentración final de proteína de aproximadamente 280 mg/ml. Las soluciones de BGG en las soluciones excipientes se formularon en tubos de polipropileno estériles de 5 ml y se dejaron agitar a 80-100 rpm en una mesa de agitación orbital durante toda la noche. A continuación, las soluciones de BGG-excipiente se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 2 ml y se

centrifugaron durante aproximadamente diez minutos a 2300 rpm en una microcentrífuga IEC MicroMax para eliminar el aire arrastrado antes de medir la viscosidad.

Las mediciones de viscosidad de las formulaciones preparadas como se describió anteriormente se realizaron con un viscosímetro de cono y placa DV-IIT LV (Brookfield Engineering, Middleboro, MA). El viscosímetro estaba equipado con un cono CP-40 y funcionaba a 3 rpm y 25 grados centígrados. La formulación se cargó en el viscosímetro a un volumen de 0,5 ml y se dejó incubar a la velocidad de cizallamiento y temperatura dadas durante 3 minutos, seguidos de un período de recogida de mediciones de veinte segundos. A continuación, se realizaron dos etapas adicionales consistentes en 1 minuto de incubación de cizallamiento y un período posterior de recogida de mediciones de 20 segundos. Los tres puntos de datos recogidos se promediaron y se registraron como la viscosidad de la muestra. Las viscosidades de las soluciones con excipiente se normalizaron a la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente, y los resultados se muestran en la tabla 12 a continuación. La viscosidad normalizada es la relación entre la viscosidad de la solución de proteína modelo con excipiente y la viscosidad de la solución de proteína modelo sin excipiente.

TABLA 12

Prueba #	Excipiente A		Excipiente B		Viscosidad normalizada cP (Pa.s)
	Nombre	Conc. (mg/ml)	Nombre	Conc. (mg/ml)	
21,1	Ninguno	0	Ninguno	0	1 (0,001)
21,2	Lidocaína	45	Ninguno	0	0,73 (0,00073)
21,3	Lidocaína	23	Ninguno	0	0,74 (0,00074)
21,4	Lidocaína	10	Cafeína	15	0,71 (0,00071)
21,5	HCl de procaina	40	Ninguno	0	0,64 (0,00064)
21,6	HCl de procaina	20	Cafeína	15	0,69 (0,00069)

15

Ejemplo 22: Formulaciones que contienen compuestos excipientes y PEG

Se prepararon formulaciones utilizando un compuesto excipiente y PEG, donde el PEG estaba destinado a simular una proteína terapéutica PEGilada que se utilizaría en una formulación terapéutica, y donde los compuestos excipientes se proporcionaron en las cantidades enumeradas en la tabla 13. Estas formulaciones se prepararon mezclando volúmenes iguales de una solución de PEG con una solución del excipiente. Ambas soluciones se prepararon en agua desionizada.

La solución de PEG se preparó mezclando 16,5 g de polímero de etileno) Mw promedio ~100.000 (Aldrich Catálogo # 181986) con 83,5 g de agua DI. La mezcla se agitó durante toda la noche para su completa disolución.

Las soluciones de excipiente se prepararon por este procedimiento general y como se detalla en la tabla 13 a continuación: Se preparó una solución de aproximadamente 20 mg/ml de fosfato potásico tribásico (Aldrich Catálogo # P5629) en agua DI disolviendo 0,05 g de fosfato potásico en 5 ml de agua DI. La solución de excipiente de PEG se preparó mezclando 0,5 ml de la solución de PEG con 0,5 ml de la solución de excipiente y se mezcló utilizando un vórtex durante unos segundos. Se preparó una muestra de control mezclando 0,5 ml de la solución de PEG con 0,5 ml de agua desionizada. Se midió la viscosidad y los resultados se registran en la tabla 13.

