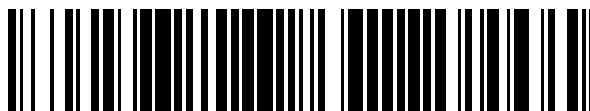


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 657**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/20 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07763599 .3**

96 Fecha de presentación: **06.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1986612**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Composiciones estabilizadas de proteínas que tienen un resto tiol libre**

30 Prioridad:
07.02.2006 US 771555 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
(100.0%)
300 Shire Way
Lexington MA 02421, US

72 Inventor/es:
ZHU, GAOZHONG;
LOWE, KRIS;
SHAHROKH, ZAHRA y
NGUYEN, VINH

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 657 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones estabilizadas de proteínas que tienen un resto tiol libre.

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de EEUU nº de serie 60/771.555, presentada el 7 de febrero de 2006.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones de proteínas que tienen tioles libres, las glucocerebrosidasas, y a métodos para fabricar y utilizar dichas composiciones. Las composiciones tienen una estabilidad optimizada.

Antecedentes de la invención

10 Un producto de fármaco (por ejemplo, que contiene una proteína) puede conservarse en forma líquida o liofilizada. Un producto de fármaco liofilizado a menudo se reconstituye añadiendo un diluyente de administración adecuado justo antes de que el paciente lo utilice.

15 Una proteína activa podría perderse como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo la desnaturalización y la agregación, así como de inestabilidades químicas que incluyen, por ejemplo, la hidrólisis, la desamidación y la oxidación. La estabilidad de un fármaco de proteína en una forma particular, por ejemplo, en una forma líquida o en una forma liofilizada, puede ser una consideración importante para la selección de la forma de un producto.

20 La solicitud de patente internacional WO 00/76480 describe composiciones farmacéuticas que comprenden cristales de un componente de red cristalina farmacéuticamente aceptable, y un ingrediente farmacéutico activo incluido dentro del componente de red cristalina. Uno de estos ingredientes farmacéuticos activos es la beta-glucocerebrosidasa. La publicación sugiere que este componente activo puede formularse junto con manitol, citrato de sodio, y polisorbato.

25 Wei Wang, "Lyophilisation and Development of Solid Protein Pharmaceuticals", International Journal of Pharmaceutics, vol. 203, pp. 1-60, proporciona un análisis del proceso de liofilización y su aplicación para formular productos farmacéuticos de proteínas sólidos. La publicación sugiere que se han utilizado azúcares o polioles, tales como sacarosa, trehalosa, manitol o sorbitol, para estabilizar proteínas liofilizadas para una conservación a largo plazo.

Lee *et al.*, "The Stabilization of Proteins by Sucrose", The Journal of Biological Chemistry, vol. 256, nº 14, 1981, describe el efecto de la sacarosa sobre la integridad estructural de tres proteínas, α -quimotripsina, quimotripsinógeno, y ribonucleasa.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína que tiene un tiol libre y un carbohidrato, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de la proteína, y en la que el pH de la composición es entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5, en la que la proteína que tiene un tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB), y en la que el carbohidrato es la sacarosa. La invención también proporciona un recipiente hermético a los gases que contiene dicha composición farmacéutica, un
35 componente de proteína, y un espacio superior, en el que el espacio superior es al menos 90% un gas inerte. La invención proporciona además un método para envasar dicha composición farmacéutica, que comprende poner en contacto la GCB con un gas inerte para reducir la cantidad de una especie reactiva, e introducir la GCB y el gas inerte en un recipiente hermético a gases.

También se proporciona la composición farmacéutica según se describe, para su uso en un método de tratamiento.

40 Otros aspectos de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente proporcionan una mayor estabilidad y caducidad aumentando la estabilidad de una proteína contenida en ellos.

45 Las composiciones descritas en la presente, por ejemplo, composiciones líquidas que contienen una proteína, tienen una estabilidad prolongada. Por ejemplo, bajo condiciones preseleccionadas, por ejemplo tras su conservación en un recipiente hermético a gases, a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o en algunas realizaciones durante más tiempo), una composición de proteínas mantendrá al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de la estabilidad que tenía antes de su conservación. La estabilidad, tal como se emplea en la presente, incluye parámetros tales como la estructura de la proteína (por ejemplo, minimizando o evitando los cambios en la estructura de la proteína, por ejemplo, la agregación de la proteína o la degradación de la
50 proteína (por ejemplo, fragmentación)) y/o la actividad biológica de la proteína, por ejemplo, la capacidad para convertir el sustrato en producto.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína, la degradación de la proteína, o los niveles de una actividad biológica de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. Por ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% de aumento en la cantidad de agregación de la proteína (por ejemplo, según se mide mediante una cromatografía de exclusión molecular), comparado con la cantidad de agregación de la proteína que había en la composición antes de la conservación (por ejemplo, conservación a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor)). La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares. Como ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% de aumento en la cantidad de degradación de la proteína (por ejemplo, según se mide mediante una HPLC en fase inversa), comparado con la cantidad de degradación de la proteína que había en la composición antes de la conservación (por ejemplo, conservación a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor)). La actividad biológica de una proteína puede medirse, por ejemplo, mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, ELISA (por ejemplo, para medir la unión o la actividad enzimática) y otros ensayos enzimáticos (por ejemplo, ensayos espectrofotométricos, fluorimétricos, calorimétricos, quimioluminiscentes, radiométricos, o cromatográficos), ensayos de quinasas, etc. Como ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% de disminución en una actividad biológica de la proteína (por ejemplo, actividad enzimática, por ejemplo, según se mide mediante un ensayo *in vitro*), comparado con la cantidad de actividad biológica que había en la composición antes de la conservación (por ejemplo, conservación a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor)).

En un aspecto, la proteína no modifica, por ejemplo, rompe, ningún otro componente de la composición. Por ejemplo, en una realización preferida, en una composición que contiene glucocerebrosidasa (GCB), la composición no contiene polisorbato como tensioactivo, porque la GCB puede reconocer al polisorbato como sustrato y puede romper el polisorbato para liberar ácidos grasos libres.

Las realizaciones de la invención tienen una estabilidad comparable a la de una composición liofilizada de la misma proteína. Una composición líquida descrita en la presente puede tener al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% del nivel de estabilidad de la proteína (por ejemplo, actividad retenida) de una composición liofilizada después de 3, 6, 9, 12 o 24 meses de conservación (por ejemplo, si una composición liofilizada tiene retenida 90% de su actividad a los 18 meses, la composición de la invención ha retenido al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de ese nivel).

En un aspecto, la descripción incluye una composición que incluye una proteína que tiene un tiol libre y un carbohidrato, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de la proteína, en la que la proteína que tiene un tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB), y en la que el carbohidrato es la sacarosa. En algunas realizaciones, la composición también incluye un antioxidante, en la que el antioxidante y el carbohidrato están presentes en cantidades suficientes para mantener la estabilidad de la proteína, y con ello de la composición, y en la que el pH de la composición es menor que 7,0. Por ejemplo, el antioxidante es cisteína, clorhidrato de cisteína (cisteína-HCl), o metionina (por ejemplo, presente entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 10% (en peso/volumen)), y el carbohidrato es la sacarosa (por ejemplo, presente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40% (en peso/volumen)). El pH está en el intervalo de 4,5 a 6,5, por ejemplo, preferiblemente entre 5,0 y 6,0, por ejemplo, más preferiblemente entre 5,5 y 5,8 (por ejemplo, aproximadamente 5,7). En una realización preferida, la composición incluye un tensioactivo (por ejemplo, poloxámero 188).

