

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 706**

51 Int. Cl.:
A61K 9/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04811377 .3**
96 Fecha de presentación: **11.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1684719**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES DE ALFA 1-ANTITRIPSINA Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO QUE USAN
TALES COMPOSICIONES.**

30 Prioridad:
14.11.2003 US 520549 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
**BAXTER INTERNATIONAL INC.
ONE BAXTER PARKWAY
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US;
BAXTER HEALTHCARE SA y
ARRIVA PHARMACEUTICALS, INC.**

72 Inventor/es:
**DURRANI, Manzer J.;
KUMAR, Harish;
KREIGER, Timothy;
KABINGUE, Ken;
MOSHER, Virginia;
BARR, Philip J. y
BATHURST, Ian C.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 375 706 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

Composiciones de alfa 1-antitripsina y métodos de tratamiento que usan tales composiciones

5 **Campo técnico**

Alfa 1-antitripsina (AAT) es un inhibidor de proteasa con especificidad de sustrato relativamente amplia; su función principal es inhibir la elastasa, pero también es un inhibidor de catepsina G y proteinasa 3. Además de su actividad como un inhibidor de estas enzimas, AAT también ha demostrado que inhibe la desgranulación de mastocitos de pulmón, inhibe los factores de liberación de histamina, inhibe la liberación del factor de necrosis tumoral (FNT) e inhibe la liberación de leucotrieno B₄ a partir de macrófagos y células alveolares.

AAT se sintetiza principalmente en el hígado, pero también se sintetiza en un menor alcance en otras células, incluyendo macrófagos, células epiteliales intestinales y células de Paneth intestinales. En el hígado, AAT se sintetiza inicialmente como una proteína precursora de 52 kD que posteriormente experimenta la glicosilación post-traduccional en tres restos de asparagina, así como la sulfonación de tirosina. La proteína resultante se secreta como una glicoproteína de cadena única nativa de 55 kD. El alotipo normal de AAT se denomina AAT de tipo M (con frecuencia se denomina inhibidor de proteasa de tipo M o sencillamente PiM). Una vez secretado en el plasma, la semivida de PiM es aproximadamente 5 días.

Determinados individuos tienen un trastorno genético que produce como resultado una deficiencia de AAT. Estos individuos tienen un riesgo aumentado de enfermedad hepática y/o enfisema pulmonar. El riesgo de enfisema pulmonar se encuentra aumentado debido a que el tejido pulmonar en mamíferos es especialmente sensible a la acción de la elastasa, la cual, si no está controlada, puede degradar todos los componentes de proteína principales del intersticio alveolar (véase, por ejemplo Smith, *et al.* (1989) *J. Clin. Invest.* 84: 1145-1154).

La deficiencia de AAT se transmite con mayor frecuencia como un rasgo recesivo autosómico que afecta aproximadamente a 1 de 1700 individuos en la mayoría de las poblaciones de Norte América y de Europa del Norte. Esta forma particular de deficiencia de AAT se denomina comúnmente inhibidor de proteasa de tipo Z (o simplemente PiZ). La mutación asociada con PiZ es una sustitución de nucleótido único que provoca una sustitución de glutamato 342 con lisina. La evidencia hasta la fecha indica que esta sustitución evita el plegamiento de proteína normal de AAT. Esta mutación específicamente parece reducir la estabilidad de la forma monomérica de la proteína y aumenta la formación de formas poliméricas (véase, por ejemplo, Lomas *et al.* (1992) *Nature* 357: 605-607; véase también, Gadek, *et al.*, (1982) "Alpha-1-Antitrypsin Deficiency", in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J.B., *et al.*, Eds) McGraw-Hill, Nueva York, págs. 1450-1467; y Carroll, *et al.* (1982) *Nature* 298: 329-334).

En el caso de enfermedad hepática asociada con deficiencia de AAT, la investigación indica que la forma de PiZ mutante de AAT se retiene como glóbulos en el retículo endoplasmático (RE) de las células hepáticas. La retención de AAT mutante parece estar ocasionada por el plegamiento anormal de la forma PiZ de la enzima, que inhibe su transporte desde el RE hasta el Golgi (véase, por ejemplo, Carlson *et al.*, (1988) *J. Clin. Invest.* 83: 1183-90; Wu *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9014-9018; y Dyaico, *et al.* (1988) *Science* 242: 1409-1412).

Como se ha indicado anteriormente, una deficiencia en AAT juega un papel central en la patogénesis de enfisema debido al papel clave que juega AAT en la regulación de elastasa, catepsina G y proteinasa 3. Por ejemplo, la investigación indica que AAT representa más del 90% de actividad inhibitoria de elastasa de neutrófilos en el líquido de lavado alveolar pulmonar, lo que sugiere que la destrucción del tejido pulmonar observada en individuos con deficiencia de AAT se debe a un desequilibrio en elastasa y AAT dentro de los pulmones. La acción descontrolada de la elastasa, junto con la de catepsina G y proteinasa 3, da como resultado la destrucción lenta pero estable de tejido conectivo pulmonar y elasticidad asociada con la aparición de enfisema pulmonar. Existe alguna evidencia que indica que los contaminantes ambientales y el humo del cigarrillo pueden agravar el problema de deficiencia de AAT oxidando la poca cantidad de AAT que está presente en una forma inactiva (por ejemplo, véase, Hunnighake, *et al.* (1983) *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 833-838).

La administración de AAT a individuos que tienen deficiencia de AAT ha sido el modo de tratamiento principal hasta la fecha. Con frecuencia tales protocolos de tratamiento implican la administración de AAT por vía intravenosa. Existen al menos dos problemas con este enfoque. El primer problema es que se tienen que administrar cantidades grandes de AAT por vía intravenosa para alcanzar los niveles terapéuticos en el pulmón. En segundo lugar, aunque el uso de AAT recombinante es provechoso debido a que la misma se puede obtener fácilmente en cantidades relativamente grandes, esta forma de AAT tiene una semivida corta en la circulación debido a que la AAT recombinante es menos estable que la forma de origen natural.

Por tanto sigue existiendo una necesidad de composiciones nuevas para proporcionar AAT en una forma estable a pacientes, incluyendo formas recombinantes. El documento US 5.166.134 proporciona un método para la profilaxis o tratamiento directo de rinitis alérgica que comprende administrar por vía nasal a un paciente una solución acuosa de una cantidad eficaz de un inhibidor de serina proteasa. El documento US 2001/0006939 A1 se refiere a

formulaciones de inhibidor de proteasa de leucocitos secretores (SLPI) para administración pulmonar.

Breve resumen de la invención

5 Se proporciona una diversidad de composiciones farmacéuticas que contienen AAT. Las composiciones son útiles para tratar una diversidad de enfermedades asociadas con deficiencia de AAT. Las composiciones incluyen en general AAT, un carbohidrato estabilizante, un tensioactivo y un antioxidante. Se proporciona una composición farmacéutica formulada como un polvo, que comprende una alfa 1-antitripsina (AAT), trehalosa, un tensioactivo y un antioxidante, en la que AAT es:

- 10 (a) una AAT nativa;
 (b) una AAT recombinante; o
 (c) una variante de AAT que tiene al menos una identidad de secuencia del 85% de aminoácidos con SEC ID N°: 1 y puede inhibir elastasa. También se proporciona una composición de acuerdo con la invención para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT), en la que la composición se tiene que administrar a los pulmones de un paciente.

20 Las composiciones se formulan para administración a un paciente a través de terapia de inhalación. Las composiciones se formulan como polvos y se administran convirtiendo el polvo en un aerosol. La AAT en la composición farmacéutica puede ser de una diversidad de formas diferentes incluyendo una AAT de origen natural, una AAT recombinante y una AAT transgénica. La AAT puede estar glicosilada o no glicosilada.

Se pueden usar varios antioxidantes diferentes en las composiciones.

25 Los antioxidantes ilustrativos incluyen glutatión y metionina.

Las composiciones farmacéuticas en base a solución descritas en el presente documento habitualmente incluyen 1-100 mg/ml de AAT, trehalosa al 1-5% (p/v), tensioactivo al 0,01-0,5% (p/v) y antioxidante 1-10 mM. La concentración de AAT en algunas composiciones es algo menor a 10-50 mg/ml. Por lo tanto, en composiciones formuladas como polvos, la AAT, trehalosa, tensioactivo y antioxidante están presentes en cantidades de forma que si el polvo se solubiliza en solución acuosa para administración a un paciente la concentración de AAT es 1-100 mg/ml, la concentración de trehalosa es el 1-5% (p/v), la concentración de tensioactivo es el 0,01-0,5% (p/v) y la concentración de antioxidante es 1-10 mM.

35 Determinadas composiciones farmacéuticas diferentes que se divulgan en el presente documento, comprenden una alfa 1-antitripsina (AAT) recombinante, trehalosa, un tensioactivo y un antioxidante, en las que la proporción de AAT/carbohidrato (peso:peso) es 1:1 a 5:1.

40 Un ejemplo específico de una formulación que ilustra las cantidades relativas de los diversos componentes de la formulación es una formulación de 2 ml que contiene 50 mg de AAT/ml, 25 mg de trehalosa/ml, metionina 5 mM y polisorbato 80 a 0,02°C. Si se liofiliza, una composición de este tipo proporciona 100 mg de AAT, 50 mg de trehalosa, 1,5 mg de metionina y 0,4 mg de polisorbato 80. Otra formulación base comprende AAT al 5%, carbohidrato al 2,5% (por ejemplo, trehalosa), tensioactivo al 0,1-0,2% (por ejemplo, Tween 80), antioxidante 5 mM (por ejemplo, metionina) y tampón 10 mM (por ejemplo, fosfato de sodio, a pH 7,4), siendo todos los porcentajes (p/v).