30

TABLA 13

Número de prueba	Excipiente	Concentración del excipiente (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad (%)
22,1	Ninguno	0	79,7 (0,0797)	0
22,2	Ácido cítrico Sal Na	10	74,9 (0,0749)	6,0
22,3	Fosfato potásico	10	72,3 (0,0723)	9,3
22,4	Ácido cítrico Sal Na/Fosfato potásico	10/10	69,1 (0,0691)	13,3
22,5	Sulfato de sodio	10	75,1 (0,0751)	5,8
22,6	Ácido cítrico Sal Na/Sulfato sódico	10/10	70,4 (0,0704)	11,7

Ejemplo 23 : Procesamiento mejorado de soluciones proteínicas con excipientes

Se prepararon dos soluciones de BGG mezclando 0,25 g de BGG sólido (número de catálogo G5009 de Aldrich) con 4 ml de una solución tampón. Para la muestra A: La solución tampón era tampón de histidina 20 mM (pH=6,0).

5 Para la muestra B: La solución tampón era un tampón de histidina 20 mM que contenía 15 mg/ml de cafeína (pH=6). La disolución del BGG sólido se llevó a cabo colocando las muestras en un agitador orbital a 100 rpm. Se observó que la muestra de tampón que contenía excipiente de cafeína disolvía más rápidamente la proteína. Para la muestra con el excipiente de cafeína (Muestra B), la disolución completa del BGG se logró en 15 minutos. Para la muestra sin cafeína (Muestra A) la disolución necesitó 35 minutos.

10 A continuación, las muestras se colocaron en 2 unidades separadas de filtro centrífugo Amicon Ultra 4 con un corte de 30.000 pesos moleculares y las muestras se centrifugaron a 2.500 rpm a intervalos de 10 minutos. Se registró el volumen de filtrado recuperado tras cada centrifugación de 10 minutos. Los resultados de la tabla 14 muestran la recuperación más rápida del filtrado para la Muestra B. Además, la Muestra B siguió concentrándose con cada pasada adicional, pero la Muestra A alcanzó un punto de concentración máxima y la centrifugación adicional no dio lugar a una mayor concentración de la muestra.

15

TABLA 14

Tiempo de centrifugado (min)	Muestra A filtrado recogido (ml)	Muestra B filtrado recogido (ml)
10	0,28	0,28
20	0,56	0,61
30	0,78	0,88
40	0,99	1,09
50	1,27	1,42
60	1,51	1,71
70	1,64	1,99
80	1,79	2,29
90	1,79	2,39
100	1,79	2,49

Ejemplo 24: Formulaciones proteínicas con múltiples excipientes

Este ejemplo muestra cómo la combinación de cafeína y arginina como excipientes tiene un efecto beneficioso en la disminución de la viscosidad de una solución de BGG. Se prepararon cuatro soluciones de BGG mezclando 0,18 g de BGG sólido (número de catálogo Aldrich G5009) con 0,5 ml de un tampón de histidina 20 mM a pH 6. Cada solución tampón contenía un excipiente diferente o una combinación de excipientes como se describe en la tabla siguiente. La viscosidad de las soluciones se midió como se ha descrito en ejemplos anteriores. Los resultados muestran que el excipiente de amina impedida, la cafeína, puede combinarse con excipientes conocidos tales como la arginina, y que la combinación tiene mejores propiedades de reducción de la viscosidad que los excipientes individuales por sí solos.

20

25

TABLA 15

Muestra	Excipiente agregado	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad (%)
A	Ninguno	130,6 (0,1306)	0
B	Cafeína (10 mg/ml)	87,9 (0,0879)	33
C	Cafeína (10 mg/ml) / Arginina (25 mg/ml)	66,1 (0,0661)	49
D	Arginina (25 mg/ml)	76,7 (0,0767)	41

Se agregó arginina a soluciones de 280 mg/ml de BGG en tampón de histidina a pH 6. A niveles superiores a 50 mg/ml, la adición de más arginina no disminuyó más la viscosidad, como se muestra en la tabla 16.