En una realización preferida, el pH de la composición es, por ejemplo, entre 4,5 y 6,5, por ejemplo, entre 5,0 y 6,0, por ejemplo, entre 5,5 y 5,8 (por ejemplo, aproximadamente 5,7).

En ciertas realizaciones, la estabilidad es al menos 5-80% mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80% mayor), bajo condiciones preseleccionadas, que la estabilidad de una composición que se diferencia porque carece del carbohidrato (y del antioxidante, si se usa).

En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para estabilizar el tiol libre de la proteína (por ejemplo, la proteína muestra menos formación de agregados, por ejemplo, la proteína muestra aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% menos formación de agregados bajo

condiciones preseleccionadas que una composición de proteínas por lo demás idéntica que no contiene el carbohidrato (y el antioxidante, si se usa).

5 En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para aumentar la estabilidad de la proteína (por ejemplo, la proteína muestra menos formación de agregados, por ejemplo, la proteína muestra aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% menos formación de agregados bajo

10 condiciones preseleccionadas que una composición de proteínas por lo demás idéntica que no contiene el carbohidrato (y el antioxidante, si se usa).

En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para inhibir la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína para formar un agregado.

15 En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para inhibir la formación de un agregado formado mediante la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína en al menos 5-80% (por ejemplo, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80% mayor), bajo condiciones preseleccionadas, comparado con la misma composición que carece del carbohidrato (y del antioxidante, si está presente).

20

25 En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para que, tras una conservación en un recipiente hermético a gases a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de 6 meses, la composición retenga al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de la estabilidad que tenía la composición antes de la conservación. En una realización preferida, la conservación se produce en la oscuridad.

30 En ciertas realizaciones, el carbohidrato (y opcionalmente, un antioxidante) está presente en una cantidad suficiente para que tenga una estabilidad comparable con la de una composición liofilizada que comprende polisorbato-20 aproximadamente al 0,01%, pH 6,0, citrato 50 mM. En ciertas realizaciones, la composición también incluye aproximadamente 1-40% (por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, por ejemplo, de aproximadamente 8% a aproximadamente 24%, por ejemplo, aproximadamente 16%, por ejemplo, aproximadamente 3-5% en peso por volumen (en p/v)) de un carbohidrato. El carbohidrato es la sacarosa.

35

En una realización preferida, la composición es un líquido.

En ciertas realizaciones, la composición contiene menos de aproximadamente 10% de O₂ (por ejemplo, menos de aproximadamente 5% de O₂, por ejemplo, menos de aproximadamente 2% de O₂). En una realización preferida, la cantidad de O₂ disuelta es menor que la cantidad de gases inertes disueltos en la composición.

40 En ciertas realizaciones, la composición se fabrica mediante un método que comprende la eliminación física de O₂ de la composición (por ejemplo, desgasificando la composición, purgando una disolución con un gas distinto del O₂, por ejemplo, con un gas inerte (por ejemplo, con N₂ o Ar), por ejemplo, burbujeando un gas distinto del O₂ (por ejemplo, N₂ o Ar) a través de la composición).

45 En ciertas realizaciones, la proteína en la composición que contiene un tiol libre tiene cero, dos, cuatro, seis, o más grupos tiol que forman puentes sulfhidrilo. En ciertas realizaciones, la proteína que contiene un tiol libre tiene dos, tres o más grupos tiol libres, y tiene cero, dos, cuatro o más grupos tiol que forman puentes sulfhidrilo, por unidad activa de proteína.

La proteína que tiene un grupo tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB).

50 En un aspecto, la descripción incluye una composición líquida de GCB que incluye GCB y sacarosa, que se produce exponiendo la composición a un gas inerte (por ejemplo, N₂), y el gas inerte está presente en una concentración mayor que en la atmósfera ambiental, por ejemplo, la composición contiene al menos aproximadamente 85%, 90%, 95% o 99%, o preferiblemente 100% de gas inerte. En ciertas realizaciones, la composición también incluye un antioxidante. Por ejemplo, el antioxidante es cisteína, cisteína-HCl, o metionina (por ejemplo, presente entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 10% (en peso/volumen)), y el carbohidrato es la sacarosa (por ejemplo, presente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40% (en peso/volumen)). El pH está en el intervalo de 4,5 a 6,5, por ejemplo, preferiblemente entre 5,0 y 6,0, por ejemplo, más preferiblemente entre 5,5 y 5,8

55

(por ejemplo, aproximadamente 5,7). En ciertas realizaciones, la composición también contiene un tensioactivo (por ejemplo, poloxámero 188).

5 En un aspecto, la descripción incluye una composición que incluye glucocerebrosidasa y sacarosa, y tiene un pH menor que el pKa de un tiol libre sobre la proteína, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para aumentar la estabilidad de la proteína a ese pH.

10 En ciertas realizaciones, la estabilidad es al menos 5-80% mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80% mayor), bajo condiciones preseleccionadas, que la estabilidad de una composición que carece del carbohidrato y que tiene un pH mayor que el pKa de un tiol libre sobre la proteína.

15 En ciertas realizaciones, el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para estabilizar el tiol libre de la proteína.

En ciertas realizaciones, el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para inhibir la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína para formar un agregado.

20 En ciertas realizaciones, el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para inhibir la formación de un agregado, formado mediante la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína en al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% bajo condiciones preseleccionadas, comparado con la misma composición que carece del carbohidrato.

25 En ciertas realizaciones, el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente de forma que, tras la conservación en la oscuridad en un recipiente hermético a gases a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor), la composición retiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de la estabilidad que tenía antes de la conservación.

En ciertas realizaciones, el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para que la composición tenga una estabilidad comparable a la de una composición liofilizada.

En una realización preferida, la composición es un líquido.

30 En ciertas realizaciones, la composición contiene menos del 10% de O₂ (por ejemplo, menos del 5% de O₂, por ejemplo, menos del 2% de O₂). En ciertas realizaciones, la cantidad de O₂ disuelta es menor que la cantidad de gases inertes disueltos en la composición.

35 En ciertas realizaciones, la composición se fabrica mediante un método que comprende la eliminación física de O₂ de la composición (por ejemplo, desgasificando la composición, purgando una disolución con un gas distinto del O₂, por ejemplo, con un gas inerte (por ejemplo, con N₂ o Ar), por ejemplo, burbujeando un gas distinto del O₂ (por ejemplo, N₂ o Ar) a través de la composición).

En ciertas realizaciones, la proteína en la composición que contiene un tiol libre tiene dos, tres, cuatro, cinco o más grupos tiol libres por unidad activa de proteína.

40 En ciertas realizaciones, la proteína en la composición que contiene un tiol libre tiene dos, cuatro, seis o más grupos tiol que forman puentes sulfhidrilo por unidad activa (por ejemplo, dímero) de proteína. En ciertas realizaciones, la proteína que contiene un tiol libre tiene dos, tres o más grupos tiol libres, y tiene dos, cuatro o más grupos tiol que forman puentes sulfhidrilo por unidad activa de proteína.

La proteína que contiene un tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB).