50 Las composiciones farmacéuticas de las composiciones anteriores se pueden usar para tratar una diversidad de enfermedades que están relacionadas con la deficiencia de AAT. Por ejemplo, estas composiciones se pueden usar para tratar una enfermedad pulmonar asociada con deficiencia de AAT. Por tanto, por ejemplo, determinados métodos implican la administración a los pulmones de un paciente de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de AAT, trehalosa, un tensioactivo y un antioxidante. La composición específica de estas composiciones es como se ha descrito anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, las composiciones generalmente se administran por inhalación. Si la composición es un sólido, el método implica convertir el sólido en un aerosol que el paciente pueda inhalar.

55 Las composiciones se pueden usar para tratar una diversidad de enfermedades. Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar mediante la administración de las composiciones descritas incluyen una enfermedad pulmonar asociada con la actividad de elastasa, catepsina G y/o proteinasa 3. Determinados tratamientos son eficaces para tratar una enfermedad inflamatoria pulmonar asociada con activación de neutrófilos, mastocitos o células T. Otras enfermedades que se pueden tratar con algunas composiciones incluyen síndrome de distrés respiratorio adulto, síndrome de distrés respiratorio neonatal y síndrome de sepsis. Otros ejemplos específicos de enfermedades que se pueden tratar incluyen enfisema y asma.

65 En algunos métodos de tratamiento, el paciente es susceptible a la enfermedad y la composición farmacéutica se administra en una cantidad profilácticamente eficaz. Mientras, en otros casos, el paciente tiene la enfermedad y la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Otros métodos para tratar una enfermedad pulmonar asociada con deficiencia de AAT implican administrar a los pulmones de un paciente una composición farmacéutica que comprende AAT recombinante no glicosilado, trehalosa y al menos un agente estabilizante adicional seleccionado entre el grupo que consiste en un tensioactivo y un antioxidante, en el que la proporción de AAT/carbohidrato es 1:1 a 5:1. Los métodos que implican administrar tales composiciones se pueden usar para tratar las enfermedades anteriores.

Descripción detallada

I. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comprendido comúnmente por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991). Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos a menos que se especifique de otra manera.

El término "AAT" como se usa en el presente documento se refiere en general a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de AAT nativa, así como variantes, fragmentos y formas modificadas independientemente del origen o modo de preparación. Por tanto, el término abarca formas tanto de origen natural como recombinantes de AAT, así como formas glicosiladas y no glicosiladas. El término incluye AAT aislado a partir de fuentes naturales (por ejemplo, plasma), AAT producido mediante métodos sintéticos que se conocen en la técnica y/o mediante medios recombinantes o transgénicos. "AAT de origen natural" o sencillamente "AAT nativo" se refiere a formas de AAT que se pueden aislar a partir de fuentes naturales (por ejemplo, suero). La expresión AAT de origen natural abarca específicamente formas truncadas o solubles de origen natural, formas de variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo), variantes alélicas de origen natural de AAT y formas que incluyen modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, la glicosilación y sulfonación descrita en los Antecedentes). Los ejemplos específicos de secuencias de AAT nativas se proporcionan en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.599.311 y 4.711.848. Una secuencia de AAT nativa ilustrativa se proporciona como SEC ID N°: 1 (véase, también el número de acceso de GenBank AAB59375). "AAT recombinante" (rAAT) se refiere a AAT producido usando ingeniería genética, técnicas recombinantes o transgénicas. Los métodos ilustrativos para producir AAT recombinante se describen en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.599.311; 4.931.373; y 5.218.091. Las formas recombinantes de AAT pueden estar glicosiladas o no glicosiladas dependiendo del organismo en el cual se expresa la enzima. El término AAT puede incluir tanto formas humanas de AAT, así como otras AAT de mamífero (por ejemplo, aquellas de primates tales como monos, chimpancés y gorilas, así como no primates tales como ratones, conejos, vacas y porcinos).

"Variantes de AAT" se refiere a proteínas que son equivalentes funcionales de una proteína AAT de secuencia nativa y que tienen secuencias de aminoácidos similares y que conservan, en algún grado, una o más de las actividades de AAT de origen natural. Las actividades de AAT incluyen, pero sin limitación, la capacidad de inhibir elastasa, catepsina G y/o proteinasa 3. Otras actividades de AAT ilustrativas incluyen la capacidad de inhibir la desgranulación de mastocitos pulmonares, de inhibir los factores de liberación de histamina, inhibir la liberación del factor de necrosis tumoral (FNT) y/o inhibir la liberación de leucotrieno B₄ a partir de macrófagos y células alveolares.

Las variantes también incluyen fragmentos que conservan actividad de AAT. Los fragmentos incluyen el sitio activo de AAT y típicamente incluyen al menos 5-20 aminoácidos flanqueantes en cualquier lado del sitio activo. Los fragmentos habitualmente incluyen al menos 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 ó 350 aminoácidos.

Las variantes de AAT también incluyen proteínas que son sustancialmente idénticas a una secuencia nativa de AAT. Tales variantes incluyen proteínas que tienen alteraciones de aminoácidos tales como supresiones, inserciones y/o sustituciones. Una "supresión" se refiere a la ausencia de uno o más restos de aminoácidos en la proteína relacionada. El término "inserción" se refiere a la adición de uno o más aminoácidos en la proteína relacionada. Una "sustitución" se refiere al remplazo de uno o más restos de aminoácido por otro resto de aminoácido en el polipéptido. Típicamente, tales alteraciones son de naturaleza conservativa de forma que la actividad de la proteína variante es sustancialmente similar a una secuencia nativa de AAT (véase, por ejemplo, Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company). En el caso de sustituciones, el aminoácido que reemplaza a otro aminoácido habitualmente tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, las inserciones y supresiones típicamente están en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos, aunque dependiendo del emplazamiento de la inserción, se pueden insertar o eliminar más aminoácidos. Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida (Carter, *et al.* (1986) Nud. Acids Res. 13: 4331; Zoller *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 10: 6487), mutagénesis de casete (Wells *et al.* (1985) Gene 34: 315), mutagénesis de selección de restricción (Wells, *et al.* (1986) Philos.Trans. R. Soc. London SerA 317: 415) y mutagénesis por PCR (Sambrook, *et al.* (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Las variantes de AAT también incluyen formas modificadas o derivadas de AAT. AAT modificada generalmente se refiere a proteínas en las que uno o más aminoácidos de una secuencia nativa de AAT se han alterado a un resto de aminoácido que no es de origen natural. Tales modificaciones pueden ocurrir durante o después de la traducción e incluyen, pero sin limitación, fosforilación, glicosilación, sulfonación, entrecruzamiento, acilación y escisión proteolítica.

Los ejemplos específicos de formas variantes de AAT se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.732.973 y 5.134.119, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad con todos los propósitos. Las variantes ilustrativas son aquellas en las que la metionina del sitio activo se reemplaza con aminoácidos que son menos susceptibles a oxidación (por ejemplo, valina, alanina, leucina, isoleucina, serina o treonina). Otras variantes específicas y métodos para producir variantes se describen en general en la Patente de los Estados Unidos N° 4.711.848.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, medido mediante el uso de un algoritmo de comparación de secuencia tales como los que se describen más adelante por ejemplo, o mediante inspección visual.

La expresión "sustancialmente idéntico" u otras expresiones relacionadas cuando se usan en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de nucleótido o de restos de aminoácidos de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, el 95% o el 99%, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, medido usando un algoritmo de comparación de secuencia como los que se describen más adelante por ejemplo o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 40-60 restos de longitud, preferentemente a lo largo de una región más larga que 60-80 aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente 90-100 restos y más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando, tales como la región codificante de un nucleótido por ejemplo.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se colocan en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias después calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual [véase en general, *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, F.M. *et al.*, eds.) John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1987-1999, incluyendo suplementos tales como el suplemento 46 (abril 1999)]. El uso de estos programas para conducir comparaciones de secuencia se conduce típicamente usando los parámetros por defecto específicos de cada programa.

II. Visión de conjunto

Se proporcionan composiciones que son útiles para estabilizar diversas proteínas como una formulación farmacéutica, así como métodos de uso de tales formulaciones en una diversidad de métodos de tratamiento terapéuticos y profilácticos. Un grupo de formulaciones que se ha desarrollado contiene AAT. Estas formulaciones son útiles para tratar una diversidad de síntomas asociados con deficiencia de AAT. "Deficiencia de AAT" como se usa en el presente documento significa en general que los niveles de AAT endógenos de un individuo son insuficientes para protegerlo frente a la actividad destructiva de elastasa u otras proteasas tales como cathepsina G y proteinasa 3. Los niveles de AAT pueden ser insuficientes debido a que los niveles de AAT son más bajos que lo típico para una población de individuos y/o debido a que los niveles de elastasa son elevados en relación a la población general.