30

TABLA 16

Arginina agregada (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad (%)
0	79 (0,079)	0 %
53	40,9 (0,0409)	48 %
79	46,1 (0,0461)	42 %
105	47,8 (0,0478)	40 %
132	49 (0,049)	38 %
158	48 (0,048)	39 %
174	50,3 (0,0503)	36 %
211	51,4 (0,0514)	35 %

Se agregó cafeína a soluciones de 280 mg/ml de BGG en tampón histidina a pH 6. A niveles superiores a 10 mg/ml, la adición de más cafeína no disminuyó más la viscosidad, como se muestra en la tabla 17.

5

TABLA 17

Cafeína agregada (mg/ml)	Viscosidad cP (Pa.s)	Reducción de la viscosidad (%)
0	79 (0,079)	0 %
10	60 (0,06)	31 %
15	62 (0,062)	23 %
22	50 (0,05)	45 %

Equivalentes

Aunque en la presente memoria se han divulgado realizaciones específicas de la invención objeto de estudio, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Mientras esta invención ha sido particularmente mostrada y descrita con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas. Muchas variaciones de la invención se harán evidentes a los expertos en la materia tras la revisión de esta memoria descriptiva. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan condiciones de reacción, cantidades de ingredientes, etc., utilizados en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con lo anterior, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se pretenden obtener con la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida que comprende un anticuerpo y un compuesto excipiente, en la que el compuesto excipiente es cafeína y se agrega en una cantidad que reduce la viscosidad,
 - en la que la cantidad de cafeína que reduce la viscosidad está comprendida entre 10 mg/ml y 200 mg/ml,
 - 5 en la que el anticuerpo está en una cantidad de al menos 100 mg/ml; y
 - en la que la viscosidad de la formulación es al menos un 50 % menor que la viscosidad de una formulación de control, en la que la formulación de control no contiene cafeína pero por lo demás es idéntica en peso seco a la formulación líquida.
- 10 2. La formulación líquida de la reivindicación 1, en la que la formulación es una composición farmacéutica, y en la que la composición farmacéutica comprende un anticuerpo terapéutico.
3. La formulación líquida de la reivindicación 1, en la que la formulación es una formulación no terapéutica, y en la que la formulación no terapéutica comprende una proteína no terapéutica.
4. La formulación de la reivindicación 1, en la que la viscosidad de la formulación es al menos un 70 %, opcionalmente al menos un 90 % menor que la viscosidad de la formulación de control.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la viscosidad es menor que 100 cP (0,1 Pa.s), opcionalmente menor que 50 cP (0,05 Pa.s), opcionalmente menor que 20 cP (0,02 Pa.s) opcionalmente menor que 10 cP (0,01 Pa.s).
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la formulación contiene al menos 200 mg/ml del anticuerpo, opcionalmente al menos 300 mg/ml del anticuerpo.
- 20 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la formulación tiene una estabilidad mejorada en comparación con la formulación de control.
8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la cafeína se combina con un segundo compuesto excipiente que disminuye aún más la viscosidad de la formulación.
- 25 9. La formulación de la reivindicación 8, en la que el segundo compuesto excipiente se selecciona del grupo que consiste en teofilina, tiramina, procaína, lidocaína, imidazol, aspartamo, sacarina y acesulfamo potásico.
10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en conservantes, tensioactivos, azúcares, polisacáridos, arginina, prolina, hialuronidasa, estabilizadores y tampones.
- 30 11. Una formulación líquida para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero, en la que la formulación terapéutica líquida se selecciona de una cualquiera de las formulaciones de las reivindicaciones 1-10.
12. La formulación líquida para su uso de la reivindicación 11 para inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa.
- 35 13. Una formulación terapéutica líquida inyectable para su uso en la reducción del dolor en un sitio de inyección de una proteína terapéutica en un mamífero, en la que la formulación se selecciona de una cualquiera de las formulaciones de las reivindicaciones 1-10.
14. Un procedimiento de mejora de un procedimiento relacionado con las proteínas que comprende:
 - proporcionar la formulación líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y
 - emplearla en un procesamiento de transformación.
- 40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el procedimiento de procesamiento se selecciona del grupo que consiste en filtración, bombeo, mezcla, centrifugación, separación por membrana, liofilización y cromatografía.