45 En un aspecto, la descripción incluye una composición líquida de GCB que incluye GCB y sacarosa, y el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para mantener la integridad biofísica/bioquímica (por ejemplo, peso molecular, distribución de cargas) y las características/propiedades de bioactividad de la GCB a ese pH. Por ejemplo, la composición retiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de la actividad biológica que tenía antes de la conservación (por ejemplo, conservación a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor)). Como otro ejemplo, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100% de las proteínas en la composición retienen el peso molecular medio o la distribución media de cargas que tenían las proteínas antes de la conservación (por ejemplo, conservación a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o mayor)).

El pH está en el intervalo de 4,5 a 6,5, por ejemplo, de 5,0 a 6,0, (por ejemplo, el pH es de 5,5 a 5,8, por ejemplo,

aproximadamente 5,7).

El carbohidrato es la sacarosa (por ejemplo, presente en una cantidad entre aproximadamente 1% y aproximadamente 40%, por ejemplo, entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5% (en peso/volumen)).

5 En un aspecto, la descripción incluye una composición líquida de GCB que incluye GCB, un antioxidante, sacarosa, a un pH entre 4,5-6,5, y la composición se fabrica exponiendo la composición a un gas inerte (por ejemplo, N₂ o Ar). En ciertas realizaciones, el pH está en el intervalo de 4,5 a 6,5, por ejemplo, de 5,0 a 6,0, (por ejemplo, el pH es de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 5,8, por ejemplo, aproximadamente 5,7).

10 En ciertas realizaciones, la composición líquida incluye GCB aproximadamente 0,1-40 mg/ml (por ejemplo, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/ml o aproximadamente 0,5 mg/ml) (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/ml), cisteína aproximadamente al 0,001-10% (por ejemplo, aproximadamente al 0,075%), sacarosa aproximadamente al 1-40% (por ejemplo, aproximadamente al 16%), a un pH de 5,5-6,0 (por ejemplo, aproximadamente 5,7), y el nivel de O₂ disuelto es menor que aproximadamente 10% (por ejemplo, menor que aproximadamente 5%, por ejemplo, menor que aproximadamente 2%).

15 En una realización preferida, la composición también incluye un tensioactivo (por ejemplo, poloxámero 188).

En un aspecto, la descripción incluye un recipiente hermético a gases que contiene un componente de proteína y un espacio superior, en el que el componente de proteína es glucocerebrosidasa, y el espacio superior es al menos 90%, 95% o 99% (en volumen/volumen) un gas inerte.

20 En ciertas realizaciones, el recipiente hermético a gases es una jeringa prerrellena, un vial, o una ampolla. En una realización más preferida, la jeringa prerrellena es una jeringa sin aguja.

La proteína que contiene un tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB).

25 En un aspecto, la descripción incluye un método para envasar una composición, que incluye poner en contacto una proteína que contiene un tiol libre, la glucocerebrosidasa, con un gas inerte (por ejemplo, N₂ o Ar) para reducir la cantidad de una especie reactiva (por ejemplo, O₂), e introducir la proteína y el gas inerte en un recipiente hermético a gases. La expresión "especie reactiva" incluye moléculas o iones formados mediante la reducción incompleta de un electrón del oxígeno. Estas especies reactivas incluyen O₂; superóxidos; peróxidos; radicales hidroxilo; y ácido hipocloroso.

En una realización preferida, el gas inerte es N₂ o Ar, y la especie reactiva es O₂.

La proteína que contiene el tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB).

30 En un aspecto, la descripción incluye un método para tratar a un paciente (por ejemplo, un paciente que necesite tratamiento con una proteína que contiene un tiol libre, por ejemplo, un paciente con una deficiencia en la proteína con tiol libre), que incluye administrar una composición descrita en la presente, por ejemplo, una composición que contiene una proteína con tiol libre, la glucocerebrosidasa, a un paciente. Por ejemplo, una composición farmacéutica que se administra a un paciente puede incluir una composición descrita en la presente, por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

35

En una realización preferida, la administración es mediante infusión IV o por vía subcutánea.

En una realización, se emplea una composición descrita en la presente que contiene una proteína con tiol libre, la glucocerebrosidasa, en terapia.

40 En una realización, se emplea una composición descrita en la presente que contiene una proteína con tiol libre, la glucocerebrosidasa, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno en el que se necesita una proteína que contiene un tiol libre, la glucocerebrosidasa. Por ejemplo, un medicamento para la administración a un paciente puede incluir una composición descrita en la presente, por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

45 En un aspecto, la descripción incluye un método para tratar un paciente que tiene una deficiencia en glucocerebrosidasa, que incluye administrar una composición de GCB descrita en la presente.

En ciertas realizaciones, la deficiencia en glucocerebrosidasa es la enfermedad de Gaucher.

50 A menos que se indica lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para la práctica o el ensayo de la presente invención, los materiales y los métodos adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones,

prevalecerá. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

5 General

10 Las composiciones de proteínas que contienen un tiol libre, GCB, son relativamente inestables como composiciones líquidas. Los tres grupos tiol libres expuestos en GCB pueden sufrir reacciones que conduzcan a una reducción en la estabilidad, por ejemplo, por la agregación de moléculas de GCB. Por ejemplo, en un tampón a pH 6, generalmente 1-2% de la proteína se ha agregado tras un mes de conservación, y aproximadamente 15% se ha agregado tras 6 meses de conservación. Aunque no se pretenda una limitación estricta a la teoría o el mecanismo, se cree que una serie de factores contribuyen a la inestabilidad de la proteína, por ejemplo, la reacción de agregación. Por ejemplo, el O₂ libre en disolución puede acelerar el entrecruzamiento de los grupos tiol libres, conduciendo a la agregación. Si la reacción de los grupos tiol se reduce y/o si la proteína puede hacerse más compacta, por ejemplo, enterrando los restos de cisteína en dominios hidrófobos, la agregación de las proteínas puede reducirse. Además, puede reducirse la degradación de la proteína (por ejemplo, fragmentación).

15 Las realizaciones descritas en la presente incluyen una o más medidas para abordar una o más de estas cuestiones. Como ejemplos, diversos factores se han abordado para aumentar la estabilidad de las composiciones (por ejemplo, composiciones líquidas) de proteínas que contienen tiol libre, por ejemplo, la presencia de especies reactivas (por ejemplo, O₂) en disolución, la disponibilidad de grupos sulfhidrilo libres (por ejemplo, tioles libres) sobre la proteína, la conformación de la proteína, y el pH. Uno, dos, tres, cuatro o todos estos factores pueden alterarse o controlarse para aumentar la estabilidad de la proteína de interés.

20

Proteínas que contienen tiol libre

25 Las proteínas que portan tioles libres son proteínas en las que la forma activa tiene uno o más restos -S-H. En realizaciones preferidas, el resto -S-H está accesible para un reactante y puede reaccionar con ese reactante, por ejemplo, un agente reductor, tal como cisteína, bajo condiciones que son óptimas para la estabilidad. Como alternativa, el resto -S-H puede reaccionar con un reactante bajo condiciones fisiológicas con uno o más fluidos biológicos con los que se pone en contacto cuando se administra a un paciente, por ejemplo, el resto está accesible para la reacción con la sangre.

30 Una proteína que contiene tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB). La estructura de la GCB en disolución proporciona restos -S-H- libres relativamente accesibles (en oposición a enterrados o impedidos), lo cual estimula las reacciones con el resto -S-H.