Las formulaciones se han diseñado para abordar desafíos comunes a las formulaciones de proteína en general, así como los desafíos específicos asociados con la administración de AAT como un agente terapéutico. Por ejemplo, la proteína para uso terapéutico con frecuencia es intrínsecamente inestable fuera de su entorno biológico natural. Los problemas de estabilidad comunes incluyen agregación no covalente o covalente, desamidación, formación de imidas cíclicas, escisión y oxidación. AAT, por ejemplo, es susceptible a oxidación debido a la presencia de un sitio activo de metionina y la agregación. Las formulaciones que se divulgan en el presente documento mejoran la

estabilidad de AAT con relación a soluciones acuosas de AAT que carecen de agentes estabilizantes, incluyendo las formas recombinantes no glicosiladas que son menos estables que las formas de origen natural. Los componentes de las formulaciones también se han seleccionado de forma que la formulación se pueda nebulizar fácilmente para potenciar la administración a los pulmones o convertirla en un aerosol a partir de un polvo seco. Las formulaciones se pueden preparar en forma acuosa o liofilizarse como un polvo para potenciar adicionalmente la estabilidad. Por consiguiente, la formulación se puede administrar nebulizando formulaciones líquidas o, en algunos casos convirtiendo el polvo en un aerosol seco que se puede inhalar.

III. Composiciones

A. General

Las formulaciones o composiciones que se proporcionan: 1) incluyen componentes que estabilizan proteínas, 2) están en una forma que se puede convertir fácilmente en un aerosol y 3) son compatibles con tejido pulmonar. Aunque la mayoría de la descripción del presente documento se enfoca en formulaciones que contienen AAT, los expertos en la materia reconocerán que los componentes de las formulaciones descritas se pueden usar para preparar formulaciones que contienen otras proteínas.

Los componentes incluidos en las composiciones incluyen en general uno o más de los siguientes: un azúcar simple (por ejemplo, un monosacárido, un disacárido o un trisacárido), un tensioactivo/detergente, un antioxidante y un agente de tamponamiento. También se pueden incluir opcionalmente diversos ingredientes activos diferentes, tales como uno o más inhibidores de proteasa adicionales y/o un agente anti-inflamatorio.

Las formulaciones se pueden preparar de diversas formas, incluyendo: 1) como un líquido que se puede nebulizar posteriormente, 2) como un polvo que se puede administrar mediante aerolización de polvo seco, o 3) como un líquido que se liofiliza hasta un polvo para almacenamiento, el cual posteriormente a su vez se reconstituye como un líquido poco antes de administrarse a un paciente. Las concentraciones de los componentes enumerados más adelante generalmente asumen una formulación líquida. Los componentes en las formulaciones en polvo están presentes en cantidades apropiadas de forma que si el polvo se ha reconstituido el mismo producirá un líquido con las concentraciones descritas en el presente documento.

B. Proteína

La AAT incluida en la formulación se define anteriormente y puede ser de origen natural, preparada mediante técnicas recombinantes y/o preparada mediante síntesis química. La AAT a partir de plasma humano está disponible en el mercado como un producto parenteral, PROLASTIN, producido por Bayer. La AAT glicosilada o AAT no glicosilada (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 4.599.311; 4.931.373; y 5.21.8.091) se pueden usar en las formulaciones. Algunas formulaciones incluyen un fragmento o variante de AAT como se ha definido anteriormente. Las secuencias de tales variantes típicamente tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos de una AAT de origen natural (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 4.711.848 y 4.599.311) y tienen una o más actividades de AAT con una secuencia nativa. Por tanto, por ejemplo, determinadas composiciones incluyen una variante de AAT que: 1) tiene una identidad de secuencia de al menos el 85, el 90 o el 95% con la secuencia de AAT nativa enumerada en SEC ID N°: 1, y 2) puede inhibir elastasa. Las variantes adecuadas que se pueden incluir en determinadas composiciones incluyen, por ejemplo, las descritas en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.732.973; 5.134.119; y 4.711.848. La AAT puede ser una AAT humana o de otro mamífero.

Las sales y derivados de la proteína también se pueden utilizar. Estos se pueden preparar mediante técnicas establecidas usadas comúnmente con otras proteínas sin influir negativamente sobre la actividad de la proteína. Los ejemplos de sales y derivados adecuados que se pueden utilizar en determinadas formulaciones incluyen, pero sin limitación, sales de metales alcalinos, sales de adición de ácido y ésteres.

La proteína típicamente tiene una pureza de al menos el 90%, en otros casos al menos el 95% y en aún otros casos al menos el 98 o el 99%. Estos valores de pureza reflejan la cantidad de AAT con relación a otra proteína en la composición en una base en peso. La concentración de AAT puede variar, pero en formulaciones líquidas generalmente varía desde 1-100 mg/ml, incluyendo cualquier intervalo entre los mismos. En otros casos, la concentración es 1-50 mg/ml y en aún otros casos 60-65 mg/ml. La concentración de AAT en algunas formulaciones es menos de 100, 75, 50, 25, 10 ó 5 mg/ml. Expresada en una base de porcentaje en peso, la concentración de AAT típicamente varía desde el 2-20% (p/v) y en algunos casos varía desde el 5-15% (p/v). Por tanto, por ejemplo, algunas formulaciones tienen una concentración de AAT del 5, 7, 9, 11, 13 ó 15% (p/v).

C. Carbohidrato

Las composiciones contienen un carbohidrato simple (trehalosa). El carbohidrato funciona, entre otras cosas, como un crioprotector y lioprotector amorfo, facilitando de ese modo el almacenamiento a temperatura ambiente. El carbohidrato se selecciona para ser compatible con tejido pulmonar y, para formulaciones que se tienen que

nebulizar, compatibles con nebulización. Los resultados descritos más adelante indican que la trehalosa satisface bien estos criterios.

5 La concentración del carbohidrato (trehalosa) en una formulación líquida generalmente varía desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml y en otros casos aproximadamente 10 mg/ml a
 10 aproximadamente 50 mg/ml. Las concentraciones de carbohidrato por encima significativamente de este nivel pueden dar como resultado que se administre demasiado carbohidrato durante la inhalación, lo cual puede dar como
 15 resultado que el pulmón se recubra potencialmente con carbohidrato. Por tanto, diversas formulaciones contienen al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 mg/ml de carbohidrato, pero generalmente menos de aproximadamente
 50 mg/ml. Expresado en una base en porcentaje, la concentración de carbohidrato habitualmente es hasta aproximadamente el 5% (p/v). Por tanto, la concentración de carbohidrato en base de porcentaje en peso es habitualmente al menos el 1, 2, 3 ó 4% pero menos del 5%. La proporción de proteína/carbohidrato (peso:peso) habitualmente se ajusta de forma que esta proporción esté entre aproximadamente 1:1 - 5:1. La formulaciones ilustrativas (por ejemplo, formulaciones de AAT) por tanto tienen proporciones de proteína/carbohidrato (p:p) de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ó 5:1.

D. Tensioactivo

20 Un tensioactivo que se puede nebulizar o convertir en un aerosol y que es compatible con tejido pulmonar también se incorpora típicamente en las formulaciones de proteína para potenciar la estabilidad de la proteína. Como se usa en el presente documento, el término "tensioactivo" tiene su significado habitual en la técnica y generalmente significa un agente tensioactivo. Los tensioactivos también se denominan algunas veces en la técnica agentes humectantes, depresores de la tensión superficial, detergentes, agentes de dispersión o emulsificantes. El
 25 tensioactivo es útil para evitar la agregación de la proteína en la formulación y para minimizar la desnaturalización superficial que puede ocurrir durante la filtración, congelación-descongelación, liofilización y almacenamiento. La protección frente a la agregación es importante con formulaciones que contienen AAT, por ejemplo, debido a que los agregados de AAT son menos estables que las formas monoméricas.

30 El tensioactivo se puede seleccionar entre cualquier tensioactivo o detergente que tenga las características enumeradas anteriormente. Típicamente, se utiliza un tensioactivo no iónico. Los ejemplos específicos de tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, diversos estabilizantes de Polisorbato (nombre de USP/NF) (por ejemplo, Polisorbato 80). Otros tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, TWEEN™ (por ejemplo, TWEEN 80) y tensioactivos comercializados bajo la marca comercial PLURONIC™.

35 En determinadas formulaciones, no se incluye un tensioactivo, pero se incluye en otras. Si se añaden a la formulación, la concentración del tensioactivo puede variar, pero generalmente varía desde aproximadamente el 0,01 - 0,5% (p/v) en formulaciones líquidas. Para determinadas formulaciones, la concentración de tensioactivo varía desde aproximadamente el 0,01 - 0,1% (p/v) o desde el 0,02-0,1% (p/v). Por tanto diversas formulaciones contienen al menos el 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2, 0,3, ó 0,4% de tensioactivo (p/v), pero menos de aproximadamente el
 40 0,5% (p/v). La concentración no debe superar un nivel que dé como resultado efectos negativos sobre el tejido pulmonar cuando se administre.

E. Antioxidante

45 "Antioxidante" como se usa en el presente documento tiene su significado general en la técnica. Se refiere en general a un agente que inhibe la oxidación a través de procesos oxidativos, específicamente de restos de aminoácidos en AAT. El propósito del antioxidante en la formulación es evitar la oxidación de aminoácidos que son importantes para la actividad y/o estabilidad de proteína, por ejemplo, AAT, por ejemplo, incluye un resto de metionina importante que, si se oxida, da como resultado una actividad disminuida. Se pueden incorporar varios
 50 antioxidantes utilizados en composiciones farmacéuticas en la formulación. Los antioxidantes ilustrativos incluyen, metionina, glutatión, cisteína y ácido ascórbico, pero también se pueden usar otros antioxidantes conocidos en la técnica. Algunas formulaciones, por ejemplo, incluyen N-acetilcisteína.

55 En forma líquida, el nivel de antioxidante generalmente es aproximadamente 1-10 mM. Diversas formulaciones, por tanto, contienen antioxidante 1, 2, 4, 5, 6, 8 ó 10 mM, aunque determinadas formulaciones pueden contener un poco más o menos.

F. Tampón

60 Diversos tampones que se pueden nebulizar o convertirse en aerosol a partir de polvo seco y que son compatibles con tejido pulmonar se incluyen típicamente en las formulaciones. El tampón también debe proporcionar capacidad de tamponamiento a un pH entre aproximadamente pH 6,5-7,5, ya que los valores de pH en este intervalo son compatibles con los pulmones. Determinadas formulaciones tienen un pH entre 7-7,5; otras composiciones tienen un pH entre 7,2-7,5. Otras formulaciones tienen un pH algo menor, tal como 6,6-6,8. Las formulaciones en algunos
 65 casos incluyen tampón fosfato debido a que el mismo tiene buena capacidad tamponante con respecto al intervalo de pH deseado y es relativamente poco costoso. Sin embargo, también se pueden usar otros tampones (por

ejemplo, TRIS).

G. Componentes Opcionales Adicionales

5 Determinadas formulaciones pueden contener diversos componentes opcionales para dirigirse a diversos síntomas diferentes que en algunos casos están asociados con deficiencia de AAT. Algunas composiciones contienen otros inhibidores de serina proteasa tales como los que se enumeran en la sección siguiente. Otras composiciones pueden incluir agentes eficaces para aliviar la inflamación que está asociada con la degradación de tejido conectivo pulmonar. Tales agentes anti-inflamatorios se pueden seleccionar entre cualquiera de aquellos que se conocen
10 generalmente en la técnica, siempre y cuando sean compatibles con tejido pulmonar, se puedan nebulizar o convertirse en un aerosol. Por ejemplo, determinadas formulaciones pueden incluir un corticoesteroide. Los ejemplos específicos de tales compuestos incluyen, pero sin limitación, hidrocortisona, dexametasona, triamcinolona acetona, prednisona, valerato de beclometasona, valerato de hidrocortisona y halocinonida.

15 H. Composiciones en Polvo

Las formulaciones líquidas con las composiciones descritas en el presente documento se pueden liofilizar para formar un polvo. Por tanto también se proporcionan formulaciones en polvo preparadas liofilizando las formulaciones líquidas tales como las descritas en el presente documento. Como se ha descrito con mayor detalle más adelante,
20 tales composiciones se pueden administrar como un aerosol en polvo seco. Como alternativa, el polvo se puede rehidratar para formar una formulación líquida que se puede administrar de acuerdo con las diversas opciones descritas más adelante.

25 I. Variaciones

Aunque la descripción anterior se ha enfocado en formulaciones de AAT, los componentes descritos anteriormente se pueden preparar como compuestos en las concentraciones enumeradas anteriormente para preparar formulaciones con una diversidad de proteínas diferentes. La formulación puede contener básicamente cualquier proteína terapéutica que se puede nebulizar cuando se disuelve en solución acuosa o convertirse en un aerosol a partir de un polvo seco. Por tanto, por ejemplo, la proteína puede ser un miembro de la clase general de inhibidores de proteasa de plasma y suero a la cual pertenece AAT, incluyendo diversos inhibidores de serina proteasa. Las serina proteasas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, aquellas que se pueden obtener a partir de mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y/o basófilos, tales como elastasa, catepsina G, quininas, factor de necrosis tumoral, colagenasa, quimotripsina, tripsina, calicreína y quimasa. Los ejemplos específicos de inhibidores de serina proteasa que se pueden incluir en las formulaciones incluyen, pero sin limitación, proteína reactiva C, inhibidores de alfa cisteína proteasa, inhibidor C-1, macroglobulina alfa 2, antiplasmina alfa 2, proteína A amiloide de serina, inhibidor de proteasa de leucocitos secretores, inhibidor de moco bronquial e inhibidor de inter-alfa-tripsina.

40 J. Semivida

Las formulaciones que se proporcionan pueden conservar sustancialmente su actividad original durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12 o más meses. Por ejemplo, las formulaciones liofilizadas almacenadas a -70°C o 25°C pueden conservar típicamente al menos el 70-95% de su actividad cuando se almacenan durante 6 meses. Algunas composiciones liofilizadas conservan el 90%, el 95%, el 98% o una actividad mayor cuando se almacenan durante 6
45 meses o más. Incluso a temperaturas más elevadas tales como 40-50°C, las composiciones liofilizadas conservan al menos el 85-80% de su actividad original a lo largo de un periodo de seis meses. Se observó que determinadas composiciones eran 5000-8000 veces tan estables como las composiciones no estabilizadas. Las composiciones pueden ser estables y adecuadas para uso farmacéutico durante al menos 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses o incluso más tiempo.

50 IV. Formulación y Administración

Los componentes de la formulación (por ejemplo, proteína, carbohidrato, tensioactivo, antioxidante y/o tampón) se mezclan en conjunto de acuerdo con métodos convencionales en la técnica. En algunos casos, por ejemplo, se
55 mezcla una solución de proteína concentrada con un volumen de solución que contiene los otros componentes de la formulación. Como un ejemplo específico, 4 volúmenes de solución de proteína concentrada (por ejemplo, 60-65 mg/ml) se mezclan con un volumen de una mezcla 5 x de los otros componentes para obtener una solución final que tiene una concentración de proteína de aproximadamente 48-52 mg/ml y con la concentración de los otros componentes en los intervalos especificados anteriormente. Esta solución resultante se filtra a través de un filtro de
60 0,2 micrómetros para esterilizar la solución y posteriormente se transfiere a viales de vidrio esterilizados. Estos viales se sellan con tapones estériles y después se liofilizan. Cuando está lista para su uso, la composición se puede reconstituir añadiendo agua esterilizada. En el Ejemplo más adelante se proporcionan detalles adicionales.

Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas preferentemente son de pureza elevada y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos (por ejemplo, al menos grado de Alimento Nacional (NF), generalmente al menos grado analítico y más típicamente al menos grado farmacéutico). Hasta el

punto en que un compuesto determinado se tiene que sintetizar antes del uso, el producto resultante típicamente está sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Las composiciones también se preparan en condiciones GMP.

Si la formulación se tiene que administrar como un aerosol en polvo seco, la formulación en polvo típicamente se lleva a un tamaño para permitir el transporte del polvo al pulmón profundo. Las directrices con respecto al tamaño de partícula apropiado y los métodos para preparar formulaciones de AAT en polvo seco se proporcionan en la Patente de los Estados Unidos N° 5.993.783.

V. Métodos de Tratamiento

Las formulaciones de AAT que se proporcionan se pueden usar en tratamiento terapéutico y profiláctico de un paciente con deficiencia de AAT o de un paciente susceptible a una deficiencia de este tipo. Tales métodos son útiles para aliviar o prevenir los efectos dañinos asociados con deficiencias de AAT.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento se refiere a tratamiento tanto terapéutico como profiláctico. El término también tiene por objeto referirse ampliamente a la reducción de la gravedad y/o frecuencia de síntomas, eliminación de síntomas y/o de la causa subyacente, prevención de la aparición de síntomas y/o de su causa subyacente y/o la mejora o remedio del daño. El término "paciente" como se usa en el presente documento tiene por objeto referirse en general a un paciente mamífero que tiene deficiencia de AAT o está en riesgo de una deficiencia de este tipo. Con frecuencia los métodos de tratamiento se usan para tratar seres humanos. Como se ha descrito en la sección de antecedentes, las deficiencias de AAT están relacionadas con factores genéticos, ambientales y de estilo de vida (por ejemplo, el hábito de fumar).

AAT generalmente se administra en métodos de tratamiento en una "cantidad eficaz". Esto refiere a una cantidad suficiente pero no tóxica del agente para proporcionar el efecto deseado (por ejemplo, inversión de deficiencia de AAT) en métodos de tratamiento terapéutico, la formulación/composición se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es una cantidad suficiente para ralentizar o revertir una deficiencia de AAT, para eliminar la deficiencia o para remediar los síntomas asociados con una deficiencia de AAT. Tales métodos terapéuticos en algunos casos se continúan hasta que los niveles de AAT en el tracto respiratorio inferior (por ejemplo, el pulmón inferior) están en niveles típicos de individuos sin una deficiencia de AAT. Cuando se administra tratamiento profiláctico, la formulación se administra en una "cantidad profilácticamente eficaz". Ésta en general es una cantidad suficiente para retardar o prevenir la aparición de una deficiencia de AAT en un paciente susceptible a una deficiencia de AAT (por ejemplo, debido a factores genéticos u otros factores de riesgo).