Eliminación de especies reactivas

35 Las especies reactivas, por ejemplo, O₂ o peróxidos, disueltas en disolución pueden disminuir la estabilidad de una proteína en la composición, por ejemplo, estimulando la agregación de las proteínas. Sin embargo, incluso en ausencia de O₂, los restos -S-H libres pueden entrecruzarse.

40 Para aumentar la estabilidad de la proteína, las especies reactivas, por ejemplo, O₂, en disolución pueden eliminarse, por ejemplo, por medios químicos, mediante el uso de captadores de O₂, por ejemplo, sulfitos. Los captadores químicos a menudo son menos deseables, porque pueden provocar la degradación de la proteína. El O₂ también puede eliminarse por medios físicos de una disolución, por ejemplo, desgasificando la disolución, por ejemplo, aplicando un vacío a la disolución para eliminar el O₂ de la disolución y reemplazarlo por un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o argón. La reducción de los niveles de O₂ también puede lograrse por medios físicos purgando una disolución con un gas distinto del O₂, por ejemplo, un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o argón. El purgado puede realizarse burbujando el gas a través de la disolución que quiere purgarse de O₂.

45 Con las composiciones de proteínas, de GCB, a menudo se evita, para el tratamiento de las proteínas, el burbujado u otras manipulaciones que producen interfases entre un gas y la disolución que contiene la proteína, porque pueden desnaturalizar las proteínas; sin embargo, se ha descubierto que estas manipulaciones son bien toleradas en los métodos de GCB descritos en la presente.

50 La eliminación del O₂ puede combinarse con la minimización del contacto de la disolución con O₂, por ejemplo, mediante la manipulación y la conservación bajo condiciones que minimicen la presencia de O₂, por ejemplo, rellenando los recipientes bajo un gas distinto del O₂, por ejemplo, un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o argón, o sellando los recipientes con dicho gas. En general, resulta deseable minimizar el contacto de la disolución con O₂ antes de la administración al paciente. Los niveles de O₂ en el espacio superior deberían reducirse a menos de aproximadamente 10%, preferiblemente menos de aproximadamente 5%, y más preferiblemente menos de aproximadamente 2%.

La eliminación de las especies reactivas también puede producir un aumento en la estabilidad de la proteína, por ejemplo, minimizando también la oxidación de otros restos, por ejemplo, restos Tyr, Trp y/o Met. En particular, resulta deseable minimizar la oxidación de estos restos en la GCB.

5 Se puede ensayar un método candidato para la eliminación del O₂ proporcionando una composición que contenga GCB 2 mg/ml, cisteína al 0,075% (como antioxidante), sacarosa al 16% (para disminuir la disponibilidad de -S-H), ajustando el pH a 5,7, y aplicando el método candidato. La estabilidad de la composición de GCB producida mediante el método candidato medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que no se aplican los métodos de eliminación del O₂. Se comparan las estabildades de las composiciones tratada (en la que se aplica el método de eliminación de O₂ candidato) y no tratada (en la que no se aplica un método de eliminación de O₂). La idoneidad puede demostrarse si el tratamiento de ensayo aumenta la estabilidad, comparado con este patrón. Otro patrón puede ser una composición similar a la composición de ensayo, excepto que en lugar del método de eliminación candidato, el O₂ se elimina mediante un método descrito en la presente, por ejemplo, purgando o desgasificando con un gas inerte. La idoneidad puede demostrarse si el método candidato tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que el método descrito en la presente.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

Antioxidantes

La estabilidad de una proteína en una composición puede aumentar (por ejemplo, puede reducirse el entrecruzamiento mediado por restos -S-H libres) mediante la adición de un antioxidante y, en particular, de un antioxidante que incluye un resto que reacciona con el -S-H libre (por ejemplo, un -S-H), por ejemplo, cisteína, cisteína-HCl, o metionina. Para una proteína (por ejemplo, GCB) que contiene grupos tiol libres y también enlaces disulfuro internos dentro de la molécula de proteína, el nivel de antioxidante (por ejemplo, cisteína) debe ser lo suficientemente alto para minimizar el entrecruzamiento de los enlace de tiol libre (por ejemplo, la agregación) pero lo suficientemente bajo para no provocar la fragmentación y/o la proteólisis y/o la degradación (por ejemplo, detectable mediante una HPLC en fase inversa). Por ejemplo, con la cisteína, en particular para la GCB, la inclusión de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, por ejemplo, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,15%, por ejemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,1% es adecuada. Los niveles por encima del 10% pueden no ser óptimos.

Por ejemplo, se puede ensayar un antioxidante candidato (que puede ser cualquier agente que pueda eliminar o reducir el O₂ disuelto en disolución) proporcionando una composición que contenga GCB 2 mg/ml, sacarosa al 16% (para disminuir la disponibilidad de -S-H), ajustando el pH a 5,7, añadiendo el antioxidante candidato (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 0,075%), y purgando la composición del O₂. La estabilidad de la composición de GCB que contiene el antioxidante candidato medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que el antioxidante no se añade a la composición. Se comparan las estabildades de las composiciones tratada (que contiene el antioxidante) y no tratada (que carece del antioxidante). La idoneidad puede demostrarse si el tratamiento de ensayo aumenta la estabilidad, comparado con este patrón. Otro patrón puede ser una composición similar a la composición de ensayo, excepto que en lugar del antioxidante candidato, se añade a la composición un antioxidante descrito en la presente, por ejemplo, cisteína (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 0,075%). La idoneidad puede demostrarse si el antioxidante candidato tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que el antioxidante descrito en la presente. Si se determina que el antioxidante candidato es adecuado (por ejemplo, aumenta la estabilidad de la composición comparado con uno de los patrones), la concentración del antioxidante candidato puede refinarse. Por ejemplo, la concentración puede aumentar o disminuir a lo largo de un intervalo de valores y compararse con el patrón y con las otras concentraciones que se están ensayando para determinar cuál es la concentración que produce el mayor aumento en la estabilidad.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

Un antioxidante preferido es la cisteína. Otros antioxidantes adecuados para su uso incluyen cisteína-HCl, glutatión reducido, tioetanolamina, tioglicol, ácido tioacético, monotioglicerol, N-acetilcisteína, ditiotreitól, ácido DL-tióctico, mercaptoetanol, dimercaptopropanol, bisulfito, dihidroacorbato, metabisulfito, sulfito, sulfoxilato de formaldehído,

tiosulfato, y bisulfito de acetona. En algunas realizaciones, se emplea una combinación de dos o más de estos antioxidantes en las composiciones descritas en la presente. La idoneidad de la combinación puede ensayarse según se describió anteriormente para un antioxidante candidato.

5 La adición de antioxidantes puede producir un aumento en la estabilidad de la proteína, por ejemplo, minimizando también la oxidación de otros restos, por ejemplo, restos Tyr, Trp y/o Met. En particular, resulta deseable minimizar la oxidación de estos restos en la GCB.

Carbohidratos

10 Un carbohidrato, la sacarosa, se incluye en la composición. Por ejemplo, un carbohidrato puede hacer que la proteína esté más compacta y, por ejemplo, enterrar o impedir de otra manera el acceso a un resto, por ejemplo, un resto cisteína (por ejemplo, un resto -S-H libre sobre un restos cisteína), por ejemplo, un resto cisteína en un dominio hidrófobo. Esto puede (por ejemplo, con la GCB) aumentar la estabilidad de la proteína, por ejemplo, reduciendo la agregación de la proteína.