En general, la composición se administra a un paciente de forma que la misma alcanza el tracto respiratorio inferior (es decir, el pulmón profundo) del paciente. Para formulaciones líquidas esto se consigue típicamente nebulizando la formulación líquida reconstituida de acuerdo con medios establecidos en la técnica. La formulación nebulizada después se puede inhalar por el paciente y transportarse de este modo a las regiones deseadas del pulmón profundo. Se puede utilizar cualquiera de una diversidad de nebulizadores conocidos en la técnica para nebulizar las formulaciones. Los nebulizadores ilustrativos que se pueden usar con algunas de las formulaciones descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.150.071; 4.198.969; 4.253.468; 4.301.970; 4.453.542; 4.150.071; y 4.620.870. Los métodos que se refieren a la administración de formulaciones de AAT usando nebulizadores se describen en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.618.786 y 5.780.440.

Si la formulación es un polvo y se tiene que administrar como un polvo seco, se pueden usar los nebulizadores y métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 5.993.783, por ejemplo.

Como lo apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de AAT dependerá de diversos factores. Tales factores incluyen, pero sin limitación la edad y peso del paciente, frecuencia de administración y la gravedad de la deficiencia de AAT (por ejemplo, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico). La toxicidad y eficacia terapéutica se pueden determinar de acuerdo con procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivo de tejidos y/o modelos animales experimentales, incluyendo, por ejemplo, determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). En determinados métodos de tratamiento, la dosis de AAT varía desde aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día. En otros casos, la cantidad de dosis varía desde aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal/día. Cuando se tratan pacientes con síntomas menos graves o en determinados métodos profilácticos, los niveles de dosis pueden ser algo menores, variando desde aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal/día.

Las formulaciones se pueden adaptar por un médico tratante de acuerdo con diversos programas dependiendo de la gravedad de la deficiencia de AAT del paciente y la concentración de ATT en la formulación. En casos menos graves o para tratamiento profiláctico, por ejemplo, la formulación se puede administrar únicamente cada pocos días hasta una vez al día. Los casos más graves pueden necesitar que la formulación se administre varias veces al día (por

ejemplo, 2-4 veces).

Las formulaciones que se proporcionan se pueden administrar para tratar básicamente cualquier enfermedad relacionada con el pulmón que sea sensible a AAT, tales como diversas enfermedades de deficiencia de AAT. Por lo tanto, por ejemplo, debido a que AAT es un inhibidor de elastasa, catepsina G y/o proteinasa 3, las formulaciones se pueden usar para tratar enfermedad pulmonar asociada con la actividad de estas enzimas. Debido a que AAT también inhibe la activación de neutrófilos, mastocitos y células T, las composiciones también se pueden usar para tratar enfermedades asociadas con la activación de estos tipos celulares. Los ejemplos específicos de enfermedades que se pueden tratar incluyen enfisema pulmonar, asma, síndrome de distrés respiratorio adulto, síndrome de distrés respiratorio neonatal, síndrome de sepsis y fibrosis quística.

El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar determinados aspectos de las formulaciones y métodos descritos pero no se debe interpretar como limitante de la invención reivindicada.

15 EJEMPLO

I. Introducción

20 Cuando las proteínas se retiran de su entorno natural se pueden someter a una diversidad de condiciones que pueden influir negativamente sobre su estabilidad. Los estudios con soluciones acuosas de AAT mostraron que dentro de 7 días la actividad de AAT puede caer tanto como el 48% cuando se almacena a 45°C. Debido al valor de AAT como un agente terapéutico, existe una necesidad sustancial de formulaciones de AAT estables.

25 Para apoyar la exploración de formulaciones liofilizadas para rAAT, se prepararon como compuestos nueve formulaciones, se liofilizaron y se colocaron en estabilidad durante hasta seis meses. Se incluyeron cuatro excipientes en las formulaciones: 1) trehalosa (estabilizador de proteína), 2) Tween-80 (tensioactivo), 3) metionina (antioxidante) y 4) fosfato de sodio (agente de tamponamiento). Las nueve formulaciones tenían niveles variables de 1) proteína rAAT, el 5% y el 10% (p/v), 2) trehalosa, del 0% al 5% (p/v) y 3) Tween-80, del 0,0% al 0,5%. Todas las formulaciones incluyeron fosfato de sodio 10 mM y metionina 5 mM. La utilidad de la formulación para conservar rAAT se evaluó mediante la conducción de ensayos para determinar actividad funcional, proteína total y agregación (es decir, % de monómeros). La composición de estas nueve formulaciones se resume en la Tabla 1.

II. Métodos

35 A. Preparación de Tampón

Todos los tampones necesarios para la preparación de compuestos se prepararon en condiciones de laboratorio convencionales. A temperatura ambiente, los reactivos se pesaron y añadieron a agua desionizada (DI). Las soluciones se mezclaron, se ajustaron hasta el pH necesario y se llevaron hasta el volumen necesario con agua DI. Las soluciones después se filtraron a través de un filtro de 0,22 µ.

Típicamente, se preparó un tampón de fosfato de sodio 10 mM, ajustado a pH 7,4. Después, las cantidades necesarias de trehalosa, Tween-80 y metionina se añadieron al tampón fosfato y las soluciones se mezclaron, se ajustaron hasta el pH necesario y se llevaron hasta el volumen necesario con agua DI. Después las soluciones se filtraron a través de un filtro de 0,22 µ.

B. Descongelamiento y Procesamiento de Sustancia de Fármaco a Granel de rAAT (BDS)

50 La BDS se almacenó a -70°C y se permitió que se descongelara a aproximadamente 30°C. La BDS se usó "tal cual", sin procesamiento adicional, para la producción de formulaciones 1-3 y 4-5. Sin embargo, se usó un lote diferente para la producción de formulaciones 6-9, que necesitaron un intercambio de tampón frente a Fosfato de Sodio 10 mM, pH 7,4 y concentración de ~ 50 mg/ml hasta ~ 100 mg/ml. Ambas etapas se consiguieron usando Filtración de Flujo Tangencial.

55 C. Formulación de BDS de rAAT y Liofilización

Todas las formulaciones se realizaron en condiciones de laboratorio convencionales, no bajo campana de flujo laminar. Los tampones de formulación se prepararon y mezclaron con BDS de rAAT en estas condiciones. Todas las soluciones de producto se prepararon para conseguir una composición final de acuerdo con la Tabla 1.

60 Después del taponamiento parcial, se colocaron sondas de temperatura dentro de los viales, al menos una para cada formulación. Se usó un termopar regular, termopar Omega y se aseguró dentro de los viales a través de un orificio perforado en el tampón de goma. La temperatura de la cámara fue temperatura ambiente o +5°C cuando se cargaron las bandejas. Una vez que se cargaron las bandejas, comenzaron los ciclos de liofilización.

65

D. Ensayo Post-liofilización (mes 0)

El aspecto de la torta se observó después de liofilización. Cada vial se ensayó para determinar la presencia de vacío usando el "ensayo de chispa". Los viales de cada formulación se reconstituyeron con 2 ml de Agua para Inyección (API) y se ensayaron para determinar proteína total (Practical Approaches to Protein Formulation Development, Byeong Chang y Susan Henderson, Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Editado por John F. Carpenter y Mark C. Manning, Pharmaceutical Biotechnology Volumen 13, Kluwer Academic/Plenum Publishers (2002), pág. 13), actividad funcional y contenido de monómero.

Cada vial se marcó con una etiqueta criogénica a medida que se sacaba de la bandeja. Después los viales se sellaron usando el sellador de laboratorio. Todos los viales de producto con vacío se colocaron en incubadoras a -70°C, +5°C, +25°C, +40°C, +50°C y +60°C para estudio de estabilidad. Se prepararon un mínimo de 6 viales.

E. Ensayo de Estabilidad

1. Extracción de vial de muestra: después de ensayo de 0 meses, las formulaciones 1-9 se colocaron en estabilidad a 6 temperaturas diferentes, -70°C, +5°C, +25°C, +40°C, +50°C y +60°C. En los puntos de tiempo indicados en las Tablas 2A y 2B, los viales de ensayo se extrajeron de las cámaras de estabilidad apropiadas. Dos viales se extrajeron de cada temperatura de almacenamiento y se marcaron #1 y #2. Cada vial se marcó con la identificación de punto de tiempo apropiada, en meses. Se permitió que los viales se equilibraran a temperatura ambiente antes de avanzar a la próxima etapa.

2. Reconstitución: cada vial se reconstituyó con 5,0 ml de Agua para Inyección, API, obtenida a partir de una botella recién abierta. Cada vial se agitó suavemente para permitir la disolución completa. Todos los viales se colocaron en un baño de agua helada a partir de este punto cuando no estaban en uso.

3. Preparación de diluciones de 1,0 mg/ml para ensayos de estabilidad: las diluciones de 1,0 mg/ml se prepararon de la manera siguiente: 500 µl de solución de 20 mg/ml a partir de cada vial se añadieron a 9,5 ml de Tris•Cl 0,2 M, pH 8,0, en un tubo de centrifuga de 15 ml. La concentración de proteína en cada tubo fue de aproximadamente 1 mg/ml. Cada concentración se verificó mediante A_{280} . El resultado de A_{280} se usó para calcular la proteína total en cada vial reconstituido. Se prepararon dos diluciones de 1 mg/ml a partir de cada vial de muestra.

4. Proteína total (A_{280}): Los 2 conjuntos de diluciones de 1 mg/ml se usaron para este ensayo. En resumen, se usó Tris Cl 0,2 M, pH 8,0 como un blanco. Después se añadieron 100 µl de Tris a varios pocillos en una placa de microtitulación UV. A continuación, 100 µl de cada muestra de 1 mg/ml se añadieron a cada uno de varios pocillos, predefinidos en el software. Una vez que todas las muestras se habían cargado en la placa, la placa se leyó a 280 nm y 320 nm. El resultado de datos se obtuvo como ABS_{280} , ABS_{320} y $ABS_{280-320}$. La $ABS_{280-320}$ fue la que se usó para los cálculos de proteína total y actividad.

5. Ensayo de actividad de rAAT: los 2 conjuntos de diluciones de 1 mg/ml se usaron para el ensayo de actividad. El ensayo se basa en la capacidad de rAAT y elastasa porcina pancreática (PPE) de formar un complejo covalente equimolar. Se generó una curva de referencia a partir de la respuesta óptica de la sustancia en presencia de diversas cantidades de PPE. La curva se utiliza para calcular la actividad funcional de rAAT determinando el porcentaje de complejo PPE-rAAT formado a partir de una cantidad dada de rAAT y PPE. Típicamente, este valor se expresa en moles de PPE frente a moles de rAAT. La actividad de alfa 1-antitripsina recombinante se determina incubando con concentraciones variables de elastasa porcina pancreática a 30°C durante 30 minutos. Durante esta incubación el rAAT se une a una parte de la PPE, dependiendo esto de la dilución de rAAT ensayada. Después de este periodo de incubación se añade un sustrato cromogénico (Suc-A-A-A-pNA) a la mezcla de reacción. El cromóforo se escinde mediante la PPE no unida por la rAAT. La p-nitroanilina liberada genera un color amarillo medido espectrofotométricamente a 405 nm. El porcentaje de inhibición se determina usando una referencia de PPE a concentraciones variables y comparando los valores de absorbancia obtenidos para las muestras de ensayo. La actividad de AAT se puede medir como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos N° 4.931.373.

6. Agregación de rAAT mediante ensayo de SEC-HPLC/UV: los dos grupos de diluciones de 1 mg/ml se usaron para el ensayo de agregación usando análisis de HPLC de exclusión por tamaño. Los picos que representan los estados de agregación diferentes se detectan y registran a medida que la proteína se eluye de la columna. Los parámetros de HPLC principal fueron: a) Concentración de Proteína: 1 mg/ml; b) Tampón de Dilución: Tris Cl 0,2 M, pH 8,0; c) Fase Móvil: KCl 200 mM, Na_2HPO_4 20 mM, NaCitrato 5 mM, pH 7,5, d) Columna de HPLC: TSK-GEL G3000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm, tamaño de partícula 5 µm, Toso Haas parte N° 08541, con columna de protección Guard SWxl, 6,0 mm x 40 mm, tamaño de partícula 7 µm, Toso Haas parte N° 08543; e) Gradiente de Bomba: Isocrático; f) Volumen de Inyección: 100 µl; g) Caudal: 0,3 ml/min; h) Detector: Detector de Longitud de Onda Variable, VWD; y f) Detección de Longitud de Onda: 280 nm.

III. Evaluación de Estabilidad

Todas las formulaciones, F1 - F9, se colocaron en estabilidad durante 0 - 6 meses. Las formulaciones se colocaron a niveles de temperatura variables como se ha descrito anteriormente. La proteína total, la actividad y la agregación de cada formulación se determinó a las temperaturas y condiciones de almacenamiento apropiados. Las muestras que se designan n/a indican que no se realizó una extracción de estabilidad y ensayo posterior.

A. Proteína y Recuperación de Actividad

La proteína total y la actividad de cada una de las nueve formulaciones, F1 - F9, se midió a temperaturas de -70°C, 5°C, 25°C, 40°C, 50°C y 60°C para almacenamiento de 0 a 6 meses. El valor de $ABS_{280-320}$ se llevó a una tabla. La proteína total de la formulaciones se determinó dividiendo este valor entre el coeficiente de extinción de rAAT (0,485) y multiplicando el cociente por 50 para producir un factor de dilución de 50 veces. La actividad de cada formulación se muestra en las Tablas 2A y 2B.

B. Recuperación de Contenido de Monómero

La agregación de cada una de las nueve formulaciones, F1 - F9 se midió a temperaturas de -70°C, 5°C, 25°C, 40°C, 50°C y 60°C para almacenamiento de 0 a 6 meses. Los cromatogramas de HPLC produjeron porcentajes tanto para la agregación como para el contenido de monómero de cada formulación.

C. Efecto de la Concentración de rAAT

El efecto de la concentración de rAAT sobre la estabilidad de las formulaciones se examinó determinando el contenido de monómero de las formulaciones F1 y F2. Ambas formulaciones contenían únicamente proteína rAAT en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4. La Formulación F1 contenía 50 mg/ml de rAAT, mientras que la formulación F2 contenía 100 mg/ml de rAAT.

D. Efecto de la Concentración de Tween-80

El efecto de la concentración de tween-80 sobre la estabilidad de las formulaciones de rAAT se examinó determinando el contenido de monómero de las formulaciones F5, F6, F7 y F8. Cada formulación contenía 50 mg/ml de rAAT, trehalosa al 2,5%, metionina 5 mM y porcentajes variables de tween-80 en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4.

E. Efecto de Concentración de Trehalosa

El efecto de la concentración de trehalosa sobre la estabilidad de las formulaciones de rAAT se examinó determinando el contenido de monómero de las formulaciones F1 - F9. Cada formulación contenía porcentajes variables de trehalosa (véase la Tabla 1 para las composiciones individuales). El contenido de monómero de estas formulaciones como una función de su porcentaje de trehalosa se puede observar en las Tablas 3A y 3B.

IV. Discusión

A. Evaluación de Estabilidad

1. Recuperación de Proteína

Las nueve formulaciones mostraron una carencia de cambio aparente en proteína total en su almacenamiento de 0 a 6 meses a las temperaturas indicadas. Existe variación (dentro del 15%) entre las nueve formulaciones; sin embargo, esto probablemente se debe a la variabilidad intrínseca del ensayo y está posiblemente asociado con el uso de una placa de micropocillos.

2. Recuperación de Actividad

Las temperaturas de almacenamiento de -70°C, 5°C, 25°C, 40°C y 50°C mostraron niveles de actividad que eran consistentes a lo largo del periodo de almacenamiento de 6 meses. Por ejemplo, las formulaciones F5 y F6, almacenadas a 25°C, mostraron niveles de actividad del 81,7% y el 78,1% para un almacenamiento de 0 meses y el 77,2% y el 82,4% para el almacenamiento de 6 meses, respectivamente. No hubo cambio aparente en las actividades de ninguna de las formulaciones almacenadas durante 0 - 6 meses a -70°C a 50°C. Cualquier variación existente posiblemente estaba asociada con una variabilidad intrínseca del ensayo y posiblemente asociada con el uso de una placa de micropocillo.

El único cambio aparente en la actividad estuvo asociado con las formulaciones F2, F4 y F9, almacenadas a 60°C. La formulación F2 mostró una reducción del 23% en actividad a partir de una inhibición del 62,4% (0 meses) al 39,4% a los 3 meses de almacenamiento. Se demostraron resultados similares con la formulación F4 en la cual la muestra de 0 meses tenía una actividad del 64,6%, mientras que la muestra, almacenada durante 4 meses a 60°C

tenía el 39,7%. El vínculo común entre estas dos formulaciones es que ninguna contenía trehalosa. Puede haber un vínculo posible entre la carencia de trehalosa presente en la formulación y la reducción aparente en la actividad de 0 a 4 meses de almacenamiento a 60°C. La formulación F9 contenía trehalosa al 1% mientras que las seis formulaciones restantes contenían el 2,5%. La actividad de F9 tuvo una reducción posible del 76,7% de inhibición a los 0 meses de almacenamiento a 60°C al 49,1% a los 6 meses de almacenamiento. En comparación con las formulaciones F6, F7 y F8 que tuvieron actividades del 78,1%, el 81,6% y el 78,9% a los 0 meses y el 79,7%, el 72,6% y el 66,1% a los 6 meses de almacenamiento, respectivamente, la formulación F9 mostró una reducción mayor a los 6 meses de almacenamiento. Esto indica una asociación posible entre la actividad reducida y el porcentaje más bajo de trehalosa presente en la formulación.

B. Recuperación de Contenido de Monómero

1. Efecto de Concentración de rAAT

La formulación F1 contenía 50 mg/ml de rAAT mientras que la formulación F2 contenía 100 mg/ml de rAAT, ambas en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4. No hubo diferencia aparente en el contenido de monómero de las formulaciones F1 y F2 a un tiempo de almacenamiento de 0 a 3 meses. Por ejemplo, la formulación F1 contenía un porcentaje de monómero del 49,8 tras el almacenamiento durante 3 meses a 60°C. En las mismas condiciones, la formulación F2 contenía el 44,0% de monómero, comenzando ambas formulaciones con un contenido de monómero del 95,5% a los 0 meses de almacenamiento. Por lo tanto, la concentración más elevada de proteína en la formulación F2 en comparación con F1 no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad de la formulación.