15 El nivel de azúcar en la composición puede ser crítico. Un contenido en azúcar de aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, por ejemplo, de aproximadamente 8% a aproximadamente 24%, por ejemplo, aproximadamente 16% en peso por volumen (en p/v) es adecuado, por ejemplo, para su uso con GCB. Un contenido en azúcar de aproximadamente 3% a aproximadamente 5% también es adecuado.

20 Se puede ensayar una sustancia candidata, por ejemplo, un carbohidrato candidato, para disminuir la disponibilidad de -S-H proporcionando una composición que contenga GCB 2 mg/ml, cisteína al 0,075% (como antioxidante), ajustando el pH a 5,7, añadiendo la sustancia candidata (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 16%), y purgando la composición del O₂. La estabilidad de la composición de GCB que contiene la sustancia candidata medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que la sustancia no se añade a la composición. Se comparan las estabildades de las composiciones tratada (que contiene la sustancia) y no tratada (que carece de la sustancia). La idoneidad puede demostrarse si el tratamiento de ensayo aumenta la estabilidad, comparado con este patrón. Otro patrón puede ser una composición similar a la composición de ensayo, excepto que en lugar de la sustancia candidata, se añade a la composición una sustancia descrita en la presente, por ejemplo, sacarosa (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 16%). La idoneidad puede demostrarse si la sustancia candidata tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que la sustancia descrita en la presente. Si se determina que la sustancia candidata es adecuada (por ejemplo, aumenta la estabilidad de la composición comparado con uno de los patrones), la concentración de la sustancia candidata puede refinarse. Por ejemplo, la concentración puede aumentar o disminuir a lo largo de un intervalo de valores y compararse con el patrón y con las otras concentraciones que se están ensayando para determinar cuál es la concentración que produce el mayor aumento en la estabilidad.

35 La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

pH

45 El pH puede ser crítico para lograr una composición de proteínas optimizada, por ejemplo, una composición de proteínas líquida con mayor estabilidad. El pH puede actuar afectando a la conformación y/o la agregación y/o la degradación y/o la reactividad de la proteína. Por ejemplo, a un pH mayor, el O₂ puede ser más reactivo. El pH está en el intervalo de 4,5 a 6,5, más preferiblemente de 5,0 a 6,0, y más preferiblemente de 5,5 a 5,8, más preferiblemente de aproximadamente 5,7. Con algunas proteínas, por ejemplo, GCB, la agregación puede alcanzar unos niveles indeseables a un pH mayor que 7,0, y la degradación (por ejemplo, fragmentación) puede alcanzar unos niveles indeseables a un pH menor que 4,5 o 5,0, o a un pH mayor que 6,5 o 7,0.

50 Se puede ensayar un pH candidato proporcionando una composición que contenga GCB 2 mg/ml, cisteína al 0,075% (como antioxidante), sacarosa al 16% (para disminuir la disponibilidad de -S-H), ajustando la composición a un pH candidato, y purgando la composición del O₂. La estabilidad de la composición de GCB al pH candidato medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que el pH de la composición no está ajustado. Se comparan las estabildades de las composiciones tratada (composición ajustada al pH candidato) y no tratada (el pH no está ajustado). La idoneidad puede demostrarse si el tratamiento de ensayo aumenta la estabilidad, comparado con este patrón. Otro patrón puede ser una composición similar a la composición de ensayo, excepto que en lugar del pH candidato, la composición tiene un pH descrito en la presente, por ejemplo, pH 5,7. La idoneidad puede demostrarse si la composición al pH

candidato tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que la composición a pH 5,7.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

Los tampones que pueden utilizarse para ajustar el pH de una composición de proteínas incluyen histidina, citrato, fosfato, glicina, succinato, acetato, glutamato, Tris, tartrato, aspartato, maleato, y lactato. Un tampón preferido es el citrato.

10 Concentración de proteínas

Una concentración de proteínas, GCB, preferida puede estar entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/ml o de aproximadamente 5 mg/ml.

Se puede ensayar una concentración de proteínas adecuada proporcionando una composición que contiene cisteína al 0,075% (como antioxidante), sacarosa al 16% (para disminuir la disponibilidad de -S-H), ajustando el pH a 5,7, ajustando la proteína (por ejemplo, GCB9 a una concentración candidata, y purgando la composición del O₂). La estabilidad de la composición de proteínas (por ejemplo, GCB) a la concentración candidata medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que la concentración de proteínas (por ejemplo, GCB) es una concentración descrita en la presente, por ejemplo, 2 mg/ml. Se comparan las estabildades de las proteínas (por ejemplo, GCB) a cada concentración. La idoneidad puede demostrarse si la concentración candidata tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que la concentración descrita en la presente.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

Tensioactivos

Puede añadirse un tensioactivo a la composición de proteínas (por ejemplo, GCB) líquida. En una realización preferida, esto puede aumentar la estabilidad de la proteína, por ejemplo, reducir la degradación de la proteína, por ejemplo, debido a la producción de una interfase aire/líquido tras la agitación/traslado. Se selecciona un tensioactivo que aumente la estabilidad de la proteína, por ejemplo, que no provoque la degradación de la proteína, en la composición líquida. Un tensioactivo adecuado para su uso es, por ejemplo, poloxámero 188, por ejemplo, PLURONIC® F68. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad entre aproximadamente 0,005% y aproximadamente 5%, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 1%, por ejemplo, entre aproximadamente 0,025% y aproximadamente 0,5%, por ejemplo, entre aproximadamente 0,03% y aproximadamente 0,25%, por ejemplo, entre aproximadamente 0,04% y aproximadamente 0,1%, por ejemplo, entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 0,075%, por ejemplo, al 0,05%.

De forma ideal, el tensioactivo seleccionado para su uso en las composiciones de proteínas descritas en la presente no será modificado, por ejemplo, roto, por la proteína.

Por ejemplo, se puede ensayar un tensioactivo candidato proporcionando una composición que contenga GCB 2 mg/ml, cisteína al 0,075% (como antioxidante), sacarosa al 16% (para disminuir la disponibilidad de -S-H), ajustando el pH a 5,7, añadiendo el tensioactivo candidato (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 0,05%), y purgando la composición del O₂. La estabilidad de la composición de GCB que contiene el tensioactivo candidato medida, por ejemplo, como el porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado se compara con la de uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de ensayo, excepto que el tensioactivo no se añade a la composición. Se comparan las estabildades de las composiciones tratada (que contiene el tensioactivo) y no tratada (que carece del tensioactivo) en condiciones que imitan escenarios de la "vida real", por ejemplo, un traslado. La idoneidad puede demostrarse si el tratamiento de ensayo aumenta la estabilidad, comparado con este patrón. Otro patrón puede ser una composición similar a la composición de ensayo, excepto que en lugar del tensioactivo candidato, se añade a la composición un tensioactivo descrito en la presente, por ejemplo, poloxámero 188 (por ejemplo, en una cantidad descrita en la presente, por ejemplo, al 0,05%). La idoneidad puede demostrarse si el tensioactivo candidato tiene un efecto comparable o mejor sobre la estabilidad que el tensioactivo descrito en la presente. Si se determina que el tensioactivo candidato es adecuado (por ejemplo, aumenta la estabilidad de la composición comparado con uno de los patrones), la concentración del tensioactivo candidato puede refinarse. Por ejemplo, la concentración puede aumentar o disminuir

a lo largo de un intervalo de valores y compararse con el patrón y con las otras concentraciones que se están ensayando para determinar cuál es la concentración que produce el mayor aumento en la estabilidad.

En algunas realizaciones se emplea una combinación de dos o más tensioactivos en las composiciones descritas en la presente. La idoneidad de la combinación puede ensayarse según se describió anteriormente para un tensioactivo candidato.

La estabilidad de la proteína puede medirse, por ejemplo, midiendo la agregación de la proteína o la degradación de la proteína. La agregación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular, PAGE no desnaturizante, u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC en fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, cartografiado peptídico, o métodos similares.

GCB

La enfermedad de Gaucher es un trastorno del almacenaje de liposomas autosómico recesivo que se caracteriza por una deficiencia en la enzima lisosómica glucocerebrosidasa (GCB). La GCB hidroliza el glicolípido glucocerebrósido que se forma después de la degradación de los glicosfingolípidos en las membranas de leucocitos y eritrocitos. La deficiencia en esta enzima provoca que el glucocerebrósido se acumule en grandes cantidades en los lisosomas de células fagocíticas localizadas en el hígado, bazo, y médula ósea de los pacientes con enfermedad de Gaucher. La acumulación de estas moléculas provoca una gama de manifestaciones clínicas, incluyendo esplenomegalia, hepatomegalia, trastornos esqueléticos, trombocitopenia y anemia (Beutler *et al.*, Gaucher disease, en: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (McGraw-Hill, Inc., Nueva York, 1995), pp. 2625-2639).

Los tratamientos para pacientes que padecen esta enfermedad incluyen la administración de analgésicos para aliviar el dolor óseo, transfusiones de sangre y plaquetas y, en algunos casos, esplenectomía. A menudo resulta necesario una sustitución de articulaciones para los pacientes que presentan erosión ósea. Se ha utilizado la terapia de reposición de enzimas con GCB como tratamiento para la enfermedad de Gaucher.

La estructura de la GCB en disolución proporciona restos -S-H- libres relativamente accesibles (en oposición a enterrados o impedidos), lo cual estimula las reacciones con el resto -S-H-.

La GCB puede obtenerse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO 02/15927, WO 2005/089047, WO 03/056897, WO 01/77307, WO 01/07078, y WO 90/07573; la solicitud europea publicada nº EP 1392826; las solicitudes de EEUU publicadas nº 2005-0026249, 2005-0019861, 2005-0168750, 2005-0265988, 2004-0043457, 2003-0215435, y 2003-0133924; y la solicitud de patente de EEUU nº 10/968.870; las patentes de EEUU nº 7.138.262, 6.451.600, 6.074.864, 5.879.680, 5.549.892, 5.236.838, y 3.910.822 describen métodos para preparar la proteína GCB. Cualquiera de las preparaciones de proteínas GCB descritas en estas patentes y solicitudes puede formularse en una composición descrita en la presente.

La actividad enzimática de GCB puede medirse como se describe en los ejemplos proporcionados en la presente, o como se describe en la técnica, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 7.138.262.

Invasado y administración

Las composiciones de proteínas, por ejemplo, las composiciones de GCB, por ejemplo, las composiciones descritas en la presente y en el documento WO 02/15927, solicitudes de EEUU publicadas nº 2005-0026249, 2005-0019861, y 2002-0168750, y las solicitudes de patente de EEUU nº 09/641.471 y 10/968.870, pueden envasarse en una jeringa de dos cámaras. Por ejemplo, la composición en forma liofilizada puede introducirse en una primera cámara de la jeringa, y un líquido puede estar presente en una segunda cámara de la jeringa (véase, por ejemplo, la solicitud de EEUU publicada nº 2004-0249339).

Las composiciones de proteínas, por ejemplo, las composiciones de GCB, por ejemplo, las composiciones descritas en la presente y en el documento WO 02/15927, solicitudes de EEUU publicadas nº 2005-0026249, 2005-0019861, y 2002-0168750, y las solicitudes de patente de EEUU nº 09/641.471 y 10/968.870, pueden envasarse en una jeringa sin aguja (véase, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 6.406.455 y 6.939.324). Brevemente, como un ejemplo, el dispositivo de inyección incluye: una cámara de gas que contiene un gas o una fuente de gas; un puerto que permite la liberación del gas desde la cámara de gas; un émbolo, que tras la liberación del gas desde la cámara de gas, puede provocar el movimiento de al menos un primer pistón; un primer pistón; un segundo pistón; una primera cámara, por ejemplo, una cámara útil para el almacenaje y mezclado del fármaco; un alojamiento para pistones, en el que está dispuesto el primer pistón, el segundo pistón y la primera cámara; un miembro de desplazamiento que, independientemente de la fuerza motriz del gas desde la cámara de gas, provoca el movimiento de uno o ambos primer y segundo pistón (el miembro de desplazamiento puede ser el émbolo o un miembro distinto); un orificio adecuado para la inyección sin aguja en comunicación con la primera cámara; en el que el primer y segundo pistón están dispuestos de forma deslizable dentro del alojamiento para los pistones, y el miembro de desplazamiento, la fuente de gas, y el émbolo están dispuestos de modo que en una primera posición de los pistones, una segunda cámara, por ejemplo, un depósito de fluidos, es definida dentro del alojamiento para pistones por el primer pistón, el

alojamiento para pistones y el segundo pistón, y el miembro de desplazamiento puede mover uno o ambos pistones hacia una segunda posición en la que el primer pistón está en una posición de modo que la segunda cámara, que puede ser un depósito para fluidos, está en comunicación con la primera cámara, que puede ser una cámara de almacenaje y mezclado del fármaco, y el segundo pistón se mueve en la dirección del primer pistón, disminuyendo con ello el volumen de la segunda cámara y permitiendo la transferencia de fluido desde la segunda cámara hacia la primera cámara, y el émbolo, tras la liberación del gas desde la cámara de gas, provoca que el primer pistón se mueva para disminuir el volumen de la primera cámara, permitiendo que una sustancia sea expulsada a través del orificio y desde la cámara y, por ejemplo, hacia un sujeto.

La jeringa sin aguja puede incluir módulos separados para un primer componente, por ejemplo, un componente seco o líquido, y un segundo componente, por ejemplo, un componente líquido. Los módulos pueden proporcionarse como dos componentes separados y montados, por ejemplo, por el sujeto que se administrará a sí mismo el componente, o por otra persona, por ejemplo, por un individuo que proporciona cuidados sanitarios. Juntos, los módulos pueden formar todo o parte del alojamiento para pistones de los dispositivos descritos en la presente. Los dispositivos pueden utilizarse para proporcionar cualquier primer y segundo componente cuando resulte deseable almacenar o proporcionar los componentes por separado y combinarlos antes de la administración a un sujeto.

Las composiciones de proteínas (por ejemplo, GCB) descritas en la presente pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Una composición de GCB puede incluir una dosificación suficiente de GCB para tratar a un sujeto que tenga la enfermedad de Gaucher. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Tal como se emplea en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, excipientes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. La formulación farmacéutica está bien establecida en la técnica y se describe más a fondo, por ejemplo, en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, 3ª ed. (2000) (ISBN: 091733096X). Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, dicho medio puede utilizarse en las composiciones de la invención. Otros compuestos activos también pueden incorporarse en las composiciones.

Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición descrita en la presente. Estas cantidades eficaces pueden determinarse basándose en el efecto de la composición administrada. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición también puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la composición para provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, la mejora de al menos un síntoma de un trastorno o afección, por ejemplo, una deficiencia en glucocerebrosidasa, por ejemplo, la enfermedad de Gaucher. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos tienen más peso que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Por ejemplo, la composición puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular). Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se emplean en la presente, significan una vía de administración distinta de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural, e intraesternal. Preferiblemente, la vía de administración es intravenosa. Las disoluciones o las suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para ajustar la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede introducirse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones o polvos estériles, por ejemplo, preparaciones liofilizadas, para la preparación improvisada de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsipanny, NJ), o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse con facilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y conservación, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo debe ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La

5 fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. Puede lograrse la estabilidad prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, albúmina de suero humana, y gelatina.

10 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando las composiciones de GCB descritas en la presente en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para formar disoluciones inyectables estériles, los métodos de composición preferidos son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado procedente de una disolución de este previamente esterilizada por filtración.

15 Los compuestos activos (por ejemplo, las composiciones de GCB descritas en la presente) pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden emplearse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para preparar estas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EEUU nº 4.522.811.

20 Las composiciones de proteínas, por ejemplo, las composiciones de GCB, descritas en la presente, pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición de proteínas (por ejemplo, GCB) descrita en la presente puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes de EEUU nº 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos muy conocidos útiles en la invención incluyen: la patente de EEUU nº 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; patente de EEUU nº 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; patente de EEUU nº 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; patente de EEUU nº 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de un fármaco; patente de EEUU nº 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y patente de EEUU nº 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico. Por supuesto, también se conocen muchos otros de estos implantes, sistemas de administración, y módulos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y equipo

Se utilizaron los siguientes reactivos para generar los resultados presentados en los ejemplos 2-6:

45 GCB: La glucocerebrosidasa se preparó utilizando los métodos (sin limitarse a estos) descritos en la solicitud internacional nº PCT/US01/25882. También pueden utilizarse otros métodos conocidos por los expertos en la técnica utilizando la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo, los métodos descritos en las solicitudes internacionales nº PCT/US88/04314, PCT/US89/05801, y PCT/US92/00431, y las patentes de EEUU nº 5.236.838B1, 5.641.670B1, 5.549.892B1, y 6.270.989B1.

Sacarosa: P/N S-124-01 o S-124-02, Pfanstichl (Waukegen, IL).

50 Cisteína-HCl: P/N 2071-05, JTBaker (Phillipsburg, NJ).

Poloxámero 188: P/N P1169, Spectrum (New Brunswick, NJ).

Citrato de sodio: P/N 3649-01, JTBaker (Phillipsburg, NJ).

Viales de 20 ml: P/N 6800-0321, West Pharmaceuticals Services (Lionville, PA).

Viales de 2 ml: P/N 6800-0314, West Pharmaceuticals Services (Lionville, PA).

Tapones de 20 mm: P/N 1950-0414, West Pharmaceuticals Services (Lionville, PA).

Tapones de 13 mm: P/N 1950-0412, West Pharmaceuticals Services (Lionville, PA).

Gas N₂: P/N UN1066, Airgas (Salem, NH).

Liofilizador: Genesis 35EL, SP Industries (Warminster, PA).

5 Ejemplo 2: Estabilidad de la GCB

La GCB se formuló a 2,5 mg/ml en sacarosa al 16%, cisteína-HCl al 0,03%, poloxámero 188 al 0,05%, citrato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se rellenaron viales de vidrio de 20 ml con 4,5 ml cada uno de las disoluciones formuladas. Los viales rellenos se cargaron sobre una bandeja de un liofilizador y se desgasificaron al vacío a 500 mT con una temperatura de bandeja de 20 °C durante 3 minutos, seguido de un relleno con N₂ a 950 mBar e inmediatamente se taparon con tapones grises de 20 mm. Las muestras se colocaron en una cámara de estabilidad a 2-8 °C. A los 0, 6, 12, 18 y 24 meses después de la conservación, las muestras se sacaron y se ensayaron para la actividad enzimática, la agregación mediante SE-HPLC y los cambios en la degradación mediante RP-HPLC. La actividad enzimática se ensayó mediante un ensayo colorimétrico utilizando p-nitrofenil β-D-glucopiranosido como sustrato (la actividad también puede ensayarse, por ejemplo, utilizando el ensayo descrito en la patente de EEUU n° 7.138.262).

Los resultados se resumen en la tabla 1. La GCB de esta composición tenía menos del 5% de cambios comparado con la línea de base tras 24 meses a 2-8 °C.

Tabla 1: Resumen de estabilidad para el ejemplo 2 después de 24 meses de conservación a 2-8 °C

Momento del tiempo (meses)	Actividad*	SE-HPLC*	RP-HPLC*
0	100%	100%	100%
6	N/A	100%	100%
12	100%	100%	99%
18	96%	99%	97%
24	95%	99%	96%

*Porcentaje retenido desde la línea de base.

Ejemplo 3: Efecto de los niveles de O₂

La GCB se formuló a 2,5 mg/ml en sacarosa al 16%, cisteína-HCl al 0,03%, poloxámero 188 al 0,05%, citrato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se rellenaron viales de vidrio de 2 ml con 1 ml cada uno de las disoluciones formuladas. El espacio superior de los viales se trató utilizando un liofilizador para que tuviese un nivel de O₂ del 3%, 6% o 14%. Las muestras se colocaron en una cámara de estabilidad a 2-8 °C. A los 6 meses, las muestras se sacaron y se ensayaron para los cambios en la agregación mediante SE-HPLC y los cambios en la degradación mediante RP-HPLC. Los resultados se resumen en la tabla 2. La GCB de esta composición es sensible al nivel de oxígeno en el espacio superior del vial. Con O₂ menor que 3% fundamentalmente no se observaron cambios después de 6 meses a 2-8 °C.

Tabla 2: Resumen de estabilidad para el ejemplo 3 después de 6 meses de conservación a 2-8 °C

Nivel de O ₂ en el espacio superior	SE-HPLC*	RP-HPLC*
3%	100%	99%
6%	93%	89%
14%	64%	72%

*Porcentaje retenido desde la línea de base.

Ejemplo 3: Efecto de los niveles de sacarosa

La GCB se formuló a 2,5 mg/ml en cisteína-HCl al 0,05%, poloxámero 188 al 0,05%, citrato de sodio 50 mM, pH 6,0, y contenía unos niveles de sacarosa del 0%, 5%, 8% o 16%. Se rellenaron viales de vidrio de 2 ml con 1 ml cada uno de las disoluciones formuladas. Los viales se desgasificaron al vacío con un liofilizador y se rellenaron con N₂ hasta 950 mBar, y después se cerraron con tapones de 13 mm. Las muestras se colocaron en una cámara de estabilidad a 2-8 °C. A los 6 meses, las muestras se sacaron y se ensayaron para los cambios en la agregación

mediante SE-HPLC y los cambios en la degradación mediante RP-HPLC. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Resumen de estabilidad para el ejemplo 4 después de 6 meses de conservación a 2-8 °C

Nivel de sacarosa	SE-HPLC*	RP-HPLC*
0%	99,1%	98,9%
5%	99,5%	98,9%
8%	99,6%	98,9%
16%	99,8%	98,6%

*Porcentaje retenido desde la línea de base.

Ejemplo 5: Efecto de los niveles de cisteína

- 5 La GCB se formuló a 2,5 mg/ml en sacarosa al 16%, poloxámero 188 al 0,05%, citrato de sodio 50 mM, pH 6,0, y contenía cisteína-HCl al 0% o 0,05%. Se rellenaron viales de vidrio de 2 ml con 1 ml cada uno de las disoluciones formuladas. Los viales se desgasificaron al vacío con un liofilizador y se rellenaron con N₂ hasta 950 mBar en el espacio superior, y después se cerraron con tapones de 13 mm. Estas muestras se colocaron en una cámara de estabilidad a 2-8 °C. A los 6 meses, las muestras se sacaron y se ensayaron para los cambios en la agregación mediante SE-HPLC y los cambios en la degradación mediante RP-HPLC. Los resultados se resumen en la tabla 4. La adición de cisteína-HCl reduce el nivel de agregación pero aumenta el nivel de degradación, según se detecta mediante RP-HPLC.

Tabla 4: Resumen de estabilidad para el ejemplo 5 después de 6 meses de conservación a 2-8 °C

Nivel de cisteína-HCl	SE-HPLC*	RP-HPLC*
0%	99,4%	99,2%
0,05%	99,8%	98,6%

*Porcentaje retenido desde la línea de base.

15 Ejemplo 6: Efecto de los niveles de pH

- 20 La GCB se formuló a 2,5 mg/ml en sacarosa al 16%, cisteína-HCl al 0,05%, poloxámero 188 al 0,05%, citrato de sodio 50 mM, con un pH de 6,0, 5,8 o 5,5. Se rellenaron viales de vidrio de 2 ml con 1 ml cada uno de las disoluciones formuladas. Los viales se desgasificaron al vacío y se rellenaron con N₂ hasta 950 mBar en el espacio superior, y después se cerraron con tapones de 13 mm. Estas muestras se colocaron en una cámara de estabilidad a 13-17 °C. A los 3 meses, las muestras se sacaron y se ensayaron para los cambios en la agregación mediante SE-HPLC y los cambios en la degradación mediante RP-HPLC. Los resultados se resumen en la tabla 5. La disminución del pH puede reducir el nivel de agregación y el nivel de degradación.

Tabla 5: Resumen de estabilidad para el ejemplo 6 después de 3 meses de conservación a 13-17 °C

pH	SE-HPLC*	RP-HPLC*
6,0	99,8%	96,9%
5,8	100%	97,6%
5,5	100%	98,5%

*Porcentaje retenido desde la línea de base.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición farmacéutica que comprende una proteína que tiene un tiol libre y un carbohidrato, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de la proteína, y en la que el pH de la composición es entre 4,5 y 6,5, en la que la proteína que tiene un tiol libre es la glucocerebrosidasa (GCB), y en la que el carbohidrato es la sacarosa.
- 2.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un antioxidante, en la que el antioxidante y el carbohidrato están presentes en cantidades suficientes para mantener la estabilidad de la proteína.
- 3.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un tensioactivo.
- 10 4.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la estabilidad es al menos 5-80% mayor, bajo condiciones preseleccionadas, que la estabilidad de una composición que se diferencia porque carece del carbohidrato.
- 5.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para aumentar la estabilidad de la proteína.
- 15 6.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para inhibir la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína para formar un agregado.
- 20 7.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para inhibir la formación de un agregado formado mediante la reacción de un tiol libre sobre una primera molécula de la proteína, con un tiol libre sobre una segunda molécula de la proteína en al menos 5-80%, bajo condiciones preseleccionadas, comparado con la misma composición que carece del carbohidrato.
- 8.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para que, tras una conservación en un recipiente hermético a gases a una temperatura de 2-8 °C durante un periodo de 6 meses, la composición retenga al menos 85% de la estabilidad que la composición tenía antes de la conservación.
- 25 9.- La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que la conservación se realiza en la oscuridad.
- 10.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para que tenga una estabilidad comparable a la de una composición liofilizada que comprende sacarosa, polisorbato-20 al 0,01%, pH 6,0, citrato 50 mM.
- 11.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende carbohidrato aproximadamente al 1-40%.
- 30 12.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición es un líquido.
- 13.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición contiene O₂ a menos de aproximadamente 10%.
- 14.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición se prepara mediante un método que comprende la eliminación física del O₂ de la composición.
- 35 15.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición líquida de GCB, en la que la composición se produce exponiendo la composición a un gas inerte, y en la que el gas inerte está presente a una concentración mayor que en la atmósfera ambiental.
- 16.- La composición farmacéutica de la reivindicación 15, que comprende además un antioxidante.
- 40 17.- La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que el antioxidante es cisteína, cisteína-HCl, o metionina.
- 18.- La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que el antioxidante es cisteína, cisteína-HCl, o metionina, y está presente del 0,001% al 10% (en peso/volumen), y el carbohidrato está presente del 1% al 40% (en peso/volumen).
- 19.- La composición farmacéutica de la reivindicación 15, que comprende además un tensioactivo.
- 45 20.- La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en la que el tensioactivo es el poloxámero 188.
- 21.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición líquida de GCB, en la que el pH de la composición es entre 4,5 y 6,5, y en la que el carbohidrato está presente en una cantidad suficiente para mantener las características de integridad bioquímica y bioactividad de la GCB a ese pH.

- 22.- La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en la que el pH está en el intervalo de 5,0 a 6,0.
- 23.- La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en la que el carbohidrato está presente del 1% al 40% (en peso/volumen).
- 5 24.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición líquida de GCB que comprende GCB, un antioxidante, y un carbohidrato, y en la que la composición se produce exponiendo la composición a un gas inerte.
- 25.- La composición farmacéutica de la reivindicación 24, que comprende GCB aproximadamente 0,1-40 mg/ml, cisteína aproximadamente al 0,001-10%, sacarosa al 1-40%, a un pH de 5,5-6,0, y en la que el nivel de O₂ disuelto es menor que aproximadamente 10%.
- 10 26.- La composición farmacéutica de la reivindicación 24, que comprende además un tensioactivo.
- 27.- La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que el tensioactivo es el poloxámero 188.
- 28.- Un recipiente hermético a gases que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 1, un componente de proteína, y un espacio superior, en el que el espacio superior es al menos 90% (en volumen/volumen) un gas inerte.
- 15 29.- El recipiente hermético a gases de la reivindicación 28, en el que el recipiente es una jeringa prerrellena, un vial, o una ampolla.
- 30.- El recipiente hermético a gases de la reivindicación 29, en el que la jeringa prerrellena es una jeringa sin aguja.
- 20 31.- Un método para envasar la composición farmacéutica de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método poner en contacto la GCB con un gas inerte para reducir la cantidad de una especie reactiva, e introducir la GCB y el gas inerte en un recipiente hermético a gases.
- 32.- El método de la reivindicación 31, en el que el gas inerte es N₂ o Ar, y la especie reactiva es O₂.
- 33.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para su uso en un método para tratar un paciente, comprendiendo dicho método administrar la composición a un paciente.
- 25 34.- La composición farmacéutica de la reivindicación 33, en la que la administración es mediante administración subcutánea o por infusión IV.
- 35.- La composición farmacéutica de la reivindicación 15, para su uso en un método para tratar a un paciente que tiene una deficiencia en glucocerebrosidasa.
- 36.- La composición de la reivindicación 35, en la que la deficiencia en glucocerebrosidasa es la enfermedad de Gaucher.
- 30 37.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica no contiene polisorbato.
- 38.- El recipiente hermético a gases de la reivindicación 28, en el que el componente de proteína está en disolución.