2. Efecto de la Concentración de Tween-80

El efecto de la concentración de Tween-80 sobre la estabilidad de cuatro formulaciones de rAAT se investigó determinando el porcentaje de contenido de monómero de cada formulación con concentraciones variables de Tween-80. Tween-80 no tenía un efecto aparente sobre la estabilidad de las formulaciones, F5, F6, F7 y F8. El porcentaje de monómero fue consistente entre todas las formulaciones en todas las condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, la formulación F6 con tween-80 al 0% mostró un 84,2% de monómero tras almacenamiento a 60°C durante 6 meses, mientras que la formulación F7 (tween-80 al 0,02%) y F8 (tween-80 al 0,10%) mostraron contenidos de monómero de 82,0% y el 81,4%, respectivamente.

3. Efecto de la Concentración de Trehalosa

Para investigar el efecto de la concentración de trehalosa sobre la estabilidad de las formulaciones de rAAT, se analizó el contenido de monómero de las nueve formulaciones, F1 - F9. Las formulaciones F3 - F9 no mostraron cambio aparente en el contenido de monómero a partir de sus valores iniciales en almacenamiento durante seis meses y las formulaciones F1 y F2 a los 3 meses de almacenamiento a -70°C, 5°C y 25°C (Tabla 3A). El primer cambio observable ocurre a una temperatura de almacenamiento de 40°C, con los efectos más espectaculares a 60°C. El contenido de monómero de las formulaciones F1, F2 y F4 que contenían trehalosa al 0% disminuyó desde el 95,5% y el 94,1% a los 0 meses de almacenamiento hasta el 59,4%, 53,6% y el 60,5% después de 2 meses de almacenamiento a 60°C, respectivamente (Tabla 3B). Esto es una reducción definitiva en el contenido de monómero en comparación con las formulaciones restantes.

La formulación F9, que contenía trehalosa al 1,0%, también mostró una reducción pequeña en el porcentaje del monómero en la que el porcentaje original, el 98,0%, disminuyó hasta el 57,8% después de almacenamiento durante un tiempo de 6 meses. Esto fue una reducción ligeramente mayor en el contenido de monómero que las formulaciones que contenían trehalosa al 2,5% o al 5,0%. Esas formulaciones, F6, F7 y F8, disminuyeron hasta únicamente el 84,2%, el 82,0% y el 81,4% del monómero después de seis meses de almacenamiento a partir de sus valores iniciales del 98,3%, el 98,1% y el 97,4%, respectivamente. Por lo tanto, las formulaciones que contenían un mínimo de trehalosa al 2,5% demostraron la mayor estabilidad para mantener una reducción menor en el contenido de monómero tras el almacenamiento durante 6 meses a 60°C.

V. Conclusión

Todas las formulaciones ensayadas mostraron mejoras significativas en la estabilidad con relación a las composiciones de AAT sin estabilizantes. La inclusión de un carbohidrato tal como trehalosa tuvo el efecto beneficioso más evidente sobre la estabilidad de los diversos factores ensayados. La inclusión de un tensioactivo tuvo un efecto menor sobre la estabilidad, al igual que las concentraciones de proteína AAT aumentadas. Las formulaciones que contenían trehalosa al 2,5% se comportaron de forma similar a una formulación que contenía el 5%. Ya que la cantidad mínima de excipiente es ideal para el desarrollo de producto, una formulación que tiene una composición de aproximadamente el 2,5% de carbohidrato (por ejemplo, trehalosa) junto con rAAT al 5%, tensioactivo al 0,1% o al 0,02% (por ejemplo, TWEEN-80), antioxidante 5 mM (por ejemplo, metionina) y tampón 10 mM (por ejemplo, fosfato de sodio (pH 7,4)), proporciona una buena formulación de base.

Se comprende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen únicamente fines

ilustrativos y las diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a expertos en la materia y se tienen que incluir dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Tabla 1. La Composición de rAAT de Formulaciones 1-9 (F1-F9)

Formulación	rAAT (mg/ml)	Trehalosa (%)	Metionina (mM)	Tween-80 (%)
F1	50	0	0	0,0
F2	100	0	0	0,0
F3	50	5	5	0,5
F4	50	0	5	0,5
F5	50	2,5	5	0,5
F6	50	2,5	5	0,0
F 7	50	2,5	5	0,02
F8	50	2,5	5	0,1
F9	50	1	5	0,1

Nota: Todas las formulaciones se prepararon en Fosfato de Sodio 10 mM, pH 7,4.

5

Tabla 2A. Actividad (%) de Formulaciones F1-F9 a -70°C, 5°C y 25°C durante Almacenamiento de 0 a 6 Meses

-70°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	70,9	89,9	69,3	77,0	N/A	81,2	N/A
F2	62,4	71,4	69,4	84,4	67,2	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	75,0	76,6	85,7	76,5	N/A	82,6	89,0
F4	64,6	82,3	67,7	74,3	N/A	90,2	76,5	73,2
F5	81,7	84,0	70,3	76,0	N/A	88,9	81,3	82,0
F6	77,1	N/A	80,4	74,6	90,9	N/A	N/A	87,7
F 7	81,6	N/A	102,1	79,4	79,3	N/A	N/A	76,9
F8	78,9	N/A	78,2	86,4	81,4	N/A	N/A	85,2
F9	76,7	N/A	72,4	93,3	83,0	N/A	N/A	88,0
5°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	N/A	N/A	N/A	76,9	N/A	80,3	N/A
F2	62,4	N/A	N/A	N/A	69,8	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	N/A	N/A	N/A	68,2	N/A	80,2	90,8
F4	64,6	N/A	N/A	N/A	N/A	69,6	68,5	73,3
F5	81,7	N/A	N/A	N/A	N/A	86,0	119,9	81,3
F6	78,1	N/A	N/A	85,9	78,3	N/A	N/A	85,6
F7	81,6	N/A	N/A	84,4	81,7	N/A	N/A	86,3
F8	78,9	N/A	N/A	85,9	83,4	N/A	N/A	81,7
F9	76,7	N/A	N/A	74,7	76,9	N/A	N/A	73,9

10

25°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	N/A	N/A	N/A	75,1	N/A	73,9	N/A
F2	62,4	N/A	N/A	N/A	62,3	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	N/A	N/A	N/A	71,9	N/A	76,4	96,6
F4	64,6	N/A	N/A	N/A	N/A	78,1	64,3	57,6
F5	81,7	N/A	N/A	N/A	N/A	80,0	76,5	77,2
F6	78,1	N/A	N/A	72,1	87,0	N/A	N/A	82,4
F7	81,6	N/A	N/A	87,3	75,3	N/A	N/A	77,1
F8	78,9	N/A	N/A	80,0	88,7	N/A	N/A	76,9
F9	76,7	N/A	N/A	85,4	81,0	N/A	N/A	88,0

Tabla 2B. Actividad (%) de Formulaciones F1-F9 a 40°C, 50°C y 60°C durante Almacenamiento de 0 a 6 Meses

40°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	N/A	62,6	66,0	79,7	N/A	69,9	N/A
F2	62,4	N/A	65,3	82,4	57,7	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	N/A	74,7	91,8	57,1	N/A	73,4	67,4
F4	64,6	N/A	59,8	62,6	N/A	67,6	59,8	63,2
F5	81,7	N/A	69,1	82,4	N/A	92,8	669,2	72,1
F6	78,1	N/A	79,7	77,0	71,8	N/A	N/A	81,7
F7	81,6	N/A	80,5	87,5	85,6	N/A	N/A	80,4
F8	78,9	N/A	70,1	81,9	79,8	N/A	N/A	75,8
F9	76,7	N/A	68,1	60,8	72,8	N/A	N/A	71,3
50°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	63,5	62,3	61,5	63,1	N/A	N/A	N/A
F2	62,4	65,5	63,7	76,0	73,0	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	67,1	70,4	85,8	71,7	N/A	N/A	N/A
F4	64,6	70,3	56,0	62,6	N/A	70,5	N/A	N/A
F5	81,7	80,2	67,9	81,6	N/A	78,8	N/A	N/A
F6	78,1	N/A	77,7	71,5	79,7	N/A	N/A	81,4
F7	81,6	N/A	82,6	78,8	78,5	N/A	N/A	74,4
F8	78,9	N/A	72,2	81,1	85,0	N/A	N/A	N/A
F9	76,7	N/A	72,4	85,6	69,8	N/A	N/A	71,3

60°C								
Formulación	Tiempo, Meses							
	0	0,5	1	2	3	4	5	6
F1	59,0	60,6	51,5	72,2	51,4	N/A	N/A	N/A
F2	62,4	69,2	58,6	58,9	39,4	N/A	N/A	N/A
F3	54,6	70,9	64,5	85,1	64,5	N/A	N/A	N/A
F4	64,6	71,2	54,6	53,1	N/A	39,7	N/A	N/A
F5	81,7	78,1	63,9	94,7	N/A	73,7	N/A	N/A
F6	78,1	N/A	76,5	78,9	72,8	N/A	N/A	69,7
F7	81,6	N/A	79,3	77,9	71,8	N/A	N/A	72,6
F8	78,9	N/A	70,0	85,4	77,1	N/A	N/A	66,1
F9	76,7	N/A	64,6	58,4	65,8	N/A	N/A	49,1

5 **Tabla 3A. Efecto de Concentración de Trehalosa sobre el Contenido de Monómero (%) a Temperaturas de -**

70°C, 5°C y 25°C durante un Almacenamiento de 0 a 6 Meses

Número de Formulación ^A	Temperatura	Trehalosa	Meses				
			0	1	2	3	6
1	-70°C	0,0%	95,5	95,8	95,6	94,4	NR
2		0,0%	NR	95,2	94,5	95,1	NR
4		0,0%	94,1	96,7	96,0	NA	93,7
9		1,0%	98,0	97,5	97,4	96,8	96,6
6		2,5%	98,3	97,9	97,9	97,5	97,1
7		2,5%	98,1	97,7	97,8	97,2	97,2
8		2,5%	97,4	97,6	97,8	96,4	93,6
5		2,5%	96,2	96,9	96,6	NA	96,6
3		5,0%	93,4	95,4	93,9	95,0	93,7
1		5°C	0,0%	95,5	NR	NR	95,1
2	0,0%		NR	NR	NR	94,5	NR
4	0,0%		94,1	NR	NR	NA	95,1
9	1,0%		98,0	NR	97,5	96,3	96,0
6	2,5%		98,3	NR	97,9	97,2	96,9
7	2,5%		98,1	NR	97,8	97,2	97,1
8	2,5%		97,4	NR	97,8	96,6	96,6
5	2,5%		96,2	NR	NR	NR	95,7
3	5,0%		93,4	NR	NR	92,9	95,6

ES 2 375 706 T3

1	25°C	0,0%	95,5	NR	NR	89,5	NR
2		0,0%	NR	NR	NR	92,0	NR
4		0,0%	94,1	NR	NR	NR	87,5
9		1,0%	98,0	NR	96,2	94,9	93,0
6		2,5%	98,3	NR	97,5	96,6	96,1
7		2,5%	98,1	NR	97,7	96,3	95,6
8		2,5%	97,4	NR	97,1	96,0	95,5
5		2,5%	96,2	NR	NR	NR	95,1
3		5,0%	93,4	NR	NR	92,8	94,2
^Véase la Tabla 1 para las composiciones de formulación.							

5

Tabla 3B Efecto de Concentración de Trehalosa sobre el Contenido de Monómero (%) a Temperaturas de 40°, 50°C y 60°C durante un Almacenamiento de 0 a 6 Meses

Número de Formulación ^A	Temperatura	Trehalosa	Meses				
			0	1	2	3	6
1	40°C	0,0%	95,5	91,4	89,1	81,2	NR
2		0,0%	NR	90,5	86,2	80,8	NR
4		0,0%	94,1	92,4	86,7	NA	80,2
9		1,0%	98,0	94,5	90,0	89,5	86,1
6		2,5%	98,3	96,6	96,2	95,1	92,7
7		2,5%	98,1	96,6	96,1	94,6	93,6
8		2,5%	97,4	96,4	95,9	93,9	92,8
5		2,5%	96,2	95,7	95,8	NA	90,1
3		5,0%	93,4	95,4	94,4	93,6	92,8
1		50°C	0,0%	95,5	85,4	78,8	69,0
2	0,0%		NR	81,9	71,6	64,3	NR
4	0,0%		94,1	85,1	79,5	NA	NA
9	1,0%		98,0	91,5	90,0	83,5	75,9
6	2,5%		98,3	95,7	95,1	92,2	89,6
7	2,5%		98,1	95,6	94,5	92,1	89,4
8	2,5%		97,4	94,6	94,8	90,6	NA
5	2,5%		96,2	94,0	93,2	NA	NA
3	5,0%		93,4	94,2	93,3	90,3	NR

1	60°C	0,0%	95,5	80,2	59,4	49,8	NR
2		0,0%	NR	74,4	53,6	44,3	NR
4		0,0%	94,1	73,9	60,5	NA	NA
9		1,0%	98,0	85,6	81,5	71,7	57,8
6		2,5%	98,3	94,6	93,3	88,4	84,2
7		2,5%	98,1	94,1	92,9	88,5	82,0
8		2,5%	97,4	93,0	89,2	87,3	81,4
5		2,5%	96,2	89,9	90,9	NA	NA
3		5,0%	93,4	91,1	90,2	86,3	NR
^Véase la Tabla 1 para las composiciones de formulación.							

REFERENCIAS

- 5 Practical Approaches to Protein Formulation Development, Byeong Chang y Susan Henderson, Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Editado por John F. Carpenter y Mark C. Manning, Pharmaceutical Biotechnology Volumen 13, Kluwer Academic/Plenum Publishers (2002), pág. 13
- 10 Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, Editado por Steven Nail y Michael J. Akers, Pharmaceutical Biotechnology Volumen 14, Kluwer Academic/Plenum Publishers (2002), págs. 65 - 66.
- Lyophilization: Introduction and Basic Principles, Thomas A. Jennings, Interpharm Press (1999), págs. 43, 261 - 279.
- 15 Stabilization of Protein Pharmaceuticals in Freeze-dried Formulations, Ken-ichi Izutsu y Sumie Yoshioka, Stabilization of Freeze-dried Protein Pharmaceuticals.
- 20 Surfactant-Protein Interactions, Theodore W. Randolph, LaToya S. Jones, Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Editado por John F. Carpenter y Mark C. Manning, Pharmaceutical Biotechnology Volumen 13, Kluwer Academic/Plenum Publishers (2002), pág. 13.
- Handbook of Pharmaceutical Additives 2ª Edición, Compilado por Michael e Irene Ash, Synapse Information Resources Inc. (2002), págs. 797 – 798.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N°: 1 Secuencia de aminoácidos de alfa 1-antitripsina

```

1 mpssvswgil llaglcclvp vslaedpqqd aaqktdtshh dqdhptfnki tpnlaefafs
61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamlsl gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihgfg
121 qellrtlnqp dsqlqlttgn glflsegkkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdteeakkq
181 indyvekgtq gkivdlvkel drdtvfalln yiffkgkwer pfevkdtee dfhvdqvttv
241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiffldp egklqhlene lthdiitkfl
301 enedrrsas1 hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnga dlsqvteeap lklskavhka
361 vltidekgte aagamfleai pmsirpevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

```

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica formulada como un polvo, que comprende una alfa 1-antitripsina (AAT), trehalosa, un tensioactivo y un antioxidante, en la que la AAT es:
- (a) una AAT nativa;
 - (b) una AAT recombinante; o
 - (c) una variante de AAT que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 85% con SEC ID N°: 1 y puede inhibir elastasa.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición está en una forma adecuada para administración a un paciente a través de terapia de inhalación.
- 15 3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antioxidante se selecciona entre metionina, glutatión, cisteína, ácido ascórbico y N-acetil cisteína.
- 20 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la AAT, trehalosa, tensioactivo y antioxidante están presentes en cantidades de forma que si el polvo se solubiliza en solución acuosa para administración a un paciente la concentración de AAT es 1-100 mg/ml, la concentración de trehalosa es del 1-5% (p/v), la concentración del tensioactivo es del 0,01-0,5% (p/v) y la concentración de antioxidante es 1-10 mM.
- 25 5. La composición de la reivindicación 4, en la que la concentración de AAT es 10-50 mg/ml.
6. La composición de la reivindicación 1, comprendiendo además un tampón y en la que
- (a) el antioxidante es metionina; y
 - (b) la AAT, trehalosa, tensioactivo y metionina están presentes en cantidades de forma que si el polvo se solubiliza en solución acuosa para administración a un paciente (i) la concentración de AAT es 10-50 mg/ml, (ii) la concentración de trehalosa es 10-50 mg/ml, (iii) la concentración de tensioactivo es del 0,01-0,5% (p/v) y (iv) la concentración de metionina es 1-10 mM.
- 30 7. La composición de la reivindicación 1, que comprende una alfa 1-antitripsina recombinante (AAT), en la que la proporción de AAT/carbohidrato (peso:peso) es 1:1 a 5:1.
- 35 8. La composición de la reivindicación 7, en la que la proporción es 1:1 a 2:1.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que el tensioactivo es Polisorbato 80 y el antioxidante es metionina.
- 40 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la composición se formula como un sólido.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la AAT es una AAT nativa.
- 45 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la AAT es AAT recombinante.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la AAT es una variante de AAT que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 85% con SEC ID N°: 1 y puede inhibir elastasa.
- 50 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la AAT está glicosilada.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la AAT está no glicosilada.
- 55 16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT), en la que la composición se tiene que administrar a los pulmones de un paciente.
- 60 17. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de la reivindicación 16, en la que la composición se tiene que administrar mediante inhalación.
18. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con la deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de la reivindicación 17, en la que la composición es un sólido y se tiene administrar convirtiendo el sólido en un aerosol para inhalación por el paciente.
- 65 19. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de las reivindicaciones 16 a 18, en la que la enfermedad es una enfermedad pulmonar asociada con la actividad de elastasa, catepsina G y/o proteinasa 3.

20. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de la reivindicación 19, en la que la enfermedad es un enfisema.
- 5 21. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de las reivindicaciones 16 a 18, en la que la enfermedad es una enfermedad inflamatoria pulmonar asociada con activación de neutrófilos, mastocitos o células T.
- 10 22. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de la reivindicación 21, en la que la enfermedad es asma.
- 15 23. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de la reivindicación 21, en la que la enfermedad es síndrome de distrés respiratorio adulto, síndrome de distrés respiratorio neonatal o síndrome de sepsis.
- 20 24. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que el paciente es susceptible a la enfermedad y la composición farmacéutica se tiene que administrar en una cantidad profilácticamente eficaz.
25. La composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar asociada con una deficiencia de alfa 1-antitripsina (AAT) de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que el paciente tiene la enfermedad y la composición farmacéutica se tiene que administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz.