

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 514**

51 Int. Cl.:

A61P 21/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10790224 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2475376**

54 Título: **Formulaciones para enzimas lisosómicas**

30 Prioridad:

17.06.2009 US 187747 P

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**LEBOWITZ, JONATHAN H. y
CHANG, BYEONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 569 514 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

Formulaciones para enzimas lisosómicas

5 Antecedentes

La ausencia de una o más enzimas lisosómicas en el lisosoma provocan, de forma directa o indirecta, más de cuarenta enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL). Se va en pos de forma activa de la terapia de reemplazo enzimático para las EAL. En general, la terapia necesita que las proteínas de las EAL se capten y
 10 suministren a los lisosomas en una diversidad de tipos celulares. Los inventores de la presente solicitud han desarrollado de forma previa una tecnología de dirección basada en péptidos, que permite la entrega más eficaz de enzimas terapéuticas a los lisosomas. Esta tecnología patentada se denomina Dirección Lisosómica Independiente de Glucosilación (DLIG). Los detalles de la tecnología DLIG se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 7.396.811, 7.560.424, y 7.629.309; las solicitudes de publicación de Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400, y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077.

Debido a que las proteínas utilizadas en la terapia de reemplazo enzimático son más grandes y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, poseen múltiples grupos funcionales además de
 20 estructuras tridimensionales complejas), la formulación, acondicionamiento y conservación de tales proteínas presentan problemas especiales.

Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona formulaciones mejoradas para las enzimas lisosómicas útiles para la terapia de reemplazo enzimático. Entre otras cosas, la presente invención proporciona formulaciones que conservan y potencian la estabilidad y/o la eficacia de una enzima lisosómica tal como la alfa glucosidasa ácida.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Pompe que comprende una alfa glucosidasa ácida y un poloxámero. En algunas realizaciones, el poloxámero adecuado para la invención es Pluronic® F-68. En algunas realizaciones, el poloxámero está en una concentración que varía entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 0,2 %. En determinadas realizaciones, el poloxámero está en una concentración de aproximadamente el 0,1 %. En determinadas
 30 realizaciones, el poloxámero está en una concentración de aproximadamente el 0,05 %.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye adicionalmente un agente tamponador. En algunas realizaciones, el agente tamponador se selecciona del grupo que consiste en histidina, acetato de sodio, citrato, fosfato, succinato, Tris y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente tamponador está en una concentración que varía entre aproximadamente 25 mM y
 35 aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye adicionalmente un agente estabilizador. En algunas realizaciones, el agente estabilizador se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, arginina, sorbitol, manitol, glicina, trehalosa y combinaciones de los mismos.
 40

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye adicionalmente un modificador de la tonicidad. En algunas realizaciones, el modificador de la tonicidad se selecciona del grupo que consiste en glicina, sorbitol, sacarosa, manitol, cloruro de sodio, dextrosa, arginina y combinaciones de los mismos.
 45

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluye un agente formador de volumen. En algunas realizaciones, el agente formador de volumen se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, manitol, glicina, cloruro de sodio, dextrano, trehalosa y combinaciones de los mismos.
 50

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención tiene un pH que varía desde aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0. En determinadas realizaciones, un pH adecuado es de aproximadamente 6,0.
 55

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención está en una forma adecuada para la administración parenteral. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención está en una forma adecuada para la infusión intravenosa.
 60

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una mezcla liofilizada.

En algunas realizaciones, la alfa glucosidasa ácida en una formulación es una alfa glucosidasa ácida (AGA) de ser humano recombinante. En determinadas realizaciones, la AGA de ser humano recombinante se produce a partir de células CHO. En determinadas realizaciones, la AGA de ser humano recombinante tiene niveles de glucosilación
 65

modificados (por ejemplo, aumentados o reducidos) en comparación con la AGA de ser humano de origen natural. En determinadas realizaciones, la AGA de ser humano recombinante contiene cantidades aumentadas de restos manosa-6-fosfato en comparación con la AGA de ser humano de origen natural. En algunas realizaciones, la AGA de ser humano recombinante contiene cantidades reducidas de restos manosa-6-fosfato en comparación con la AGA de ser humano de origen natural. En algunas realizaciones, la AGA de ser humano recombinante utilizada en una formulación está subglucosilada o desglucosilada.

En algunas realizaciones, la alfa glucosidasa ácida es una proteína de fusión que comprende a la AGA de ser humano o a una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, la proteína de fusión incluye adicionalmente un péptido de dirección lisosómica. En algunas realizaciones, el péptido de dirección lisosómica tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos el 70 % (por ejemplo, por lo menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %) idéntica al IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, el péptido de dirección lisosómica es una muteína del IGF-II y comprende una mutación dentro de una región que corresponde a los aminoácidos 34-40 de la SEQ ID NO: 1, de forma que la mutación suprime por lo menos un sitio de escisión de la proteasa furina. En algunas realizaciones, el péptido de dirección lisosómica es una muteína del IGF-II que tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor del IGF-I. En algunas realizaciones, el péptido de dirección lisosómica es una muteína del IGF-II que tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina, con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor de insulina.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos el 70 % (por ejemplo, por lo menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %) idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una alfa glucosidasa ácida descrita en el presente documento en una formulación que contiene aproximadamente citrato de sodio 50 mM, manitol al 4 %, trehalosa al 1 %, y Pluronic F-68 al 0,1 %. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una alfa glucosidasa ácida descrita en el presente documento en una formulación que contiene aproximadamente citrato de sodio a 25 mM, manitol al 2 %, trehalosa al 0,5 %, y Pluronic F-68 al 0,05 %. En diversas realizaciones, una formulación de acuerdo con la invención está en una forma líquida. En diversas realizaciones, una formulación de acuerdo con la invención tiene un pH que varía aproximadamente entre 5-7 (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, o 7,0). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una mezcla liofilizada de una alfa glucosidasa ácida descrita en el presente documento, citrato de sodio, manitol, trehalosa, y Pluronic F-68.

La presente invención proporciona adicionalmente métodos para el tratamiento de la enfermedad de Pompe y de otras enfermedades de almacenamiento lisosómico, mediante la administración de una composición farmacéutica descrita en el presente documento a un sujeto que necesita tratamiento.

Como se utiliza en la presente solicitud, las expresiones “aproximadamente” y “de forma aproximada” se utilizan como equivalentes. Cualquiera de las cifras utilizadas en la presente solicitud, con o sin aproximadamente/de forma aproximada, tienen el propósito de cubrir cualquiera de las fluctuaciones normales que aprecia alguien con las habilidades habituales en la técnica pertinente. Por ejemplo, las fluctuaciones normales de un valor de interés pueden incluir una serie de valores que caen dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) de un valor de referencia establecido a menos que se establezca otra cosa o que sea evidente otra cosa a partir del contexto (excepto en donde tal número excediese el 100 % de un posible valor).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa resultados ejemplares de estudios de exploración de tensioactivos. Los viales se muestran después de la agitación con y sin tensioactivos.

La Figura 2 ilustra cromatogramas de SE-HPLC ejemplares de muestras después de la agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. La muestra agitada sin tensioactivo no se analizó debido a la precipitación.

La Figura 3 ilustra un ciclo de liofilización ejemplar utilizado para liofilizar diversas formulaciones.

La Figura 4 representa viales ejemplares que contienen la formulación después del secado.

La Figura 5 ilustra la calorimetría de selección diferencial de C6MT ejemplar.

La Figura 6 ilustra cromatogramas de SE-HPLC ejemplares de todas las formulaciones a "pre lio.", tiempo cero, y dos días de reconstitución. No tuvo lugar degradación detectable como resultado del procedimiento de liofilización o del almacenamiento de dos días después de la reconstitución.

- 5 La Figura 7 ilustra cromatogramas de SE-HPLC ejemplares para todas las formulaciones probadas después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C y a 25 °C.

La Figura 8 ilustra el SDS-PAGE ejemplar de todas las formulaciones probadas después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C y a 25 °C.

- 10 La Figura 9 ilustra el análisis de SDS-PAGE ejemplar de la reconstitución "pre lio.", tiempo cero, y dos días de reconstitución de las formulaciones probadas.

- 15 La Figura 10 ilustra la estabilidad ejemplar mediante SEC-HPLC (HPLC por cromatografía de exclusión por tamaño) de las tres formulaciones probadas almacenadas a (A) 4 °C, (B) 25 °C, y (C) 37 °C.

- 20 La Figura 11 ilustra la medición ejemplar de la concentración de las proteínas de la muestra mediante espectrofotometría de A_{280} . Las concentraciones de proteínas de las muestras probadas fueron estables en el transcurso de 92 días del estudio. La concentración de proteína de la muestra se determinó mediante medición de la A_{280} utilizando un coeficiente de extinción de $1,59 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$.

- 25 La Figura 12 ilustra la medición ejemplar de la actividad enzimática de AGA mediante el ensayo de PNP. Definición de unidad: enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de para-nitrofenol alfa-glucósido (Sigma n.º N1377) en una hora a 37 °C en una reacción que contiene sustrato 10 mM y acetato de sodio 100 mM pH 4,2. Las reacciones de 50 µl se detuvieron con 300 µl de carbonato de sodio 100 mM. El sustrato hidrolizado se detectó a 405 nm y se comparó con una curva estándar de p-nitrofenol (Sigma n.º N7660).

- 30 La Figura 13 ilustra la medida ejemplar de la actividad de AGA de ZC-701-GMP1 mediante el ensayo PNP, en muestras que se sometieron a hasta 5 ciclos de congelación instantánea en nitrógeno líquido, seguido de descongelación en agua a temperatura ambiente.

- 35 La Figura 14 ilustra el SDS-PAGE reductor (+DTT) y no reductor (-DTT) ejemplar. Los carriles que contenían 10 µg de la muestra ZC-701 se separaron en geles prefabricados XT con Bis-Tris al 4-12 % (Bio Rad n.º 345-0124) en condiciones reductoras (DTT 100 mM) o en condiciones no reductoras (sin DTT) como describía el fabricante, a 200 voltios durante 50 minutos. Los geles se tiñeron con tinción de Imperial Protein (Pierce n.º 24615).

- 40 La Figura 15 ilustra análisis de estabilidad ejemplares. Las muestras se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. El porcentaje de ZC-701 presente como forma monomérica se determinó cargando 33 µg de ZC-701 en solución salina tamponada con fosfato pH 6,2 a temperatura ambiente a 0,25 ml/min en una columna TSKgel G2000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm y una columna TSKgel G3000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm conectadas en serie. El nivel de multimerización se definió como el % de fracción más grande que el monómero de ZC-701.

- 45 La Figura 16 ilustra la cuantificación ejemplar de las especies proteicas escindidas por furina mediante el análisis de PNGasa F / SDS-PAGE de diversas muestras.

- 50 La Figura 17 ilustra resultados ejemplares que indican la concentración de proteína de ZC-701 de un análisis de estabilidad ejemplar. Las concentraciones se determinaron mediante medición de A_{280} utilizando un coeficiente de extinción de $1,59 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$.

- 55 La Figura 18 ilustra resultados ejemplares que muestran la actividad enzimática de ZC-701 diluida en solución salina. Definición de unidad: enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de para-nitrofenol alfa-glucósido (Sigma n.º N1377) en una hora a 37 °C en una reacción que contenía sustrato 10 mM y acetato de sodio 100 mM pH 4,2. Las reacciones de 50 µl se detuvieron con 300 µl de carbonato de sodio 100 mM. Se detectó al sustrato hidrolizado a 405 nm y se comparó con una curva estándar de p-nitrofenol (Sigma n.º N7660).

- 60 La Figura 19 ilustra el análisis por SDS-PAGE ejemplar de ZC-701 diluida en solución salina. Los carriles que contenían 10 µg de muestra de ZC-701 se separaron en geles prefabricados XT con Bis-Tris al 4-12 % (Bio Rad n.º 345-0124) en condiciones reductoras (DTT 100 mM, gel superior) o condiciones no reductoras (sin DTT, gel inferior) como describía el fabricante a 200 voltios durante 50 minutos. Los geles se tiñeron con tinción de Imperial Protein (Pierce n.º 24615). Los carriles 1 y 2 contenían material de ZC-701 que no estaba diluido en solución salina. El material del carril 1 se almacenó a -80 °C y el material de carril 2 se almacenó a 4 °C.

Definiciones

65

Para que la presente invención sea comprendida más fácilmente, primero se definen determinados términos a continuación. A lo largo de toda la especificación se indican definiciones adicionales para los siguientes y otros términos.

Agente formador de volumen: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente formador de volumen" se refiere a un compuesto que añade masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierta). Los agentes formadores de volumen ejemplares incluyen manitol, glicina, cloruro de sodio, almidón hidroxietílico, lactosa, sacarosa, trehalosa, polietilenglicol y dextrano.

Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR): Como se utiliza en el presente documento, la expresión "receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)" se refiere a un receptor celular que se une a etiquetas de manosa-6-fosfato (M6P) sobre los precursores de la hidrolasa ácida en el aparato de Golgi que están destinadas al transporte al lisosoma. Además de a manosa-6-fosfatos, el CI-MPR también se une a otras proteínas que incluyen el IGF-II. También se conoce al CI-MPR como "receptor de M6P/IGF-II", "receptor de CI-MPR/IGF-II", "receptor de IGF-II" o "receptor de IGF2". Estas expresiones y abreviaturas de las mismas se utilizan en el presente documento indistintamente.

Diluyente: Como se utiliza en el presente documento el término "diluyente" se refiere a una sustancia de dilución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, segura y no tóxica para la administración a un ser humano) útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (ABPI), una solución de pH tamponado (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Terapia de reemplazo enzimático (TRE): Como se utiliza en el presente documento, la expresión "terapia de reemplazo enzimático (TRE)" se refiere a cualquier estrategia terapéutica que corrija una deficiencia enzimática proporcionando la enzima faltante. En algunas realizaciones, la enzima faltante se proporciona por infusión en el torrente sanguíneo. A medida que la sangre perfunde los tejidos del paciente, las células captan la enzima y la transportan al lisosoma, en donde la enzima actúa para eliminar material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Normalmente, para que la terapia de reemplazo de enzimas lisosómicas sea eficaz, la enzima terapéutica se entrega a los lisosomas en las células y los tejidos apropiados donde se manifiesta el defecto de almacenamiento. En algunas realizaciones, el producto terapéutico de reemplazo enzimático lisosómico se entrega utilizando carbohidratos acoplados de forma natural a la proteína para involucrar a los receptores específicos sobre la superficie de las células diana. Un receptor, el receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR), es particularmente útil para dirigir las enzimas lisosómicas de reemplazo debido a que el CI-MPR está presente en la superficie de la mayoría de los tipos celulares. Tales terapias de reemplazo enzimático, y enzimas de reemplazo, se describen en las patentes de Estados Unidos números 7.371.366, 7.354.576, 7.067.127, 6.905.856, 6.861.242, 6.828.135, 6.800.472, 6.770.468, 6.670.165, 6.642.038, 6.569.661, 6.537.785, 6.534.300 y publicación de solicitudes de patente de Estados Unidos números 20080176285, 20080003626, 20060286087, 20050170449, 20050003486. En algunas realizaciones, los productos terapéuticos de reemplazo de enzimas lisosómicas se entregan de una manera independiente de glucosilación, en particular, de manera independiente de manosa-6-fosfato. Tal método de entrega también se conoce como dirección lisosómica independiente de glucosilación (DLIG). En algunas realizaciones, las enzimas de reemplazo contienen una etiqueta DLIG (por ejemplo, un péptido) que se une al CI-MPR de manera independiente de manosa-6-fosfato. Los detalles de la tecnología DLIG se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.396.811, las publicaciones de solicitudes de Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400, y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077.

Dirección lisosómica independiente de glucosilación: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "dirección lisosómica independiente de glucosilación" (también denominada como "DLIG") se refiere a la dirección lisosómica que es independiente de manosa-6-fosfato.

Alfa glucosidasa ácida de ser humano: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "alfa glucosidasa ácida de ser humano" (también denominada como "AGA") se refiere a la forma de tipo silvestre precursora de la AGA de ser humano o a una variante funcional que es capaz de reducir los niveles de glucógeno en los lisosomas de mamífero, o que puede rescatar o mejorar uno o más de los síntomas de la enfermedad de Pompe.

Mejorar, aumentar, o reducir: Como se utiliza en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o los equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición inicial, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o a una medición en un individuo de control (o en múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo de control" es un individuo aquejado con la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, enfermedad de Pompe) que el individuo que se está tratando, quien tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que se está tratando (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y en el(los) individuo(s) de control son comparables).

Individuo, sujeto, paciente: Como se utiliza en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se refieren a un ser humano o a un sujeto mamífero que no sea ser humano. El individuo (también denominado como "paciente" o "sujeto") que se está tratando es un individuo (feto, lactante, niño, adolescente, o ser humano adulto) que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, enfermedad de Pompe (es decir, enfermedad de Pompe de inicio ya sea infantil, juvenil, o en el adulto) o que tenga el potencial de desarrollar una enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, enfermedad de Pompe).

Lioprotector: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "lioprotector" se refiere a una molécula que previene o reduce la inestabilidad química y/o física de una proteína o de otra sustancia a lo largo de la liofilización y el almacenamiento posterior. Los lioprotectores ejemplares incluyen azúcares tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes trihídricos o de azúcares superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol, polietilenglicol, Pluronic y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un lioprotector es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

Enfermedades de almacenamiento lisosómico: Como se utiliza en el presente documento, "enfermedades de almacenamiento lisosómico" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que se producen por la deficiencia de por lo menos una de las enzimas (por ejemplo, hidrolasas ácidas) que se necesitan en los lisosomas para romper macromoléculas para producir péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Como resultado, los individuos que padecen enfermedades de almacenamiento lisosómico tienen materiales acumulados en los lisosomas. Las enfermedades del almacenamiento lisosómico ejemplares se enumeran en la Tabla 1.

Enzima lisosómica: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enzima lisosómica" se refiere a cualquier enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamífero o que pueden rescatar o mejorar uno o más de los síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas de tipo silvestre o modificadas, y pueden producirse utilizando métodos recombinantes y sintéticos, o pueden purificarse a partir de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la Tabla 1.

Conservante: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conservante" se refiere a un compuesto que se puede añadir al diluyente para reducir la acción bacteriana en la formulación reconstituida, facilitando así la producción de una formulación reconstituida de múltiples usos. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilo amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol. En el presente documento el conservante más preferente es alcohol bencílico.

Espaciador: Como se utiliza en el presente documento, el término "espaciador" (también denominado "conector") se refiere a una secuencia peptídica entre dos residuos de proteína en una proteína de fusión. En general, un conector se diseña para ser flexible o para interponerse a una estructura, tal como una hélice alfa, entre los dos residuos de proteína. Un espaciador puede ser relativamente corto, tal como la secuencia Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 3) o Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 4), o puede ser más largo, tal como, por ejemplo, de 10-25 aminoácidos de longitud.

Esencialmente: Como se utiliza en el presente documento, el término "esencialmente" se refiere a la condición cualitativa de mostrar el alcance o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos casi nunca llegan a su finalización y/o se desarrollan hasta la exhaustividad o alcanzan o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "esencialmente" se utiliza en el presente documento para capturar la pérdida potencial de exhaustividad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica (por ejemplo, una enzima lisosómica) que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto proporciona una indicación de, o siente, un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica (por ejemplo, una enzima lisosómica) o composición eficaz, para tratar, mejorar, o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como mediante la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad, que previene o retrasa la aparición de la enfermedad, y/o también disminuir la severidad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz habitualmente se administra en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, o de la combinación con otros agentes farmacéuticos. También, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del

trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y/o la velocidad de excreción o de metabolismo de la proteína específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares como es bien conocido en las artes médicas.

Tratamiento: Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "que trata") se refiere a cualquier administración de una proteína terapéutica (por ejemplo, una enzima lisosómica) que alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la gravedad de y/o reduce la incidencia de forma parcial o completa de uno o más de los síntomas o característica de una enfermedad, trastorno, y/o afección particular. Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra solamente signos prematuros de la enfermedad, trastorno, y/o afección. Como alternativa o de forma adicional, tal tratamiento puede ser el de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Por ejemplo, tratamiento puede referirse a la mejora del estado cardíaco (por ejemplo, el aumento del volumen telediastólico y/o telesistólico, o la reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que se encuentra normalmente en la enfermedad de Pompe) o de una función pulmonar (por ejemplo, aumento de la capacidad vital durante el llanto sobre la capacidad de la medida basal, y/o la normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejora del neurodesarrollo y/o de las capacidades motoras (por ejemplo, aumento del valor en la AIMS: sigla del inglés: *Abnormal Involuntary Movement Scale*; escala de movimientos involuntarios anormales); reducción de los niveles de glucógeno en los tejidos del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye la mejora de la eliminación del glucógeno; en particular, la reducción o prevención de la cardiomiopatía asociada a la enfermedad de Pompe.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona, entre otras cosas, formulaciones para enzimas lisosómicas adecuadas para la terapia de reemplazo enzimático que conservan o potencian la estabilidad y/o eficacia de la proteína. En particular, las formulaciones que proporciona la presente invención reducen o eliminan la formación de agregados de alto peso molecular, la degradación de proteínas durante el secado por congelación, el almacenamiento, el transporte y la infusión.

Antes de la presente invención, la obstrucción del filtro resultante de la precipitación enzimática durante la infusión era un problema antiguo para las formulaciones existentes para determinadas enzimas lisosómicas (en particular, la α -glucosidasa (AGA) de ser humano recombinante). Se ha informado de que en ocasiones los filtros se bloqueaban múltiples veces durante una infusión. Este problema no solo provoca un gran inconveniente a los pacientes y los médicos, sino que también afecta a la eficacia terapéutica y la seguridad del paciente. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que el uso de un tipo particular de tensioactivo, el poloxámero, en una formulación, reduce de forma significativa o elimina la precipitación enzimática durante la infusión. Como se describe en la sección de Ejemplos, las formulaciones que contienen un poloxámero también estabilizan las enzimas lisosómicas durante la liofilización, la reconstitución, el almacenamiento y la infusión del paciente. Por lo tanto, la presente invención representa una mejora significativa en el campo de la terapia terapéutica enzimática.

Enzimas lisosómicas

La presente invención se puede utilizar para formular cualquier enzima lisosómica. Las enzimas lisosómicas adecuadas incluyen cualquier enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamífero o que pueden rescatar o mejorar uno o más de los síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas incluyen enzimas lisosómicas de tipo silvestre o modificadas y se pueden producir utilizando métodos recombinantes o sintéticos, o purificarse a partir de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

A. Trastornos de la glucogenosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	Acid-al, 4-glucosidasa	Glucógeno α 1-4 unido Oligosacáridos
B. Trastornos de glucolipidosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Gangliosidosis GM1	β -galactosidasa	Gangliósidos GM ₁

Enfermedad de Tay-Sachs	β -hexosaminidasa A	Gangliósido GM ₂
Gangliosidosis GM2: variante AB	Proteína activadora de GM ₂	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β -hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A	Sulfátidos
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann Pick, tipos A y B	Esfingomielinasa ácida	Esfingomielina
Niemann Pick, tipo C	Defecto de la esterificación del colesterol	Esfingomielina
Niemann Pick, tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida	Ésteres de colesterilo
C. Trastornos de mucopolisacáridos		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Síndrome de Hurler (MPS IH)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Scheie (MPS IS)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Heparán y dermatán sulfatos
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α -N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA-glucosaminido acetiltransferasa	Heparán sulfato
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6-sulfatasa	Queratán Sulfato
Morquio B (MPS IVB)	β -galactosidasa	Queratán Sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	Dermatán Sulfato
Síndrome de Sly (MPS VII)	β -glucuronidasa	
D. Trastornos de oligosacáridos/glicoproteínas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
α -manosidosis	α -manosidasa	Manosa/ Oligosacáridos
β -manosidosis	β -manosidasa	Manosa/ Oligosacáridos
Fucosidosis	α -L-fucosidasa	Fucosil-oligosacáridos
Aspartilglucosaminuria	N-aspartil- β -glucosaminidasa	Aspartilglucosamina Asparraginas

Sialidosis (Mucopolipidosis I)	α -neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Galactosialidosis (Síndrome de Goldberg)	Deficiencia de la proteína protectora lisosómica	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de Schindler	α -N-acetil-galactosaminidasa	
E. Trastornos del transporte de enzimas lisosómicas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Mucopolipidosis II (Enfermedad de inclusión celular)	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Heparán sulfato
Mucopolipidosis III (Pseudopolidistrofia de Hurler)	La misma que ML II	
F. Trastornos de transporte de la membrana lisosómica		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Cistinosis	Proteína del transporte de cisteína	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína del transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libres
Enfermedad de almacenamiento del ácido siálico infantil	Proteína del transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libres
G. Otros		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Batten (lipofuscinosis neuronal cerioidea infantil)	Desconocido	Lipofuscinas
Lipofuscinosis neuronal cerioidea infantil	Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Mucopolipidosis IV	Desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina	Saposinas A, B, C o D	

Las secuencias de aminoácidos de las enzimas mostradas en la Tabla 1 son bien conocidas en la técnica y son fácilmente accesibles mediante la búsqueda en las bases de datos públicas tales como GenBank utilizando los nombres de las enzimas, y tales secuencias se incorporan en el presente documento como referencia. En algunas realizaciones, también se puede utilizar la presente invención para formular enzimas modificadas a partir de las enzimas de origen natural que incluyen, pero sin limitación, cualquiera de las enzimas que tengan una secuencia por lo menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de la correspondiente enzima de origen natural mostrada en la Tabla 1. En algunas realizaciones, una enzima adecuada puede ser un fragmento o una enzima de origen natural. En algunas realizaciones, una enzima adecuada puede ser una proteína de fusión que contiene una enzima de origen natural o un fragmento de la misma. En diversas realizaciones, una enzima modificada conserva la actividad enzimática de la enzima de origen natural correspondiente. Por ejemplo, una enzima AGA adecuada puede ser un fragmento de una AGA de ser humano de origen natural o una variante de secuencia de la misma que conserve la capacidad de escindir las uniones α 1-4 en oligosacáridos lineales.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de las enzimas lisosómicas se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de la enzima de ser humano de origen natural, después del alineamiento de las secuencias y de la introducción de huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversos modos que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo utilizando programas informáticos de ordenador disponibles de forma pública tales como los programas informáticos BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para el alineamiento de medición, que incluyen cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la longitud

completa de las secuencias a comparar. Preferentemente, el programa informático WU-BLAST-2 se utiliza para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se ajusta a los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se ajustan con los siguientes valores: tramo de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral de palabra (T)=11. El valor HSP (S) y los parámetros HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular, sin embargo, los valores mínimos se pueden ajustar y se fijan como se indica anteriormente.

Enzimas lisosómicas etiquetadas con DLIG

En algunas realizaciones, para facilitar la dirección lisosómica se modifica una enzima adecuada. Por ejemplo, se puede fusionar una enzima adecuada a una etiqueta de Dirección Lisosómica Independiente de Glucosilación (DLIG), que dirige a la enzima a los lisosomas de una manera independiente de manosa-6-fosfato. Normalmente, una etiqueta DLIG es una proteína, péptido, u otro residuo que se une al CI-MPR, que también se denomina como receptor IGF-II, de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

En algunas realizaciones, se obtiene una etiqueta DLIG a partir del factor de crecimiento similar a insulina de ser humano II (IGF-II). En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG es un IGF-II de ser humano maduro de tipo silvestre o de origen natural (SEQ ID NO: 1).

IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1) (los sitios de escisión de furina están en negrita y subrayados)

**AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVECCFRSCDLALLET
YCATPAKSE**

En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG es un IGF-II de ser humano maduro modificado que contiene sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG tiene una secuencia por lo menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia del IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG es un fragmento del IGF-II de ser humano maduro. En realizaciones particulares, una etiqueta DLIG contiene los aminoácidos 8-67 del IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG contiene una deleción N terminal, C terminal o interna. En realizaciones particulares, una etiqueta DLIG contiene una deleción de los aminoácidos 2-7 (Δ 2-7) del IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG es un péptido IGF-II de ser humano modificado que tiene disminuida la afinidad de unión por el receptor de IGF-I en comparación con IGF-II de ser humano de origen natural.

En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG es una etiqueta peptídica resistente a furina. Normalmente la proteasa furina reconoce y escinde un sitio de escisión que tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 5), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está posicionado en la secuencia después del resto arginina (Arg) carboxilo terminal. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de furina tiene una secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 6), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está posicionado en la secuencia después del resto arginina (Arg) carboxilo terminal. Como se utiliza en el presente documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que pueda reconocer y escindir el sitio de escisión de la proteasa furina como se define en el presente documento, que incluye a la proteasa furina o similar a furina. La furina también es conocida como enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados (PACE: sigla del inglés: *paired basic amino acid cleaving enzyme*). La furina pertenece a la familia de la proproteína convertasa similar a subtilisina que incluye a PC3, una proteasa responsable de la maduración de la proinsulina en los islotes pancreáticos. El gen que codifica la furina se conoció como FUR (sigla del inglés: "FES Upstream Region", región cadena arriba FES).

Como se muestra en la SEQ ID NO: 1, el IGF-II de ser humano maduro contiene entre los restos 34-40 (en negrita y subrayado) dos sitios potenciales solapantes de escisión de furina.

En algunas realizaciones, una etiqueta DLIG adecuada es un péptido IGF-II modificado que es resistente a la escisión por furina y todavía conserva la capacidad de unirse al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, las etiquetas DLIG resistentes a furina se pueden diseñar mutando la secuencia de aminoácidos en una o más escisiones de furina de forma que la mutación suprima por lo menos un sitio de escisión de furina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una etiqueta DLIG resistente a furina es una muteína de IGF-II resistente a furina que contiene una mutación que suprime por lo menos un sitio de escisión de la proteasa furina o cambia una secuencia adyacente al sitio de escisión de la proteasa furina de forma que se evita, inhibe, reduce o ralentiza la escisión de la furina, en comparación con un péptido IGF-II de tipo silvestre (por ejemplo, IGF-II maduro de ser humano de tipo silvestre). Normalmente, una mutación adecuada no afecta la capacidad de la etiqueta DLIG resistente a furina para unirse al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes de ser humano. En particular, una muteína de IGF-II resistente a furina adecuada para la invención se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes de ser humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato con

una constante de disociación de 10^{-7} M o menor (por ejemplo, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , o menor) a pH 7,4. En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene una mutación dentro de una región que corresponde a los aminoácidos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una mutación adecuada suprime por lo menos un sitio de escisión de la proteasa furina. Una mutación puede ser sustituciones, delecciones, inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, cualquier aminoácido dentro de la región que corresponde a los restos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) de la SEQ ID NO: 1 puede sustituirse por cualquier otro aminoácido o deleccionarse. Por ejemplo, las sustituciones en la posición 34 pueden afectar al reconocimiento de la furina del primer sitio de escisión. La inserción de uno o más aminoácidos adicionales dentro de cada sitio de reconocimiento puede suprimir uno o ambos sitios de escisión de la furina. La delección de uno o más de los restos en las posiciones degeneradas también puede suprimir ambos sitios de escisión de la furina.

En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones que corresponden a Arg37 o Arg40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene una sustitución Lys o Ala en las posiciones Arg37 o Arg40. Son posibles otras sustituciones, incluyendo combinaciones de mutaciones de Lys y/o Ala en las posiciones 37 y 40, o sustituciones de aminoácidos que no sean Lys o Ala.

Una etiqueta DLIG se puede fusionar al extremo N o al extremo C de un polipéptido que codifica una enzima lisosómica, o se puede insertar de forma interna. La etiqueta DLIG se puede fusionar de forma directa al polipéptido de la enzima lisosómica o se puede separar del polipéptido de la enzima lisosómica mediante un conector o un espaciador. Un conector o espaciador de aminoácidos en general se diseña para ser flexible o para interponerse en una estructura, tal como una hélice alfa, entre los dos residuos de proteína. Un conector o espaciador puede ser relativamente corto, tal como en la secuencia Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 3) o Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 4), o puede ser más largo, tal como, por ejemplo, de una longitud de 10-25 aminoácidos. El sitio de unión de la fusión debería seleccionarse con cuidado para promover el plegamiento y la actividad apropiados de los compañeros de fusión y para evitar la separación prematura de una etiqueta peptídica de un polipéptido AGA. En una realización preferente, la secuencia conectora es Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 3).

Se pueden encontrar la descripción detallada de la tecnología DLIG, etiquetas DLIG ejemplares y construcciones de enzimas lisosómicas etiquetadas con DLIG, en las patentes de Estados Unidos n.º 7.396.811, 7.560.424, y 7.629.309; las solicitudes de publicación de Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 20040005309, 2005-0281805, 2005-0244400, y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077, WO/2009/137721.

Enzimas con glucosilación modificada

En algunas realizaciones, se puede utilizar la presente invención para formular enzimas lisosómicas con patrones de glucosilación modificados. En algunas realizaciones, las enzimas con patrones de glucosilación modificados están altamente fosforiladas. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enzimas lisosómicas altamente fosforiladas" se refiere a enzimas lisosómicas que contienen un alto nivel de fosforilación en comparación con el de una enzima de origen natural. En algunas realizaciones, las enzimas lisosómicas altamente fosforiladas que contienen un nivel de fosforilación que no podría obtenerse solamente mediante el aislamiento de la enzima, se tratan con GlcNAc-fosfotransferasa y fosfodiéster- α -GlcNAcasa. En algunas realizaciones, "enzimas lisosómicas altamente fosforiladas" significa una enzima lisosómica que contiene desde aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 100 % de oligosacáridos bis fosforilados. En algunas realizaciones, una enzima lisosómica altamente fosforilada es una AGA de ser humano altamente fosforilada. En algunas realizaciones, una AGA de ser humano altamente fosforilada contiene cantidades aumentadas de restos manosa-6-fosfato (M6P) por molécula, en comparación con una AGA de ser humano de origen natural. En algunas realizaciones, una AGA de ser humano altamente fosforilada puede contener, en promedio, por lo menos 2, 3, 4, 5, o 6 restos M6P por molécula. Se describen ejemplos de AGA de ser humano altamente fosforilada y de otras enzimas lisosómicas, en las patentes de Estados Unidos n.º 7.371.366, 7.135.322, 7.067.127, 6.905.856, 6.861.242, 6.828.135, 6.800.472, 6.770.468, 6.670.165, 6.642.038, 6.537.785, y 6.534.300. En algunas realizaciones, las enzimas lisosómicas altamente fosforiladas se producen mediante líneas celulares deficientes en acidificación endosómica (por ejemplo, grupo de complementación END3 obtenido de CHO-K1). Se describen ejemplos adicionales en el documento WO/2005/077093.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede utilizar para formular enzimas lisosómicas subglucosiladas. Como se utiliza en el presente documento, "enzimas lisosómicas subglucosiladas" se refiere a una enzima en la que una o más de las estructuras de carbohidratos (por ejemplo, restos M6P) que normalmente estarían presentes en una enzima de origen natural se han omitido, eliminado, modificado, o enmascarado. Normalmente, las enzimas lisosómicas subglucosiladas tienen semivida *in vivo* extendida. Las enzimas lisosómicas subglucosiladas se pueden producir en un hospedador (por ejemplo bacteria o levadura) que no glucosila proteínas como lo hacen las células de mamífero convencionales (por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO)). Por ejemplo, las proteínas que produce la célula hospedadora pueden carecer de restos manosa, fucosa, y/o N-

acetilglucosamina terminales, los cuales reconoce el receptor de manosa, o pueden estar completamente subglucosilados. En algunas realizaciones, las enzimas lisosómicas subglucosiladas se pueden producir en células de mamífero o en otros hospedadores, pero se las trata de forma química o enzimática para eliminar uno o más restos de carbohidratos (por ejemplo uno o más restos M6P) o para modificar o enmascarar uno o más restos de carbohidratos. Tales enzimas tratadas de forma química o enzimática también se denominan como enzimas lisosómicas desglucosiladas. En algunas realizaciones, se eliminan uno o más sitios de glucosilación potenciales mediante mutación del ácido nucleico que codifica una enzima lisosómica, reduciendo de este modo la glucosilación de la enzima cuando se sintetiza en una célula de mamífero o en otra célula que glucosila proteínas. En algunas realizaciones, las enzimas lisosómicas se pueden producir utilizando un péptido señal secretor (por ejemplo, un péptido señal del IGF-II) de forma tal que los niveles de glucosilación de las enzimas se reducen y/o modifican. Los ejemplos de enzimas lisosómicas subglucosiladas o desglucosiladas se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7.629.309 y en las publicaciones de Estados Unidos 20090041741 y 20040248262.

Producción de enzima

Las enzimas adecuadas para la presente invención se pueden producir en cualesquier célula de mamífero o tipo celular susceptibles de cultivo celular y de expresión de polipéptidos, tales como, por ejemplo, células 293 de riñón embrionario de ser humano (HEK), de ovario de hámster chino (CHO), de riñón de mono (COS), HT1080, C10, HeLa, de riñón de hámster lactante (BHK), 3T3, C127, CV-1, HaK, NS/O, y L-929. Los ejemplos no limitantes específicos incluyen, pero sin limitación, la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC n.º 85110503); retinoblastos de ser humano (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario de ser humano (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster lactante (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino de ser humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón de perro (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata parda (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón de ser humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado de ser humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mater *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma de ser humano (Hep G2). En algunas realizaciones, las enzimas se producen en células CHO. En algunas realizaciones, las enzimas se producen en células obtenidas de CHO tales como líneas celulares deficientes en acidificación endosómica (por ejemplo, grupo de complementación END3 obtenido de CHO-K1).

Las enzimas también se pueden expresar en una diversidad de células hospedadoras que no son de mamífero tales como, por ejemplo, de insecto, (por ejemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), vegetales (por ejemplo, *Leguminosa*, cereal, o tabaco), de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), procariotas (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis* y otros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp.), o de hongos.

En algunas realizaciones, se puede producir en células deficientes en furina una proteína lisosómica con o sin una etiqueta DLIG resistente a furina. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "células deficientes en furina" se refiere a cualquiera de las células cuya actividad de furina proteasa está inhibida, reducida o eliminada. Las células deficientes en furina incluyen a células de mamífero y que no son de mamífero que no producen furina o producen cantidades reducidas o proteasa furina defectuosa. Las células deficientes en furina ejemplares que se conocen y están disponibles para el experto incluyen, pero sin limitación, las células FD 11 (Gordon *et al.* (1997) Infection and Immunity 65 (8): 3370 3375), y las células mutantes descritas en Moehring y Moehring (1983) Infection and Immunity 41 (3): 998 1009. Como alternativa, se puede obtener una célula deficiente en furina exponiendo a tratamiento de mutagénesis a las células de mamífero y que no son de mamífero descritas anteriormente, por ejemplo, irradiación, bromuro de etidio, bromouridina (BrdU) y otros, preferentemente mutagénesis química, y más preferente mutagénesis por metanosulfonato de etilo, recuperando las células que sobreviven al tratamiento y seleccionando las células que se encuentran como resistentes a la toxicidad de la exotoxina A de *Pseudomonas* (véase Moehring y Moehring (1983) Infection and Immunity 41 (3): 998 1009).

En otras realizaciones, mamíferos que no son ser humano transgénicos han mostrado producir en su leche enzimas lisosómicas. Tales mamíferos que no son ser humanos transgénicos pueden incluir ratones, conejos, cabras, ovejas, porcinos o bovinos. Véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.118.045 y 7.351.410.

Formulaciones para enzimas lisosómicas

La presente invención proporciona formulaciones de enzimas lisosómicas que conservan o potencian la estabilidad y/o eficacia de las proteínas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones de liofilización para enzimas lisosómicas. La liofilización, o secado por congelación, es una técnica empleada comúnmente para conservar proteínas, que sirve para eliminar agua de la preparación de proteína de interés. La liofilización es un procedimiento mediante el cual primero se congela el material a desecar y después se elimina el hielo o el disolvente congelado mediante sublimación en un entorno al vacío. La presente invención sirve para

proteger a las enzimas de los estreses por congelación y deshidratación y conservar o potenciar la estabilidad de la proteína durante el secado por congelación, y/o conservar o mejorar la estabilidad del producto liofilizado durante el almacenamiento.

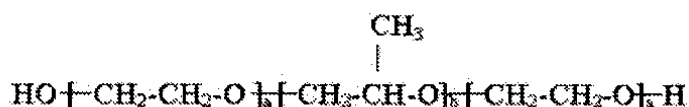
- 5 Debido a las variaciones en la temperatura y la presión a través del procedimiento de liofilización, se necesita una elección apropiada de excipientes o de otros componentes tales como estabilizadores, agentes tamponadores, agentes formadores de volumen, y tensioactivos para evitar la degradación de la enzima (por ejemplo, agregación, desamidación, y/u oxidación de proteínas) durante el secado por congelación y el almacenamiento.
- 10 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones en una forma líquida. Las formulaciones líquidas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, formulaciones de prelioofilización, formulaciones reconstituidas (por ejemplo, formulaciones reconstituidas a partir de polvos liofilizados), y formulaciones líquidas adecuadas para el almacenamiento prolongado en un estado líquido o congelado.
- 15 Las formulaciones de acuerdo con la presente invención pueden contener uno o más componentes descritos a continuación

Concentración de enzima

- 20 Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden contener una enzima lisosómica a diversas concentraciones. En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la invención pueden contener una enzima lisosómica (por ejemplo, AGA de ser humano recombinante) en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg/ml a 80 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 60 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 40 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 30 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 25 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 60 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 40 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 30 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 25 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 20 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 40 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 100 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 50 mg/ml, o aproximadamente 5 mg/ml a 25 mg/ml). En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la invención pueden contener una enzima lisosómica (por ejemplo, AGA de ser humano recombinante) en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, o 100 mg/ml.

Tensioactivos

- En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la presente invención contienen un tensioactivo. En particular, las formulaciones que proporciona la presente invención contienen como tensioactivo un poloxámero. Normalmente, los poloxámeros son copolímeros tribloque no iónicos. Los poloxámeros normalmente tienen una estructura anfífila que consta de un bloque hidrófobo central entre dos bloques hidrófilos. En general, el bloque hidrófobo central es polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) ("PPO") y los dos bloques hidrófilos son polioxietileno (poli(óxido de etileno)) ("PEO"). Se muestra como sigue una estructura general para un poloxámero ejemplar:



- 45 Se conoce también a los poloxámeros por el nombre comercial Pluronic® (fabricado por BASF). Los poloxámeros/Pluronic® están disponibles en diversas calidades que difieren en los pesos moleculares, las proporciones de bloques hidrófilos con respecto a los hidrófobos y las formas físicas, (es decir líquido, copos/sólidos o concentrado). Los productos de poloxámeros/Pluronic® ejemplares adecuados para la presente invención se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Calidades de poloxámero/Pluronic® y su composición química

Pluronic®	Poloxámero	a	b	Contenido de oxietileno (porcentaje)	Peso molecular
L 44 NF	124	12	20	44,8-48,6	2090-2360
F 68 NF	188	79	28	79,9-83,7	7680-9510
F 87 NF	237	64	37	70,5-74,3	6840-8830
F 108 NF	338	141	44	81,4-84,9	12700-17400
F 127 NF	407	101	56	71,5-74,9	9840-14600

En algunas realizaciones, un poloxámero adecuado para la presente invención es Pluronic® F-68.

Se puede incluir un poloxámero en una formulación de la invención a diversas concentraciones. En algunas realizaciones, un poloxámero está presente en una concentración que varía aproximadamente entre el 0,001 % y el 1 % (por ejemplo, entre el 0,001 % y el 0,8 %, entre el 0,001 % y el 0,6 %, entre el 0,001 % y el 0,5 %, entre el 0,001 % y el 0,4 %, entre el 0,001 % y el 0,3 %, entre el 0,001 % y el 0,2 %, entre el 0,001 % y el 0,1 %, entre el 0,01 % y el 1 %, entre el 0,01 % y el 0,5 %, entre el 0,01 % y el 0,4 %, entre el 0,01 % y el 0,3 %, entre el 0,01 % y el 0,2 %, o entre el 0,01 % y el 0,1 %) en peso. En algunas realizaciones, está presente un poloxámero en una concentración de aproximadamente el 0,001 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,04 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,12 %, 0,14 %, 0,16 %, 0,18 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,35 %, 0,4 %, 0,45 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, o 1,0 % en peso.

Agentes tamponadores

En algunas realizaciones, una formulación de la presente invención incluye un agente tamponador. Normalmente, las formulaciones de acuerdo con la invención es una solución de pH tamponado a un pH que varía desde aproximadamente 4-8 (por ejemplo, aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,2, 6,4, 6,5, 6,6, 6,8, 7,0, 7,5, u 8,0) y, en algunas realizaciones, desde aproximadamente 5-7. Los agentes tamponadores ejemplares adecuados para la invención incluyen, pero sin limitación, histidina, fosfato, tris(hidroximetil)aminometano ("Tris"), citrato, acetato, acetato de sodio, fosfato, succinato y otros ácidos orgánicos. Un agente tamponador puede estar presente en diversas concentraciones, que dependen, por ejemplo, del tampón y de la isotonicidad de la formulación deseada (por ejemplo, de la formulación reconstituida). En algunas realizaciones, un agente tamponador está presente en una concentración que varía entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, o entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o entre aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, un agente tamponador adecuado está presente en una concentración de aproximadamente 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM.

Agentes estabilizadores

En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la invención pueden contener un agente estabilizador para proteger a la enzima. Un agente estabilizador también se denomina como un lioprotector. Normalmente, un agente estabilizador adecuado puede ser sacarosa, rafinosa, sorbitol, manitol, trehalosa, glicina, arginina, metionina o combinaciones de los mismos. En general, la cantidad de agente estabilizador o lioprotector en una formulación prelioofilizada es tal que, después de la reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, también pueden ser adecuadas las formulaciones reconstituidas hipertónicas. Además, la cantidad de lioprotector no debe ser demasiado baja de forma que después de la liofilización se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la enzima. Cuando el lioprotector sea un azúcar (tal como sacarosa o trehalosa), las concentraciones del lioprotector ejemplares en la formulación prelioofilizada pueden variar entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM (por ejemplo, desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, y desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM), o como alternativa, desde el 0,5 % al 15 % (por ejemplo, desde el 1 % al 10 %, desde el 5 % al 15 %, desde el 5 % al 10 %) en peso. En algunas realizaciones, la proporción de la cantidad de masa del agente estabilizador y de la enzima es de aproximadamente 1:1. En otras realizaciones, la proporción de la cantidad de masa del agente estabilizador y de la enzima puede ser de aproximadamente 0,1:1, 0,2:1, 0,5:1, 2:1, 5:1, 10:1, o 20:1.

Agentes formadores de volumen

En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes formadores de volumen. Un "agente formador de volumen" es un compuesto que añade masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada. Por ejemplo, un agente formador de volumen puede mejorar el aspecto de la torta liofilizada (por ejemplo, torta liofilizada esencialmente uniforme). Los agentes formadores de volumen adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, lactosa, manitol, glicina, sacarosa, dextrano, trehalosa, almidón hidroxietílico, o combinaciones de los mismos. Las concentraciones ejemplares de los agentes formadores de volumen son desde aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % (por ejemplo, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 %, y 10,0 %) en peso.

Tonicidad

En algunas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la presente invención contienen un agente de tonicidad para mantener isotónicas a las formulaciones de preliofilización o a las formulaciones reconstituidas. Normalmente, por "isotónico" se refiere a que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre de ser humano. Las formulaciones isotónicas en general tendrán una presión osmótica desde aproximadamente 240 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg. La isotonicidad se puede medir utilizando, por ejemplo, un osmómetro tipo de presión de vapor o de punto de congelación. Los agentes de isotonicidad ejemplares incluyen, pero sin limitación, glicina, sorbitol, manitol, cloruro de sodio, sacarosa, dextrosa, arginina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de tonicidad adecuados pueden estar presentes en

formulaciones liofilizadas en una concentración desde aproximadamente el 0,01 - 5 % (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 o 5,0 %) en peso.

Se pueden incluir en una formulación de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando no afecten de forma adversa las características deseadas de la formulación, otros vehículos, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero sin limitación, agentes tamponadores adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

Las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener más de una proteína como sea apropiado para una indicación particular tratada, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afectan de forma adversa a la otra proteína.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de, o a continuación de, la liofilización y la reconstitución.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones "estables" para las enzimas lisosómicas descritas en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, una formulación "estable" es una en la que la enzima que contiene esencialmente conserva su estabilidad e integridad física y química durante la liofilización, almacenamiento, transporte e infusión. Como resultado, las formulaciones que la presente invención proporciona reducen o eliminan la formación de agregados de alto peso molecular, la degradación de proteínas durante el secado por congelación, el almacenamiento, el transporte y la infusión. En realizaciones particulares, una formulación estable que proporciona la presente invención reduce o elimina la precipitación de enzima durante el secado por congelación, almacenamiento, transporte e infusión. La precipitación de enzima se puede determinar por examen visual. Además, para medir la estabilidad de la enzima se pueden utilizar diversas técnicas analíticas para la medición de la estabilidad de proteínas. Véase, Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir después del almacenamiento a una temperatura seleccionada (por ejemplo, 0 °C, 5 °C, 25 °C (temperatura ambiente), 30 °C, 40 °C) durante un periodo de tiempo seleccionado (por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, etc.). Para la exploración rápida, la formulación se puede mantener a 40 °C desde 2 semanas hasta 1 mes, en cuyo tiempo se mide la estabilidad. Cuando la formulación es para almacenarse a 2-8 °C, en general la formulación debería ser estable a 25 °C (es decir, a temperatura ambiente) o 40 °C durante por lo menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante por lo menos 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años. Cuando la formulación es para almacenarse a 30 °C, en general la formulación debería ser estable durante por lo menos 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante por lo menos 2 semanas, 1 mes, 3 meses o 6 meses. En algunas realizaciones, el grado de agregación después de la liofilización y el almacenamiento se puede utilizar como un indicador de estabilidad de la proteína. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agregados de alto peso molecular (APM)" se refiere a una asociación de por lo menos dos monómeros de proteína. Para los fines de la presente invención, un monómero se refiere a la unidad individual de cualquier forma biológicamente activa de la proteína de interés. La asociación puede ser covalente, no covalente, de disulfuro, entrecruzamiento no reducible, o mediante otro mecanismo.

Por ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en la que menos de aproximadamente el 10 % (por ejemplo, menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %) y preferentemente menos de aproximadamente el 5 % (por ejemplo, menos del 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %) de la proteína está presente en la formulación como un agregado (también denominado como especies de alto peso molecular ("APM")). En algunas realizaciones, se puede medir la estabilidad mediante un aumento en la formación de agregados después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser una en la que el aumento de agregado en la formulación liofilizada es menor de aproximadamente el 5 % (por ejemplo, menor del 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %) y preferente menor de aproximadamente el 3 % (por ejemplo, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 %, 0,1 %), cuando la formulación liofilizada se almacena a 25 °C (es decir, a temperatura ambiente) o a 40 °C durante por lo menos 2 semanas, 1 mes, 3 meses o 6 meses, o a 2-8 °C durante por lo menos 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años. Las especies agregadas o de APM se pueden analizar utilizando métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), HPLC de intercambio de cationes (CEX-HPLC), difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido modulada (mDSC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC), dispersión de luz multiángulo (MALS), fluorescencia, absorción ultravioleta, nefelometría, electroforesis capilar (EC), SDS-PAGE, y combinaciones de los mismos.

Kits

La presente invención también proporciona kits que contienen reactivos o formulaciones de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, un kit de acuerdo con la invención puede incluir un recipiente que contiene la

mezcla liofilizada de una enzima lisosómica (por ejemplo, AGA de ser humano) y proporcionar instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo viales de dos cámaras), bolsas (por ejemplo, bolsas iv), jeringas (tales como jeringas de dos cámaras) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene a la formulación liofilizada y la etiqueta sobre, o en asociación con el recipiente puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o utilización. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se reconstituye hasta las concentraciones de proteína como se describe anteriormente. La etiqueta puede indicar adicionalmente que la formulación es útil para o se destina a, por ejemplo, administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, o intratecal. Un kit adecuado puede incluir adicionalmente un segundo recipiente que contenga un diluyente adecuado (por ejemplo ABPI). Después de la mezcla del diluyente y la formulación liofilizada, la concentración de proteína final en la formulación reconstituida en general será de por lo menos aproximadamente 1 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, o 100 mg/ml).

Ejemplos

Ejemplo 1: exploración de tensioactivo

Los experimentos en este ejemplo se diseñaron como parte del estudio de preformulación para examinar la estabilidad de ZC-701 en diversas condiciones de formulación que incluyen pH, modificador de tonicidad, y tensioactivo.

ZC-701 es una proteína de fusión que contiene una etiqueta DLIG obtenida del IGF-II de ser humano (IGF-II $\Delta 2-7$) fusionado al extremo N de un fragmento de la AGA de ser humano (aminoácidos 70-952 de la AGA de ser humano). Hay un espaciador de tres aminoácidos (GAP) entre la etiqueta DLIG y el fragmento de AGA. La secuencia de aminoácidos de ZC-701 se muestra en la SEQ ID NO: 2.

ALCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPA
KSEGAPAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAIPDKAITQECCARGCCYIPAKQGLQGA
QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMETEN
RLHFTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTT
VAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGANLYG
SHPFYLALEDGGSAGHVFLNSNAMDVVLQPSALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSV
VQQYLDVVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDL
DYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEG
LRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWI
DMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLTQAATICASSHQFLSTHYNLHNL
YGLTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEI
LQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPMRNHNSLLSLPQEPYSFS
EPAQQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQL
LWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEG
QWVTLPAPLDTINVHLRAGYIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTGGGEARGELFW
DDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQ
VLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC (SEQ ID NO:2)

En este ejemplo, se examinaron los siguientes parámetros de formulación: (1) pH: 4,0, 5,0, 6,0, y 6,2; (2) Tampones: tampón acetato de sodio (pH 3,0-5,0) y tampón fosfato de sodio (pH 7,0-8,0), todos a una concentración de 10 mM; (3) Modificadores de tonicidad: cloruro de sodio (NaCl) 100 mM, cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, sorbitol al 3,5 %, y sorbitol al 5,0 %; (4) Estabilizador: arginina 100 mM, EDTA 0,1 mM; (5) Tensioactivos: polisorbato 20, polisorbato 80, y Pluronic F-68; y (6) Concentraciones de producto: 5 y 15 mg/ml.

El volumen de llenado se fijó en aproximadamente 0,5 ml. En el presente estudio todos los candidatos de formulación se formularon mediante diálisis frente a cada formulación candidata.

Las formulaciones se probaron bajo las condiciones de estrés enumeradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de estrés ejemplares

Estrés	Condiciones	Puntos de tiempo
Temperatura	-20 °C	1, 2, 4, 8 semanas
	4 °C	0, 1, 2, 4, 8 semanas
	25 °C	1, 2, 4, 8 semanas
	40 °C	1, 2, 4, 8 semanas
Agitación	Agitación por mini agitador vorticial	4 horas
Congelación-descongelación	-70 °C hasta TA	5 ciclos consecutivos
Luz UV	Exposición a luz UV (amplio espectro)	24 horas

Para analizar los productos de degradación principales generados bajo los estreses, se utilizaron los ensayos indicadores de estabilidad SE-HPLC, RP-HPLC y SDS-PAGE.

Normalmente, el producto precipita cuando se introduce estrés por agitación. Como se describe a continuación, se observó que la adición en la formulación de Pluronic® F-68 como tensioactivo estabilizó el producto frente al estrés por agitación. Brevemente, el producto se sometió a agitación constante durante hasta 4 horas para comprender la estabilidad del producto bajo estrés por agitación y/o de corte. Se utilizó para este estudio el producto en la formulación a granel actual de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 145,15 mM, KCl 2,33 mM, fosfato de potasio 2 mM, pH 7,2, lote CZ-701-B20-10 10,06 mg/ml. La Figura 1 proporciona una imagen de los viales del estudio de exploración de tensioactivos. La mezcla agitada sin tensioactivo (control +) precipitó, lo que sugiere que el producto precipita bajo estrés por agitación. La adición de cada uno de los tensioactivos probados, es decir, polisorbato 20 al 0,01 %, polisorbato 80 al 0,01 %, o Pluronic® F-68 (poloxámero 188) al 0,1 %, protegió al producto frente a la precipitación inducida por agitación. Basándose en el análisis por SE-HPLC (Figura 2), Pluronic® F-68 también previno la formación de cualquier agregado soluble.

A base del estudio de estrés por agitación con diversos tensioactivos, se seleccionó Pluronic F-68 como el tensioactivo para los estudios de formulación adicionales. Las formulaciones precisas probadas en este estudio se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4. Formulaciones ejemplares probadas bajo condiciones de estrés.

Código de form.	Tampón	pH	Modificador de tonicidad	Tensioactivo (%)	Estabilizador	Concentración (mg/ml)
5A4N	Acetato de sodio 10 mM	4,0	NaCl 150 mM	F-68 al 0,1 %		5
5A4S	Acetato de sodio 10 mM	4,0	Sorbitol al 5 %	F-68 al 0,1 %		5
5A4NR	Acetato de sodio 10 mM	4,0	NaCl 100 mM	F-68 al 0,1 %	Arginina 100 mM	5
5A4SR	Acetato de sodio 10 mM	4,0	Sorbitol al 3,5 %	F-68 al 0,1 %	Arginina 100 mM	5
5A5N	Acetato de sodio 10 mM	5,0	NaCl 150 mM	F-68 al 0,1 %		5
5A5S	Acetato de sodio 10 mM	5,0	Sorbitol al 5 %	F-68 al 0,1 %		5
5P6N	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	NaCl 150 mM	F-68 al 0,1 %		5
5P6S	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	Sorbitol al 5 %	F-68 al 0,1 %		5
5P62N	Fosfato de sodio 10 mM	6,2	NaCl 150 mM	Ninguno		5

Código de form.	Tampón	pH	Modificador de tonicidad	Tensioactivo (%)	Estabilizador	Concentración (mg/ml)
5P6NR	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	NaCl 100 mM	F-68 al 0,1 %	Arginina 100 mM	5
5P6NE	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	NaCl 150 mM	F-68 al 0,1 %	EDTA 0,1 mM	5
15P6N	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	NaCl 150 mM	F-68 al 0,1 %		15
15P6S	Fosfato de sodio 10 mM	6,0	Sorbitol al 5 %	F-68 al 0,1 %		15

Las formulaciones se expusieron a diversas condiciones de estrés (Tabla 3). Se observó que por ejemplo, en condiciones iónicas, en ausencia de arginina, el producto fue sensible al estrés por congelación/descongelación. Como otro ejemplo, a pH 6 el producto fue sensible al estrés por luz UV. Cuando se incubó a 40 °C en el estudio de estabilidad acelerada, precipitaron todas las formulaciones excepto acetato de sodio 10 mM, sorbitol al 5 %, Pluronic® F-68 al 0,1 %, pH 4,0. A temperaturas más bajas, 4 °C y -20 °C, la formulación acetato de sodio 10 mM, sorbitol al 5 %, Pluronic F-68 al 0,1 %, pH 4,0, fue la única formulación que no produjo agregados, como se caracterizó mediante SE-HPLC. Los resultados obtenidos a partir de este estudio sugieren que las formulaciones estables incluyen Pluronic® F-68 al 0,1 % a pH 4 con un modificador de la tonicidad no iónico.

Ejemplo 2. Formulación liofilizada para ZC-701

Los experimentos en este ejemplo se diseñaron para optimizar las formulaciones de liofilización para ZC-701. En particular, estos estudios proporcionan información acerca del efecto de la formulación sobre la estabilidad del producto. Por ejemplo, a través del estudio de degradación forzada con candidatos de formulación seleccionados, se abordaron los siguientes objetivos: (1) comprender los estreses a los que el producto es susceptible; (2) identificar los productos de degradación; (3) confirmar los ensayos de indicación de la estabilidad; y (4) comprender las condiciones de la formulación estable.

ZC-701 se formuló en diversas lioformulaciones basadas en citrato y fosfato. Se examinaron los siguientes parámetros de formulación: (1) Tampones: citrato (pH 6,0), o fosfato/citrato (pH 6,0); (2) Agentes formadores de volumen: glicina al 2 %, o manitol al 4 %. En todas las formulaciones probadas se utilizaron los siguientes parámetros: (3) Volumen de llenado: 0,5 ml; (4) pH: 6,0; (5) Tensioactivo: poloxámero 188; y (6) estabilizador: trehalosa al 1 %.

En este estudio todos los candidatos de formulación se formularon dializando frente a cada formulación candidata y las formulaciones ejemplares se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Formulaciones ejemplares de ZC-701

Código	Tampón	pH	Agente formador de volumen	Estabilizador	Tensioactivo	Conc. (mg/ml)
C6GT	Citrato 50 mM	6,0	Glicina al 2 %	Trehalosa al 1 %	Poloxámero 188 al 0,10 %	10
C6MT	Citrato 50 mM	6,0	Manitol al 4 %	Trehalosa al 1 %	Poloxámero 188 al 0,10 %	10
PC6MT*	Fosfato/citrato 50 mM	6,0	Manitol al 4 %	Trehalosa al 1 %	Poloxámero 188 al 0,10 %	10

Normalmente, un ciclo de liofilización se puede elegir a base de la integridad de la torta, alta temperatura de transición vítrea, contenido de humedad óptimo (< 1 %), reconstitución fácil y completa, y mínimo dolor asociado a la inyección (para una dosis de 1 mg), utilizando los siguientes ensayos: aspecto visual, pH, contenido de humedad (protocolo de integridad de biosolución), FTIR para análisis estructural (protocolo de integridad de biosolución), osmolalidad (protocolo de integridad de biosolución), calorimetría de barrido diferencial (protocolo de integridad de biosolución), SE-HPLC, SDS-PAGE.

Las formulaciones ejemplares (Tabla 5) se liofilizaron en viales de vidrio borosilicato de Tipo I con tapones de goma recubiertos con Flurotec®, con un volumen de llenado de 0,5 ml. Para secar las formulaciones se utilizó el ciclo de liofilización como se muestra en la Figura 3. Después del secado se formaron tortas firmes de buen aspecto (Figura 4). Sin embargo, el contenido de humedad fue mayor del 1 % en las tres formulaciones (Tabla 6). Esto puede deberse a la alta concentración de citrato en las formulaciones. La optimización de ciclo de liofilización debería reducir el contenido de humedad.

Tabla 6. Análisis de humedad y resultados de osmolalidad

ID	Contenido de humedad tiempo cero	Contenido de humedad 16 semanas a 25 °C	Osmolalidad
C6GT	1,58	2,94	478
C6MT	3,81	2,87	485
PC6MT	2,54	2,86	458

Se realizó la calorimetría de barrido diferencial de C6MT. La presencia de citrato en las formulaciones parecía enmascarar cualquiera de las señales de fusión eutéctica que podrían haberse producido a alrededor de -15 °C en el ensayo. Los intentos de desvitrificación mediante calentamiento de las muestras hasta -15 °C desde -50 °C, enfriando otra vez a -50 °C y calentando a 4 °C, no mostraron diferencia en el flujo de calor (Figura 5). La temperatura de transición vítrea a -38 °C no pareció provocar ningún colapso de la torta después de la liofilización.

Estudios de estrés

Tabla 7. Las formulaciones se probaron bajo las siguientes condiciones de estrés:

Estrés	Condición	Puntos de tiempo
Temperatura	4 °C	Pre lio., 0, 2* días; 1, 2, 4, 8, 12, 16 semanas; **
	25 °C***	2 días; 1, 2, 4, 8, 12, 16 semanas; **
	40 °C	2 días; 1, 2, 4 semanas
* En el tiempo cero se reconstituyó un conjunto adicional de muestras y se almacenó en estado líquido durante dos (2) días a 4 °C, antes del análisis. ** Para los análisis de humedad se incluyeron a 4 y 25 °C, 3 viales/formulaciones adicionales. *** 1 vial/formulación extra para los bioensayos a las 0, 4, 8, 16 semanas para las muestras a 25 °C. A partir de las 8 semanas solo se analizaron las formulaciones seleccionadas.		

Para analizar los productos de degradación principales generados bajo los estreses, se utilizaron en este estudio los ensayos indicadores de estabilidad HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC) y electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para la exclusión por tamaño (SE-HPLC), la fase móvil: solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,2 NaCl 0,15 M; columna: TSK-GEL G2000SWXL 300 X 7,8 mm ID de TOSOH Bioscience; caudal: 0,5 ml/min; carga de muestra: 50 µg/inyección. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), tipo de gel: gel BisTris al 4-12 % NuPAGE Novex; tampón de desarrollo: tampón de desarrollo MOPS SDS 1X; reactivo de tinción: SimplyBlue SafeStain, Invitrogen; volumen de carga: 12 µl de estándar de PM Mark 12TM, Invitrogen; carga de muestra: 10 µg.

ZC-701 mostró muy poca degradación global a lo largo del periodo de tiempo de 16 semanas como se determinó mediante SE-HPLC (Figuras 6 y 7). Después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C y 25 °C, y de comparar con un estándar de referencia congelado, las formulaciones no mostraron cambio cuando se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 8). No se observó cambio significativo cuando las formulaciones reconstituidas se almacenaron durante dos días a 4 °C (Figura 9). Como se describe anteriormente, los contenidos inicial y final de humedad fueron alto debido al uso de citrato en el tampón de formulación (Tabla 6). La elección de citrato también dio como resultado la alta osmolalidad (Tabla 6). Los perfiles de estabilidad para cada una de las formulaciones probadas se ilustran en la Figura 10.

Como se muestra a continuación en la Tabla 8, los estudios de estabilidad indicaron que, en las formulaciones liofilizadas, la formulación que contenía citrato 50 mM a pH 6,0, glicina al 2 %, trehalosa al 1 %, y Poloxámero 188 al 0,1 % fue ligeramente más estable que las otras dos condiciones después del almacenamiento a 4 °C y 25 °C. El SDS-PAGE no sugirió ninguna diferencia apreciable entre las formulaciones. No se observó degradación apreciable en esta formulación después de 16 semanas de almacenamiento a 4 °C y 25 °C. Las diferencias entre las tres formulaciones son pequeñas.

Tabla 8. Sumario de los resultados de estabilidad de los candidatos de formulación ejemplares

(1) Pre lio., Tiempo 0, y 2 días de reconstitución									
ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE	RP	IE	
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Pre lio.	6,37	93,9	N/E	N/E	11,68
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Pre lio.	6,25	93,1	N/E	N/E	8,90
PC6MT	Fosfato/Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Pre lio.	6,26	92,8	N/E	N/E	9,62
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	T cero	6,27	93,9	N/E	N/E	11,03
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	T cero	6,18	93,1	N/E	N/E	9,18
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	T cero	6,05	92,8	N/E	N/E	9,65
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Recons. 2 días	6,50	93,9	N/E	N/E	11,39
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Recons. 2 días	6,33	93,0	N/E	N/E	9,61
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	Recons. 2 días	6,35	92,7	N/E	N/E	9,26
(2) 1 semana									
ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE	RP	IE	
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,31	93,3	N/E	N/E	11,28
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,21	93,0	N/E	N/E	9,55
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,08	92,3	N/E	N/E	10,07
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,28	93,1	N/E	N/E	11,46
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,15	92,0	N/E	N/E	9,43
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,09	91,7	N/E	N/E	9,96

ES 2 569 514 T3

C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,17	93,3	N/E	N/E	8,94
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,09	90,4	N/E	N/E	9,53
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,10	90,2	N/E	N/E	10,33
(3) 2 semanas									
ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE	RP	IE	
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,31	93,0	N/E	N/E	11,29
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,21	93,1	N/E	N/E	9,09
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,08	92,5	N/E	N/E	9,74
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,28	92,9	N/E	N/E	11,11
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,15	92,1	N/E	N/E	8,95
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,09	91,9	N/E	N/E	9,48
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,17	93,2	N/E	N/E	8,47
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,09	90,3	N/E	N/E	9,23
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,10	90,6	N/E	N/E	9,64
(4) 4 semanas									
ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE	RP	IE	
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,20	94,3	N/E	N/E	11,14
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,06	93,7	N/E	N/E	9,59
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,01	93,3	N/E	N/E	10,23

C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,04	94,1	N/E	N/E	11,77
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,05	92,9	N/E	N/E	9,39
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,07	92,8	N/E	N/E	10,20
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,13	94,0	N/E	N/E	8,54
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,02	91,8	N/E	N/E	9,24
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	37	6,20	91,4	N/E	N/E	10,32

(5) 8 semanas* nótese por favor que se utilizó una nueva columna de SE-HPL a partir de este punto de tiempo en adelante; las columnas anteriores habían perdido resolución. Por lo tanto, las cantidades ascendieron ligeramente.

ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE RP IE			
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,15	95,5	N/E	N/E	11,15
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,23	95,6	N/E	N/E	11,27
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,13	94,6	N/E	N/E	10,15
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,17	95,4	N/E	N/E	11,77
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,18	93,9	N/E	N/E	9,00
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,12	93,6	N/E	N/E	9,38

(6) 12 Semanas

ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE RP IE			
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,16	94,3	N/E	N/E	11,60
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,17	93,1	N/E	N/E	9,39
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Mann al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,18	92,8	N/E	N/E	9,95

C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,17	93,8	N/E	N/E	11,27
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,21	91,8	N/E	N/E	9,37
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,18	91,3	N/E	N/E	9,93
(7) 16 Semanas									
ID	Tampón (10 mM)	Modificador de tonicidad	Tensioactivo	Temp (°C)	pH	HPLC	Pureza	(%)	Conc. (mg/ml)
						SE RP IE			
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,07	94,3	N/E	N/E	11,22
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,04	93,6	N/E	N/E	9,52
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	5	6,05	93,2	N/E	N/E	9,85
C6GT	Citrato	Glicina al 2 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,07	94,1	N/E	N/E	11,33
C6MT	Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,03	92,4	N/E	N/E	9,29
PC6MT	Fosfato/ Citrato	Man al 4 %/ Trehalosa al 1 %	Poloxámero al 0,10 %	25	6,07	91,8	N/E	N/E	9,74

Ejemplo 3. Estabilidad de ZC-701

La estabilidad de ZC-701A se examinó a lo largo del transcurso de un estudio de tres meses. El artículo de prueba liofilizado ZC-701-GMP1 en el tampón de formulación actual (citrato 50 mM, manitol al 4 %, trehalosa al 1 % y Pluronic F-68 al 0,1 %, pH 6,0) se comparó con la muestra de control ZC-701-B18-10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 6,2. Las muestras se incubaron a 4 °C, a temperatura ambiente, y a -80 °C durante hasta 92 días. La estabilidad de ZC-701 se evaluó en términos de concentración de proteína, actividad enzimática de AGA, pureza del monómero, y unión al receptor CI-MPR.

ZC-701-GMP1 fue estable en el tampón de formulación a 4 °C y a -80 °C durante los tres meses de estudio completos. ZC-701-B18-10 en PBS pH 6,2 fue también estable excepto por un aumento en la multimerización del compuesto, que se produjo a 4 °C. En tres meses a 4 °C la cantidad de multímero de ZC-701-B18-10 aumentó desde <1 % hasta por encima del 25 %. Por el contrario, la cantidad de ZC-701-GMP1 multimérica se mantuvo a <1 % durante el estudio completo. Esto demuestra que el tampón de formulación actual proporciona estabilidad del compuesto mejorada en comparación con PBS pH 6,2.

Brevemente, material de ZC-701-GMP1 del lote 106A12-017782 del fármaco a granel GMP se liofilizó en una ejecución de diseño del ciclo de liofilización de llenado/acabado en Altea (ejecución de diseño 4ER-067). Se reconstituyeron viales de ZC-701-GMP1 que contenían 35 mg de ZC-701 en tampón de formulación con 6,8 ml de agua, se prepararon alícuotas, y se almacenaron a 4 °C, a temperatura ambiente (TA), o a -80 °C. La muestra de control ZC-701-B18-10 formulada en PBS pH 6,2, se descongeló del almacenamiento a -80 °C.

Las muestras a TA se analizaron en el día 0 y en el día 1. Se analizaron otras mezclas en los días 0, 1, 7, 28 y 92. Los análisis incluyeron la determinación de la concentración de proteína por espectrometría A_{280} , análisis de actividad enzimática de PNP de AGA, análisis de SDS-PAGE reductor y no reductor, análisis de cromatografía por exclusión de tamaño, análisis de PNGasa F / SDS-PAGE, y unión al receptor mediante un ensayo de unión competitiva al receptor de IGF-II. También se controló la actividad enzimática en un experimento de congelación/descongelación.

Determinación de la concentración de proteína

Como se muestra en la Figura 11 y en la Tabla 9, las concentraciones de proteína de todas las muestras fueron estables a lo largo de los 92 días del transcurso del estudio. La concentración de proteína de la muestra se determinó por medición A_{280} utilizando un coeficiente de extensión de $1,59 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$.

Tabla 9. Medición ejemplar de la concentración de proteína de la muestra por espectrometría A_{280}

Muestra	Concentración (mg/ml)				
	Tiempo (Días)				
	0	1	7	28	92
GMP1 4C	4,67	4,40	4,60	4,55	4,69
GMP1 RT		4,41			
GMP1 -80C	4,53	4,40	4,63	4,56	4,59
B18-10 4C		12,89	13,06	12,49	13,17
B18-10 TA		12,96			
B18-10 -80C	13,17	12,86	12,97	12,59	12,73

Actividad enzimática de AGA

Como se muestra en la Figura 12 y en la Tabla 10, que muestran resultados de los análisis de la actividad enzimática de PNP de AGA, las muestras fueron estables a lo largo de los 92 días del transcurso del estudio. Definición de unidad: enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de para-nitrofenol alfa-glucósido (Sigma n.º N1377) en una hora a 37 °C en una reacción que contiene sustrato 10 mM y acetato de sodio 100 mM pH 4,2. Las reacciones de 50 µl se detuvieron con 300 µl de carbonato de sodio 100 mM. Se detectó el sustrato hidrolizado a 405 nm y se comparó con una curva estándar de p-nitrofenol (Sigma n.º N7660). Para producir la actividad enzimática específica las unidades de PNP se dividieron por las concentraciones de proteína mostradas en la Tabla 9.

Tabla 10. Medición ejemplar de la actividad enzimática de AGA por ensayo de PNP.

Muestra	Actividad específica (Unidades PNP/mg)				
	Tiempo (Días)				
	0*	1	7	28	92
GMP1 4C	236,302	213,423	227,939	254,534	244,283
GMP1 RT	236,302	211,455			
GMP1 -80C	236,302	203,854	223,022	246,870	242,376
B18-10 4C	210,944	198,675	211,125	225,980	210,565
B18-10 TA	210,944	220,106			
B18-10 -80C	210,944	192,210	223,491	225,452	232,963

Como se describe anteriormente, se controló la actividad enzimática de AGA en muestras de congelación/descongelación. La actividad de AGA de ZC-701 GMP1 se midió mediante ensayo de PNP en las muestras que se sometieron a hasta 5 ciclos de congelación instantánea en nitrógeno líquido, seguido de descongelación en agua a temperatura ambiente. Como se muestra en la Figura 13, el compuesto es resistente a 5 congelaciones/descongelaciones.

Análisis de SDS-PAGE

Como se muestra en la Figura 14, las muestras de ZC-701-GMP1 almacenadas a 4 °C y a -80 °C fueron prácticamente indistinguibles mediante SDS-PAGE a lo largo del transcurso de 92 días. Las muestras de ZC-701-B18-10 a -80 °C también fueron estables, sin embargo las muestras a 4 °C presentaron a lo largo del tiempo un aumento del multímero de alto peso molecular de ZC-701.

Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño

Como se muestra en la Figura 15 y en la Tabla 11, el análisis por SEC (sigla del inglés *size exclusion chromatography*, cromatografía por exclusión por tamaño) mostró que la fracción del compuesto ZC-701 presente como forma monomérica fue constante durante el estudio con la excepción de ZC-701-B18-10 incubada a 4 °C. A lo largo del transcurso de tres meses, aproximadamente el 25 % de esta muestra se convirtió en la forma multimérica de alto peso molecular. El porcentaje de ZC-701 presente como una forma monomérica se determinó cargando 33 µg de ZC-701 en solución salina tamponada con fosfato pH 6,2 a temperatura ambiente a 0,25 ml/min en una columna TSKgel G2000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm y una columna TSKgel G3000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm

conectadas en serie. El nivel de multimerización se define como la fracción % que es más grande que el monómero ZC-701.

Tabla 11. Las muestras de estabilidad se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica

% de monómero mediante SEC					
	Tiempo (días)				
Muestra	0	1	7	28	92
GMP1 4C	>99	>99	>99	>99	>99
GMP1 TA		>99			
GMP1 -80C	>99	99,0	>99	>99	>99
B18-10 4C	>99	>99	91,7	96,0	74,3
B18-10 TA		98,41			
B18-10 -80C		>99	98,7	>99	>99

5 *Análisis de PNGasa F / SDS-PAGE*

Normalmente, aproximadamente el 20-30 % de las moléculas de ZC-701 se escinden mediante furina durante la producción en cultivo tisular. La enzima furina escinde el esqueleto polipeptídico de la molécula de ZC-701, pero las dos porciones resultantes de la proteína permanecen asociadas a través de uniones disulfuro, manteniendo la funcionalidad de la proteína. Los métodos de análisis por PNGasa F /SDS-PAGE pueden resolver y cuantificar las siguientes tres especies de proteína: Intacta: moléculas de ZC-701 que la furina no ha escindido; Escindida: moléculas de ZC-701 con un esqueleto que ha escindido la furina, pero que conservan ambas porciones de la molécula escindida a través de uniones disulfuro, y también conservan funcionalidad completa; y Truncada: moléculas de ZC-701 que ha escindido la furina y han perdido la proteína N terminal de la molécula. En general la proteína truncada no es funcional.

Para el tratamiento de PNGasa F, se diluyeron 2 µg de la proteína de muestra en tampón PNGasa 1X (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, SDS al 0,1 %) y se desnaturalizaron a 95 °C durante cinco minutos. Se añadió Triton X-100 al 0,75 % seguido de 1 µl de PNGasa F (New England Biolabs n.º P0704). Las muestras se incubaron a 37 °C durante una noche. Después, las mezclas se separaron por SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 4-12 % (Bio-Rad) a 200 voltios durante 120 minutos en presencia o ausencia de DTT 100 mM. Los geles se trataron con tinción de Imperial Blue, como describía el fabricante (Pierce). La cantidad de cada una de las especies de proteína se cuantificó utilizando el programa informático UN-SCAN-IT (Silk Scientific).

Los resultados del análisis de PNGasa F / SDS-PAGE sobre las muestras de estabilidad se muestran en la Figura 16. Las cantidades de las especies proteicas intacta y escindida permanecen relativamente constantes para todas las muestras. A lo largo del estudio de tres meses la cantidad de ZC-701 inactiva truncada es insignificante.

30 *Análisis de unión competitiva al receptor de IGF-II*

La afinidad de las muestras de ZC-701 por el receptor de IGF-II (IGF-IIR) se examinó en experimentos de unión competitiva realizados en un formato de placa de 96 pocillos. Se recubrió IGF-IIR en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6) a una concentración de 0,5 µg/pocillo, a temperatura ambiente durante una noche en placas blancas Reacti-bind (Pierce, n.º de cat. 437111). Las placas se lavaron con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato más Tween-20 al 0,05 %), después se bloquearon durante 1 hora en tampón de bloqueo Super (Pierce, n.º de cat. 37516). Después de otro lavado de la placa, se añadió a los pocillos ligando IGF-II biotinilado (Cell Sciences) 8 nM. Junto con el ligando IGF-II biotinilado, los pocillos también contenían diluciones en serie de las muestras de proteína ZC-701 o ligando IGF-II no biotinilado, para actuar como inhibidores de unión para el ligando IGF-II biotinilado. Después de una incubación de dos horas con balanceo, las placas se lavaron e IGF-II biotinilada unida se detectó con una incubación de estreptavidina-HRP (R&D, n.º de cat. 890803, dilución 1:200 en tampón de bloqueo, 30 minutos), seguida de una incubación con sustrato quimioluminiscente Super Elisa Pico (Pierce, n.º de cat. 37070, 5 minutos). La señal quimioluminiscente se midió a 425 nm, y se calcularon para cada muestra los valores de la Cl_{50} .

La Tabla 12 muestra los valores de las Cl_{50} para las muestras de estabilidad en el ensayo de unión competitiva de IGF-II. Las variaciones diarias del ensayo son evidentes a partir de los valores de la muestra de control de IGF-II no biotinilada. No se observó para las muestras un aumento general de los valores de la Cl_{50} , lo que indica que las muestras conservaron la actividad de unión al receptor IGF-II.

Tabla 12. Determinación de los valores de las CI_{50} para las muestras de estabilidad mediante un ensayo de unión competitiva al receptor de IGF-II

% de monómero mediante SEC					
	Tiempo (días)				
Muestra	0	1	7	28	92
GMP1 4C	>99	>99	>99	>99	>99
GMP1 TA		>99			
GMP1 -80C	>99	99,0	>99	>99	>99
B18-10 4C	>99	>99	91,7	96,0	74,3
B18-10 TA		98,41			
B18-10-80C		>99	98,7	>99	>99

Tomados juntos, estos datos demuestran que ZC-701-GMP1 reconstituida en tampón de formulación en una concentración de 4,5 mg/ml, es estable en solución a 4 °C y a -80 °C durante por lo menos 92 días. ZC-701-GMP1 es también estable durante 24 horas a temperatura ambiente. ZC-701-B18-10 en PBS pH 6,2 también fue estable excepto por un aumento en la multimerización del compuesto, que se produjo a 4 °C. En tres meses a 4 °C, la cantidad de multímero de ZC-701-B18-10 aumentó desde <1 % hasta por encima del 25 %. Por el contrario, la cantidad de ZC-701-GMP1 multimérica se mantuvo a <1 % durante el estudio completo. Esto demuestra que el tampón de formulación actual proporciona estabilidad del compuesto mejorada en comparación con PBS pH 6,2.

Ejemplo 4. La estabilidad de ZC-701 en solución salina

La estabilidad de ZC-701 en solución salina se midió en condiciones que imitaban la preparación del compuesto para la infusión del paciente. Se añadieron 6,8 ml de agua a un vial de ZC-701-GMP1 liofilizada (Vial 3, n.º de Lot. 1-FIN-0692, formulada en citrato 50 mM, pH 6,0, manitol al 4 %, trehalosa al 1 %, y pluronic F-68 al 0,1 %). La concentración de proteína del material de ZC-701 reconstituido se determinó que era de 4,7 mg/ml mediante medición A_{280} (coeficiente de extinción = $1,59 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$). El material se diluyó a 2 mg/ml o a 4 mg/ml a temperatura ambiente en solución salina al 0,9 % (NaCl 9 g/l en agua), después se incubó a temperatura ambiente (~21 °C) durante hasta 24 horas. Al final de los puntos de tiempo 0, 1, 2, 4, 8, 21 y 24 horas, las alícuotas se retiraron y se almacenaron en hielo. El análisis incluyó la determinación de la concentración de proteína mediante espectrometría A_{280} , ensayo enzimático de PNP de AGA, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y SDS-PAGE.

Determinación de la concentración de proteína

Se centrifugaron alícuotas de cada punto de tiempo a 4 °C a 15.000 g, durante un minuto y se examinó la presencia de precipitado de forma visual. No se observó precipitación de la muestra en ningún momento durante el estudio. La concentración de proteína de muestra se determinó por medición de A_{280} utilizando un coeficiente de extinción de $1,59 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$ (Figura 17). La concentración de proteína fue estable a lo largo del transcurso de 24 horas.

Actividad enzimática de AGA

Los ensayos enzimáticos de PNP de AGA se realizaron sobre todas las muestras de los puntos de tiempo (Figura 18). Para los fines de este ensayo, una (1) unidad enzimática se define como la enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de para-nitrofenol alfa-glucósido (Sigma n.º N1377) en una hora a 37 °C, en una reacción que contiene sustrato 10 mM y acetato de sodio 100 mM pH 4,2. Las reacciones de 50 µl se detuvieron con 300 µl de carbonato de sodio 100 mM. El sustrato hidrolizado se detectó a 405 nm y se comparó con una curva estándar de p-nitrofenol (Sigma n.º N7660). Como se muestra en la Figura 18, la actividad enzimática de ZC-701 diluida en solución salina fue estable a lo largo del transcurso de 24 horas.

Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño

También se analizaron las muestras de los puntos de tiempo 0, 2, 4 y 21 horas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Tabla 13). Brevemente, el porcentaje de ZC-701 presente en una forma monomérica se determinó cargando 33 µg de ZC-701 en solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 a temperatura ambiente, a 0,2 ml/min en una columna TSKgel G2000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm y una columna TSKgel G3000 SW_{XL} de 30 cm x 7,8 mm conectadas en serie. El nivel de multimerización se definió como el % de fracción más grande que el monómero de ZC-701. Como se muestra de la Tabla 11, los niveles de monómero de las muestras fueron estables a lo largo del transcurso de 21 horas.

Tabla 13. Análisis por SEC de ZC-701 diluida en solución salina

	ZC-701 2 mg/ml		ZC-701 4 mg/ml	
Tiempo (Horas)	% de multímero	% de monómero	% de multímero	% de monómero
0	< 1,0	> 99	< 1,0	> 99
2	< 1,0	> 99	< 1,0	> 99
4	< 1,0	> 99	< 1,0	> 99
21	< 1,0	> 99	< 1,0	> 99

Análisis por SDS-PAGE

5 Se analizaron las muestras de los puntos de tiempo 0, 8, 21 y 24 horas mediante SDS-PAGE reductor y no reductor (Figura 19). Las muestras diluidas en solución salina para hasta 24 horas fueron indistinguibles de las muestras de control.

10 Los experimentos anteriores muestran que ZC-701 formulada a aproximadamente 5 mg/ml en citrato 50 mM, pH 6,0, manitol al 4 %, trehalosa al 1 %, y Pluronic® F-68 al 0,1 % produce un compuesto que es estable durante hasta 24 horas cuando se diluye en solución salina a concentraciones de 2 mg/ml o de 4 mg/ml. Esta dilución en solución salina mimetiza las condiciones adecuadas para la preparación de ZC-701 para la infusión del paciente.

15 Ejemplo 5. Datos analíticos para la formulación de ZC-701

Después del almacenamiento durante 12 meses a 2-8 °C, se analizó ZC-701 (n.º lot. 1-FIN-0692) liofilizada del tampón de formulación (citrato 50 mM, manitol al 4 %, trehalosa al 1 % y Pluronic® F-68 al 0,1 %, pH 6,0). Como se muestra a continuación en la Tabla 14, los productos se analizaron a base de su aspecto, disolución, pH, contenido de humedad, pureza, potencia, y fuerza. Los atributos del producto para el almacenamiento a 2-8 °C estaban dentro de un intervalo aceptable y fueron similares a los atributos del producto en el momento de su producción.

Tabla 14. Sumario de los datos analíticos de ZC-701 ejemplares

Prueba	Criterio de aceptación	Tiempo cero; producción	12 meses; 2-8 °C
Aspecto, liofilizado	Polvo blanco a blanquecino	Polvo blanco	Polvo blanco
Aspecto después de la disolución	Solución clara, incolora, sin partículas visibles	Solución clara, incolora, sin partículas visibles	Solución clara, incolora, sin partículas visibles
Tiempo de disolución	Tiempo informado para la disolución total de la torta	1 min; 32 s	2 min; 20 s
pH	Resultado informado	6,1	6,04
Humedad (KF)	Resultado informado	0,66 %	0,87 %
Fuerza 280 nm	± el 10 % de la cantidad objetivo	33,4 mg/vial	32,7 mg/vial
SDS-PAGE, reducido	> 95 % pura	100 %	96,7 %
SDS-PAGE, no reducido	Resultado informado	Intacto: 95,8 %	Intacto: 96,4 %
SEC-HPLC	> 95 % pura	96,4 %	96,2 %
Actividad de AGA	150.000-300.000 nmoles PNP/h/mg	217.631,55 nmoles de PNP/h/mg	243.947 nmoles de PNP/h/mg
Ensayo de unión a receptor	< 75 nM	Cl ₅₀ = 33,4 nM	Cl ₅₀ =23,9 nM

Equivalentes

En los artículos de las reivindicaciones tales como “un”, “una”, y “el/la/los/las”, pueden significar uno o más que uno a menos que se indique otra cosa o sea evidente otra cosa a partir del contexto. Las reivindicaciones o las descripciones que incluyan “o” entre uno o más miembros de un grupo, se consideraran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, son empleados en, o son de otra forma relevantes para un

producto o procedimiento dado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente otra cosa a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o de otra forma es relevante para un producto o procedimiento dado. La invención también incluyen realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra forma son relevantes para un producto o procedimiento dado. Además, debe comprenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones, y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones o de las partes relevantes de la descripción se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que es dependiente de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que sea dependiente de la misma reivindicación de base. Además, cuando las reivindicaciones detallan una composición, debe comprenderse que se incluyen los métodos de uso de la composición para cualquiera de los fines divulgados en el presente documento, y están incluidos los métodos para preparar la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos de preparación divulgados en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica, a menos que se indique otra cosa o que fuese evidente para un experto en la materia que pueda presentarse una contradicción o inconsistencia.

En donde los elementos se presenten como listados, por ejemplo, en el formato de grupo Markush, debe comprenderse que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento se puede eliminar del grupo. Debe también indicarse que la expresión "que comprende" pretende ser abierta y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales. Debería comprenderse que, en general, en donde la invención, o aspectos de la invención, hagan referencia como que comprenden elementos, características, etapas, etc. particulares, determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etapas, etc. Para fines de simplicidad, esas realizaciones no se han indicado de forma específica *in haec verba* en el presente documento. Por lo tanto, para cada realización de la invención que comprenda uno o más elementos, características, etapas, etc., la invención también proporciona realizaciones que consisten o consisten esencialmente en esos elementos, características, etapas, etc.

Cuando se proporcionen intervalos, se incluyen criterios de valoración. Además, debe comprenderse que a menos que se indique otra cosa o que sea evidente otra cosa a partir del contexto y/o de la comprensión de un experto en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico dentro de los intervalos establecidos en las distintas realizaciones de la invención, hasta el décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. También debe comprenderse que a menos que se indique otra cosa o que sea evidente otra cosa a partir del contexto y/o de la comprensión de un experto en la materia, los valores expresados como intervalos pueden asumir cualquier subintervalo dentro del intervalo dado, en el que los criterios de valoración del subintervalo se expresan en el mismo grado de precisión que el décimo de la unidad del límite inferior del intervalo.

Además, debe comprenderse que cualquier realización particular de la presente invención puede excluirse explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Cualquier realización, elemento, característica, aplicación, o aspecto de las composiciones y/o métodos de la invención, se pueden excluir de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Para fines de brevedad, todas las realizaciones en las que uno o más elementos, características, fines, o aspectos se excluyan, no está indicado de forma explícita en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZyStor Therapeutics, Inc. LeBowitz, Jonathan

<120> FORMULACIONES PARA ENZIMAS LISOSOMALES

<130> 2008266-0124 (SYM-020PCT)

<140> NYA

<141> 17-06-2010

<150> 61/187.747

<151> 17-06-2009

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 67

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

5 <210> 2
<211> 947
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia ZC-701

<400> 2

Ala Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg
20 25 30

15

Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala
35 40 45

Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Gly Ala Pro
50 55 60

Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro
65 70 75 80

Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu
85 90 95

Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu
100 105 110

Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr
115 120 125

Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr
130 135 140

Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu
145 150 155 160

Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe
165 170 175

Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr
180 185 190

Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe
195 200 205

Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg
210 215 220

Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe
225 230 235 240

Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala
245 250 255

Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr
260 265 270

Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly
275 280 285

Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly
 290 295 300

Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser
 305 310 315 320

Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile
 325 330 335

Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val
 340 345 350

Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu
 355 360 365

Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu
 370 375 380

Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu
 385 390 395 400

Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe
 405 410 415

Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg
 420 425 430

Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly
 435 440 445

Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr
 450 455 460

Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr
 465 470 475 480

Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp
 485 490 495

Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile
 500 505 510

Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys
 515 520 525

Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly

ES 2 569 514 T3

530		535		540
Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu				
545		550		555
Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile				
		565		570
				575
Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val				
		580		585
				590
Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp				
		595		600
				605
Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro				
		610		615
				620
Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp				
		625		630
				635
Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp				
		645		650
				655
Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu				
		660		665
				670
Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln				
		675		680
				685
Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu				
		690		695
				700
Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg				
		705		710
				715
Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp				
		725		730
				735
His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln				
		740		745
				750
Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr				
		755		760
				765
Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro				
		770		775
				780

Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val
785 790 795 800

Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly
805 810 815

Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg
820 825 830

Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala
835 840 845

Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu
850 855 860

Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile
865 870 875 880

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu
885 890 895

Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
900 905 910

Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys
915 920 925

Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val
930 935 940

Ser Trp Cys
945

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del espaciador

<400> 3

Gly Ala Pro
1

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del espaciador

	<400> 4	
		Gly Gly Gly Gly Gly Pro
		1 5
5	<210> 5 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sitio de escisión de furina	
15	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(3) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
	<400> 5	
		Arg Xaa Xaa Arg
		1
20	<210> 6 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sitio de escisión de furina	
30	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(1) <223> X = Lys o Arg	
35	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(4) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural	
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (5)..(5) <223> X = Lys o Arg	
	<400> 6	
		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
		1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una alfa-glucosidasa ácida (AGA) de ser humano recombinante en una formulación que comprende:

- a) un agente tamponador seleccionado del grupo que consiste en histidina, acetato de sodio, citrato, fosfato, succinato, Tris y combinaciones de los mismos;
- b) una agente estabilizador seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, arginina, sorbitol, manitol, glicina, trehalosa y combinaciones de los mismos;
- c) un modificador de la tonicidad seleccionado del grupo que consiste en glicina, sorbitol, sacarosa, manitol, cloruro de sodio, dextrosa, arginina y combinaciones de los mismos;
- d) un agente formador de volumen seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, manitol, glicina, cloruro de sodio, dextrano, trehalosa y combinaciones de los mismos; y
- e) un poloxámero, en el que el poloxámero es Pluronic® F-68 en una concentración que varía entre el 0,001 % y el 0,2 %, en una concentración del 0,1 % o en una concentración del 0,05 %;

en la que el pH varía desde aproximadamente 4,0 a 7,0.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el agente tamponador está en una concentración que varía entre aproximadamente 25 mM y 50 mM.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que el pH es aproximadamente 6,0.

4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración parenteral.

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición farmacéutica es una mezcla liofilizada.

6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la AGA de ser humano recombinante:

- (a) se produce a partir de células CHO;
- (b) tiene niveles de glucosilación modificados en comparación con la AGA de ser humano de origen natural; o
- (c) contiene manosa-6-fosfatos aumentados en comparación con la AGA de ser humano de origen natural.

7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la AGA de ser humano recombinante es una proteína de fusión que comprende AGA de ser humano recombinante o una variante funcional de la misma y un péptido de dirección lisosómica que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos el 70 % idéntica al IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1), en la que de forma opcional el péptido de dirección lisosómica es una muteína del IGF-II que:

- (a) comprende una mutación dentro de una región que corresponde con los aminoácidos 34-40 de la SEQ ID NO: 1 de forma que la mutación suprime por lo menos un sitio de escisión de la proteasa furina; y/o
- (b) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor del IGF-I con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor del IGF-I; y/o
- (c) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor de insulina.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la AGA de ser humano recombinante está en una formulación que contiene aproximadamente citrato 50 mM, manitol al 4 %, trehalosa al 1 %, y Pluronic® F-68 al 0,1 % a un pH de aproximadamente 6,0.

10. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla liofilizada de una alfa-glucosidasa ácida (AGA) de ser humano recombinante, citrato de sodio, manitol, trehalosa, y Pluronic® F-68.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10, en la que la AGA de ser humano recombinante:

- (a) se produce a partir de células CHO;
- (b) tiene niveles de glucosilación modificados en comparación con la AGA de ser humano de origen natural; o
- (c) contiene manosa-6-fosfatos aumentados en comparación con la AGA de ser humano de origen natural.

- 5 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10, en la que la AGA de ser humano recombinante es una proteína de fusión que comprende AGA de ser humano recombinante o una variante funcional de la misma y un péptido de dirección lisosómica que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos el 70 % idéntica al IGF-II de ser humano maduro (SEQ ID NO: 1), en la que de forma opcional el péptido de dirección lisosómica es una muteína del IGF-II que:
- 10 (a) comprende una mutación dentro de una región que corresponde con los aminoácidos 34-40 de la SEQ ID NO: 1 de forma que la mutación suprime por lo menos un sitio de escisión de la proteasa furina; y/o
(b) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor del IGF-I con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor del IGF-I; y/o
(c) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina con respecto a la afinidad del IGF-II de ser humano de origen natural por el receptor de insulina.
- 15 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2.
14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Pompe.
- 20 15. Uso de la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Figura 1

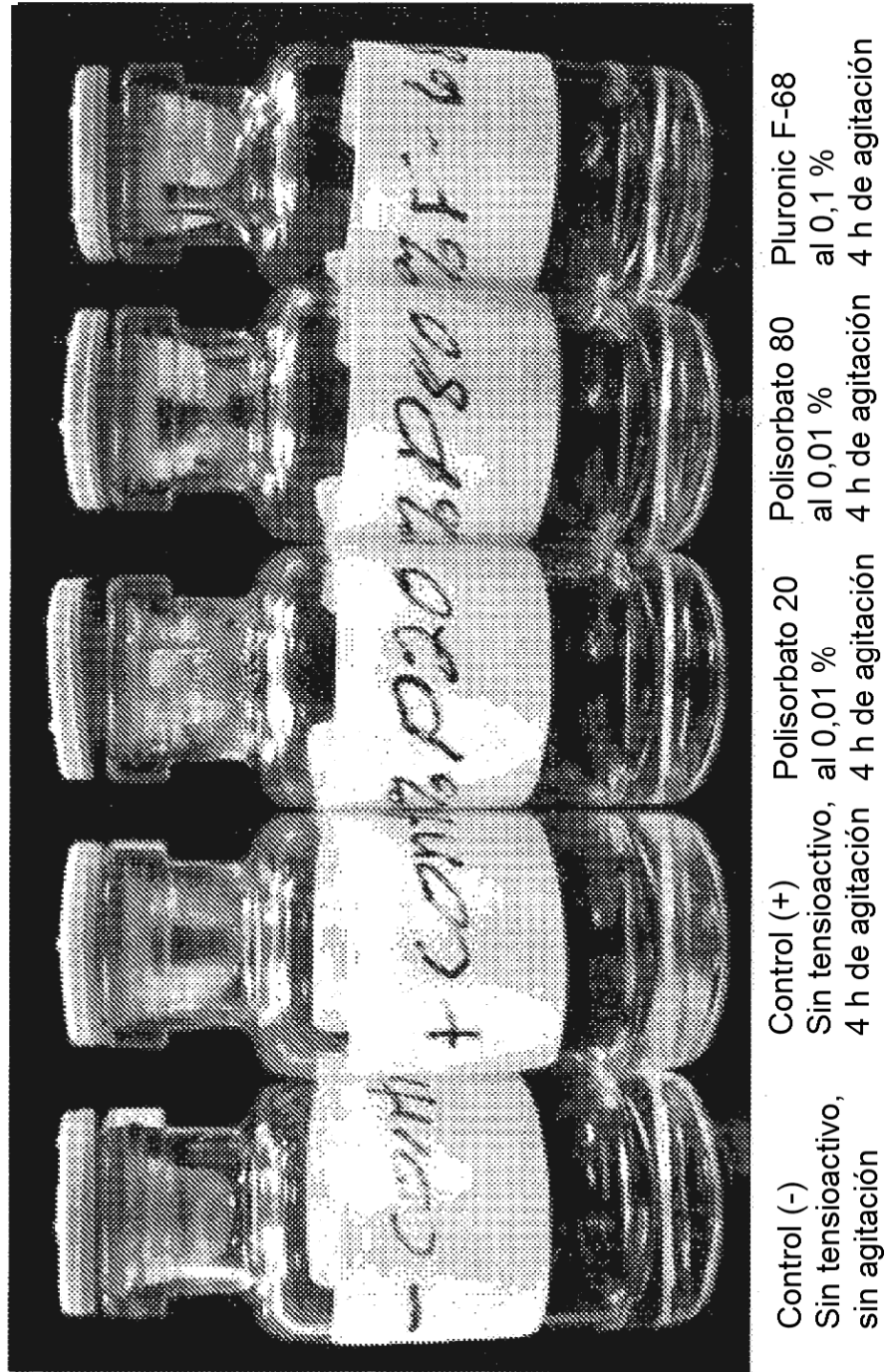
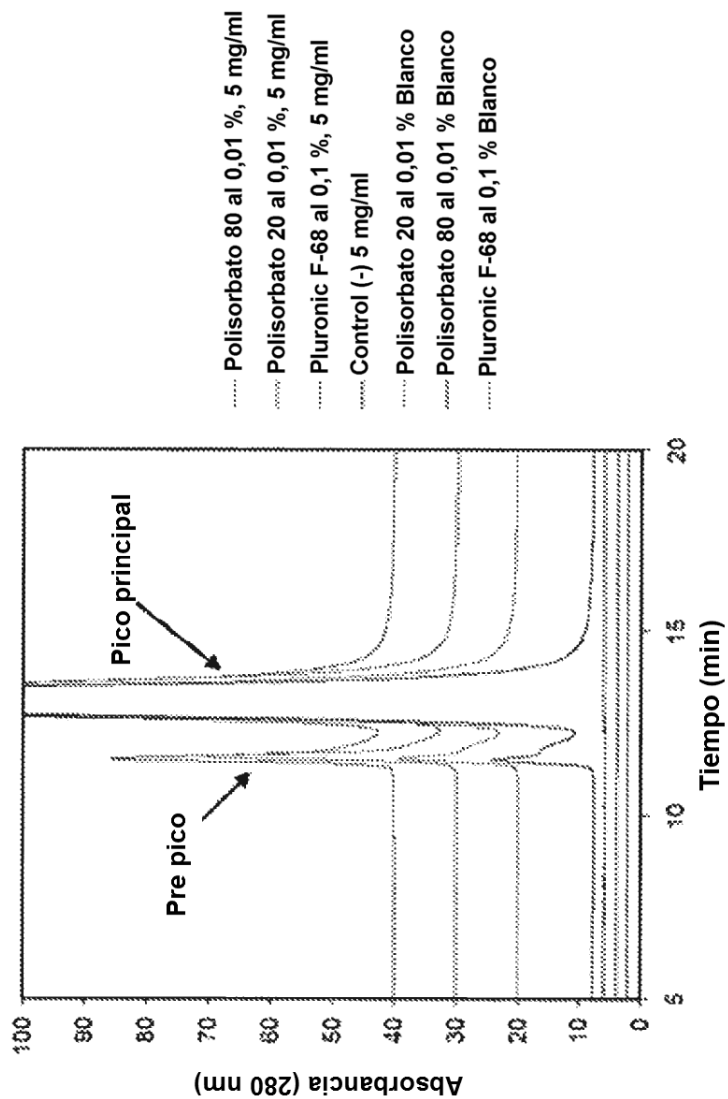
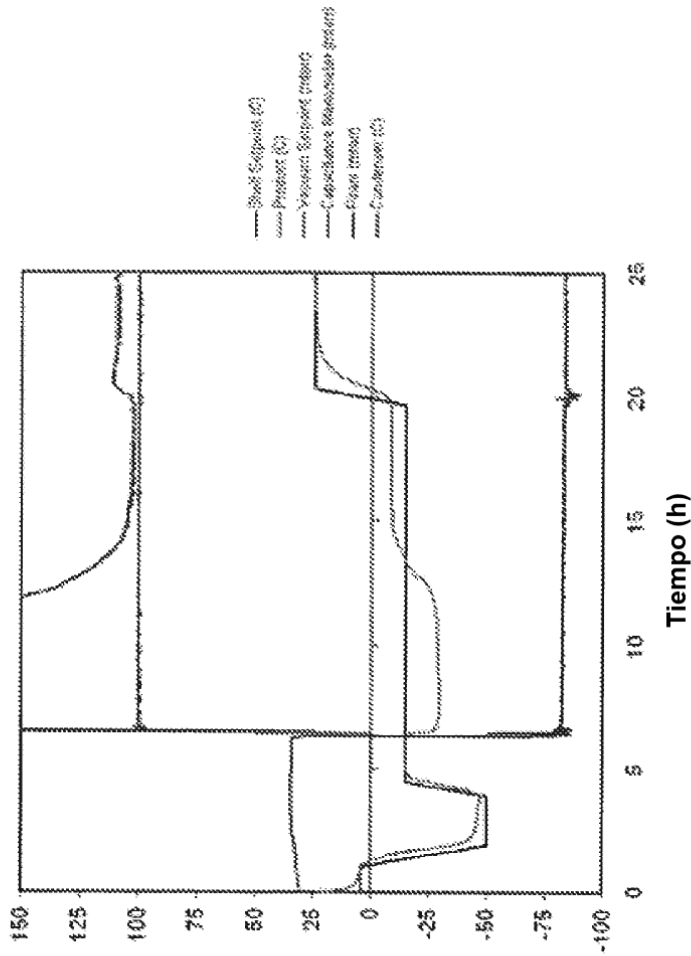


Figura 2



Muestra	% Pre pico	% Pico principal
Control (-)	3,6	96,4
Polisorbato 20 al 0,01 %, 5 mg/ml	6,0	94,0
Polisorbato 80 al 0,01 %, 5 mg/ml	6,4	93,6
Pluronic F-68 al 0,1 %, 5 mg/ml	3,8	96,2

Figura 3



Etapas	Temperatura	Tiempo (hora)	Velocidad de rampa (°C/min)	Presión de cámara
Carga	4 °C	N/E	N/E	N/E
Congelación	4 °C a -50 °C	N/E	1 °C/ minuto	N/E
Sujección	-50 °C	2 horas	N/E	N/E
Atemperación	-50 °C a 15 °C	N/E	N/E	N/E
	-15 °C	2 horas	N/E	N/E
Secado primario	-15 °C	16 horas	N/E	13,30 Pa
	-15 °C a 25 °C	N/E	1 °C/ minuto	13,30 Pa
Secado secundario	25 °C	8 horas	N/E	13,30 Pa

Figura 4

C6GT C6MT PC6MT

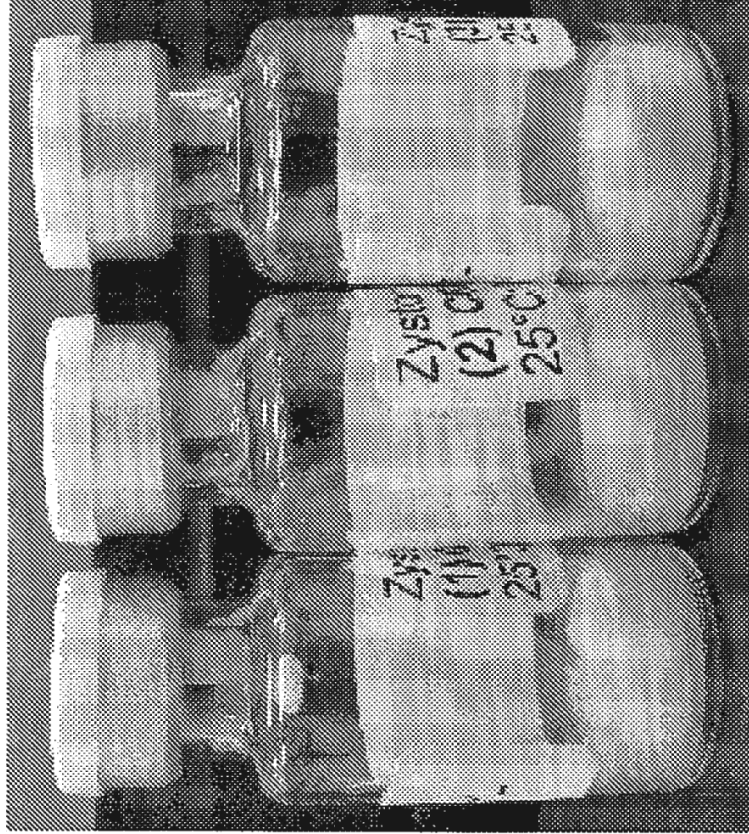


Figura 5

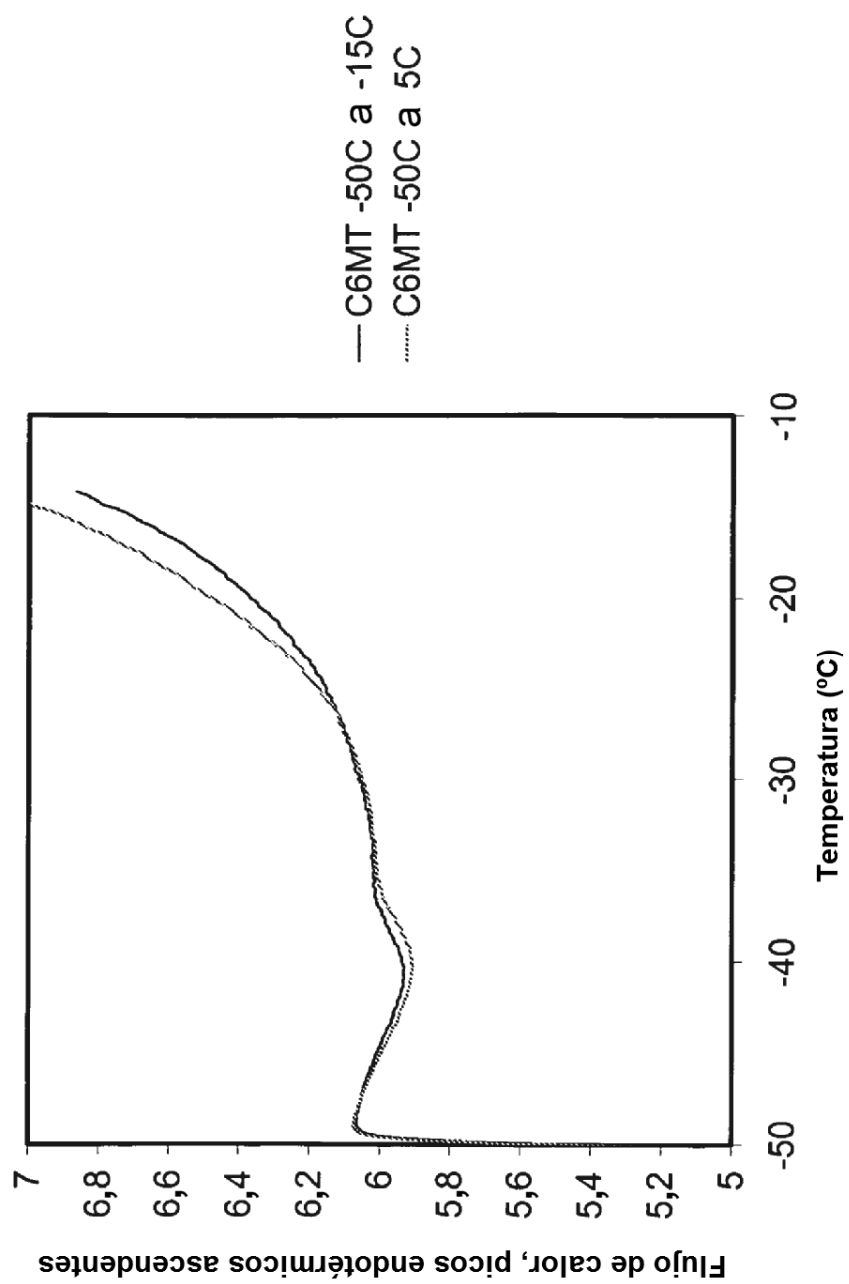


Figura 6

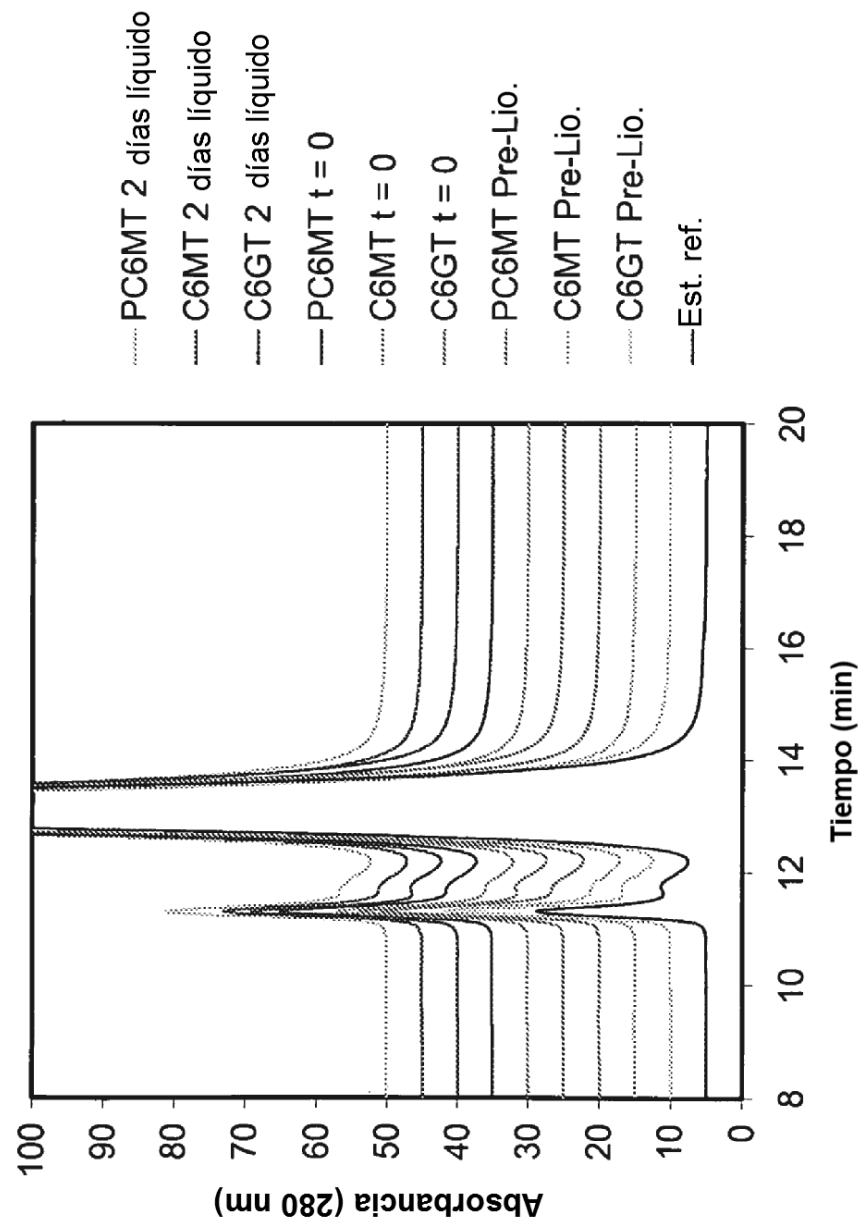


Figura 7

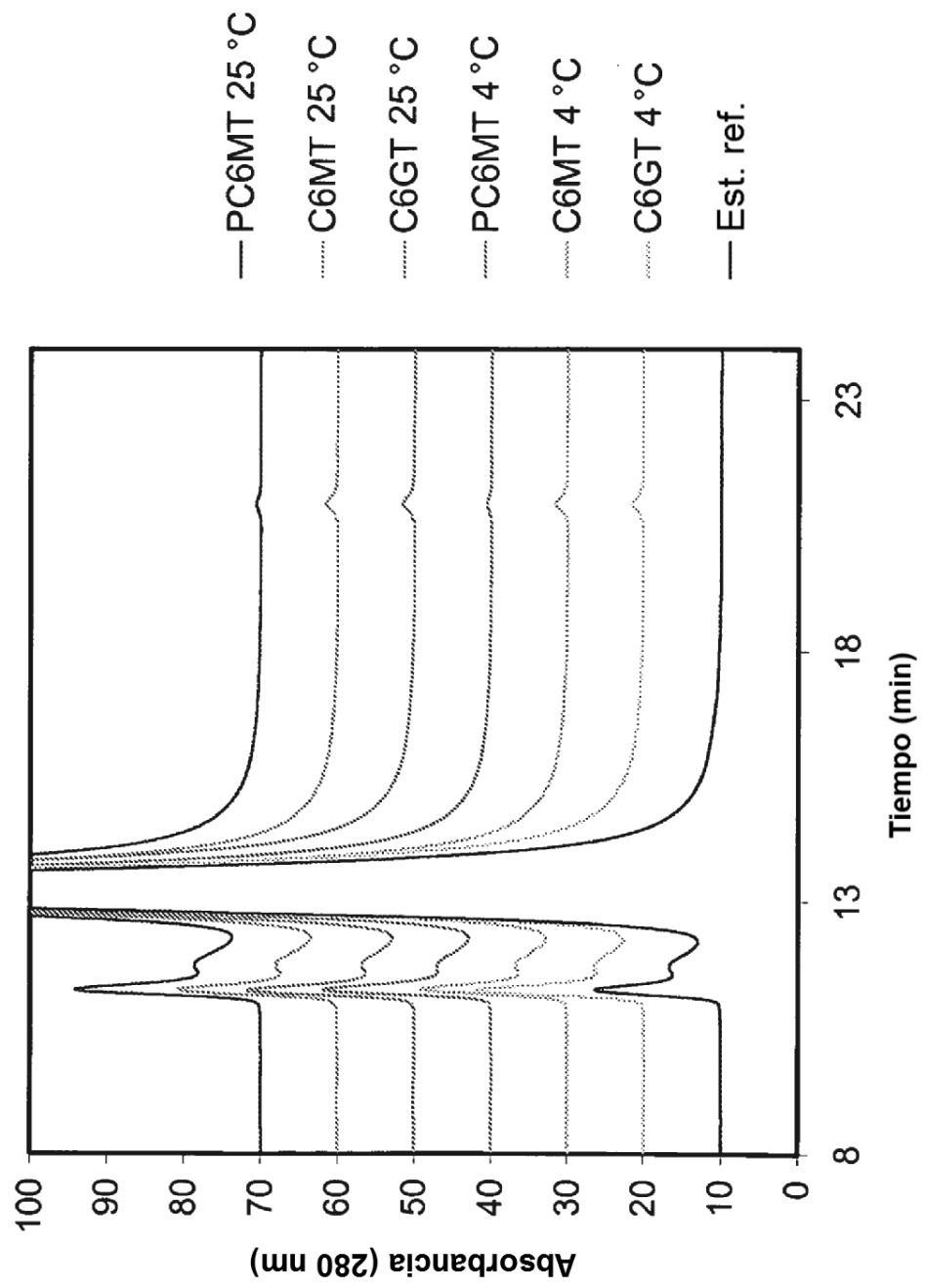
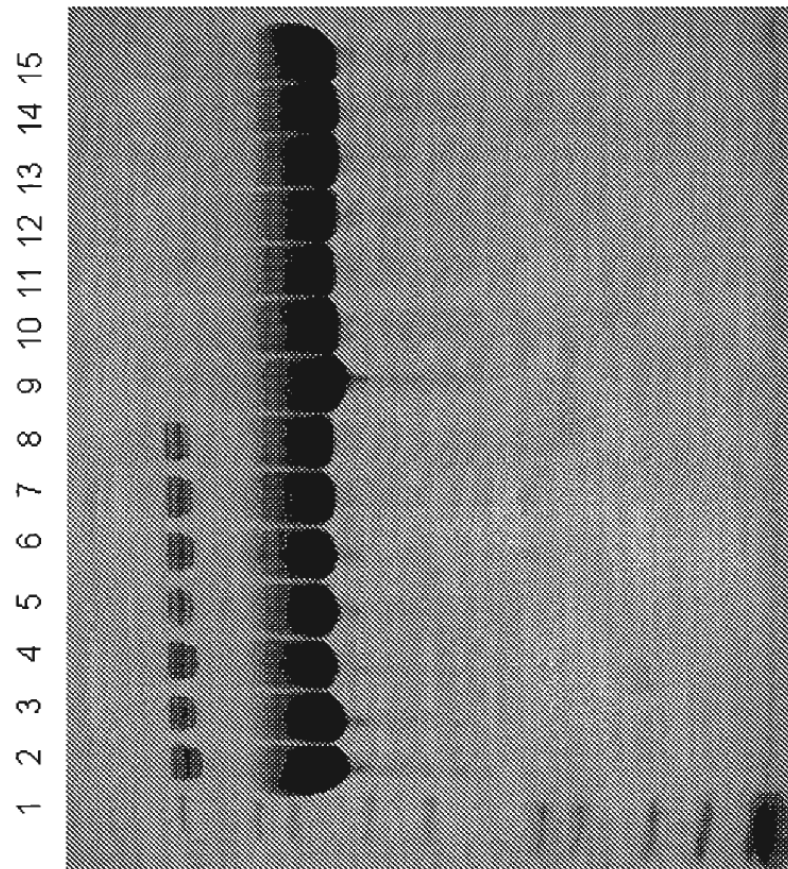


Figura 8



Carril 1:	Estándar Mark12
Carril 2:	Est. ref. NR
Carril 3:	C6GT NR 4 °C
Carril 4:	C6MT NR 4 °C
Carril 5:	PC6MT NR 4 °C
Carril 6:	C6GT NR 25 °C
Carril 7:	C6MT NR 25 °C
Carril 8:	PC6MT NR 25 °C
Carril 9:	Est. ref. R
Carril 10:	C6GT R 4 °C
Carril 11:	C6MT R 4 °C
Carril 12:	PC6MT R 4 °C
Carril 13:	C6GT R 25 °C
Carril 14:	C6MT R 25 °C
Carril 15:	PC6MT R 25 °C

Figura 9

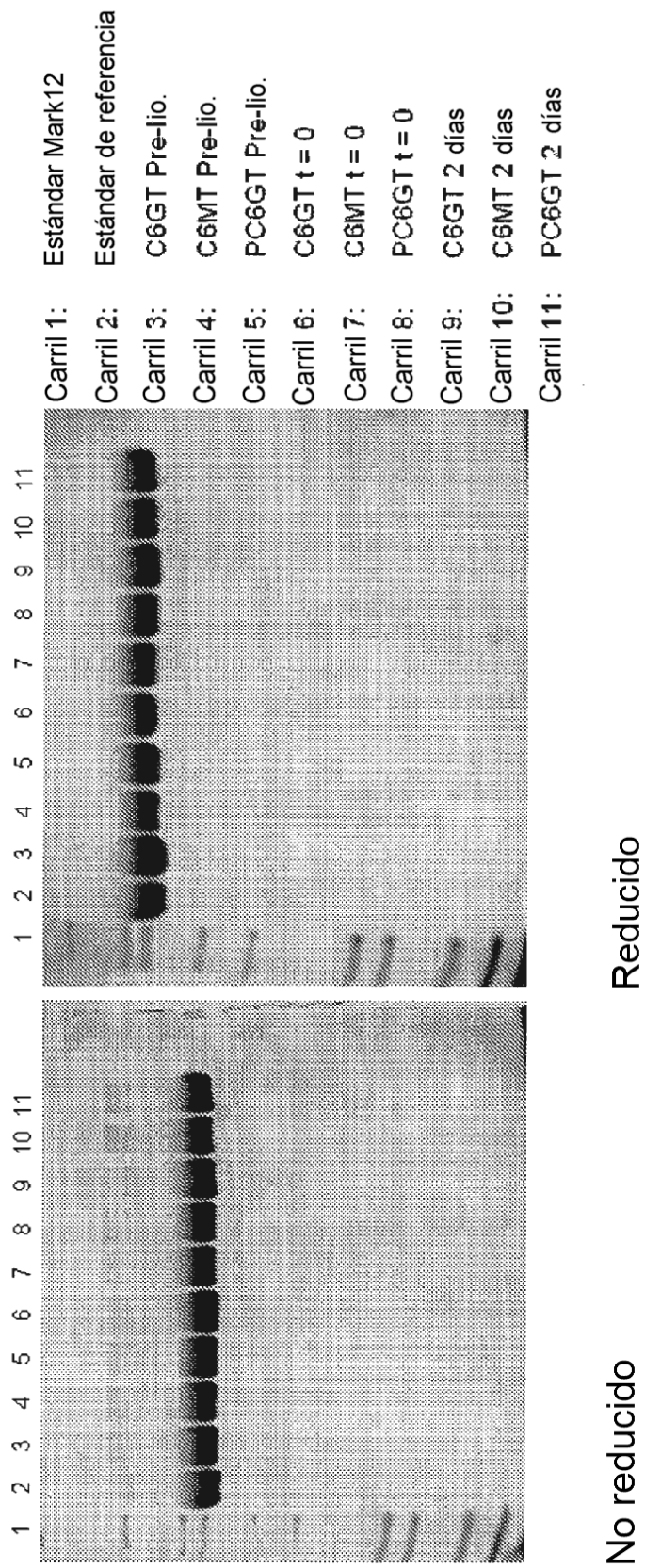
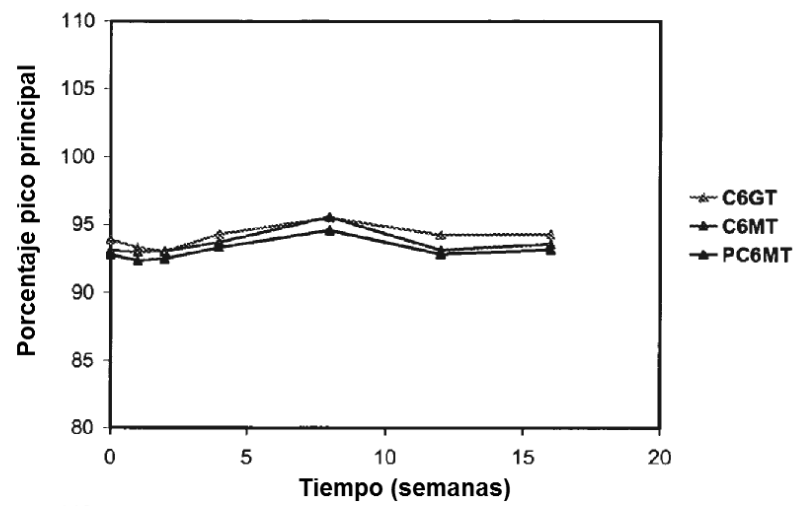
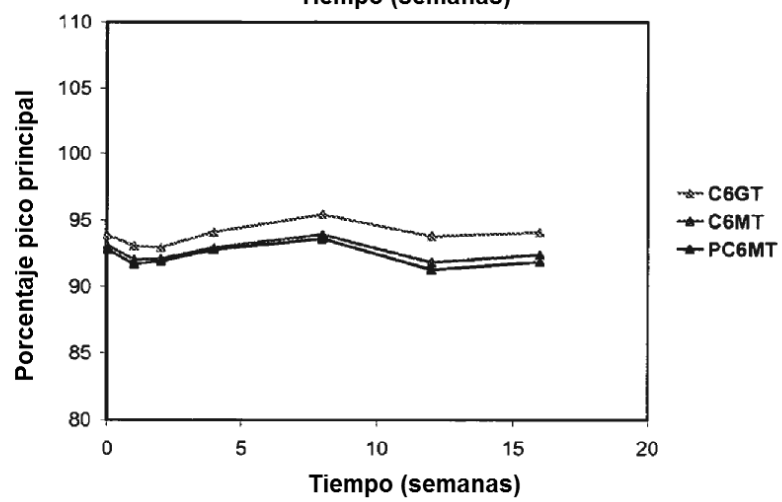


Figura 10

A



B



C

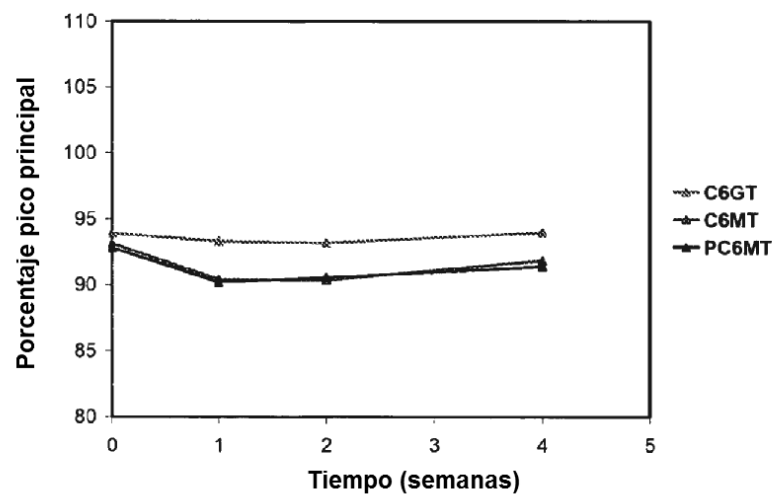


Figura 11

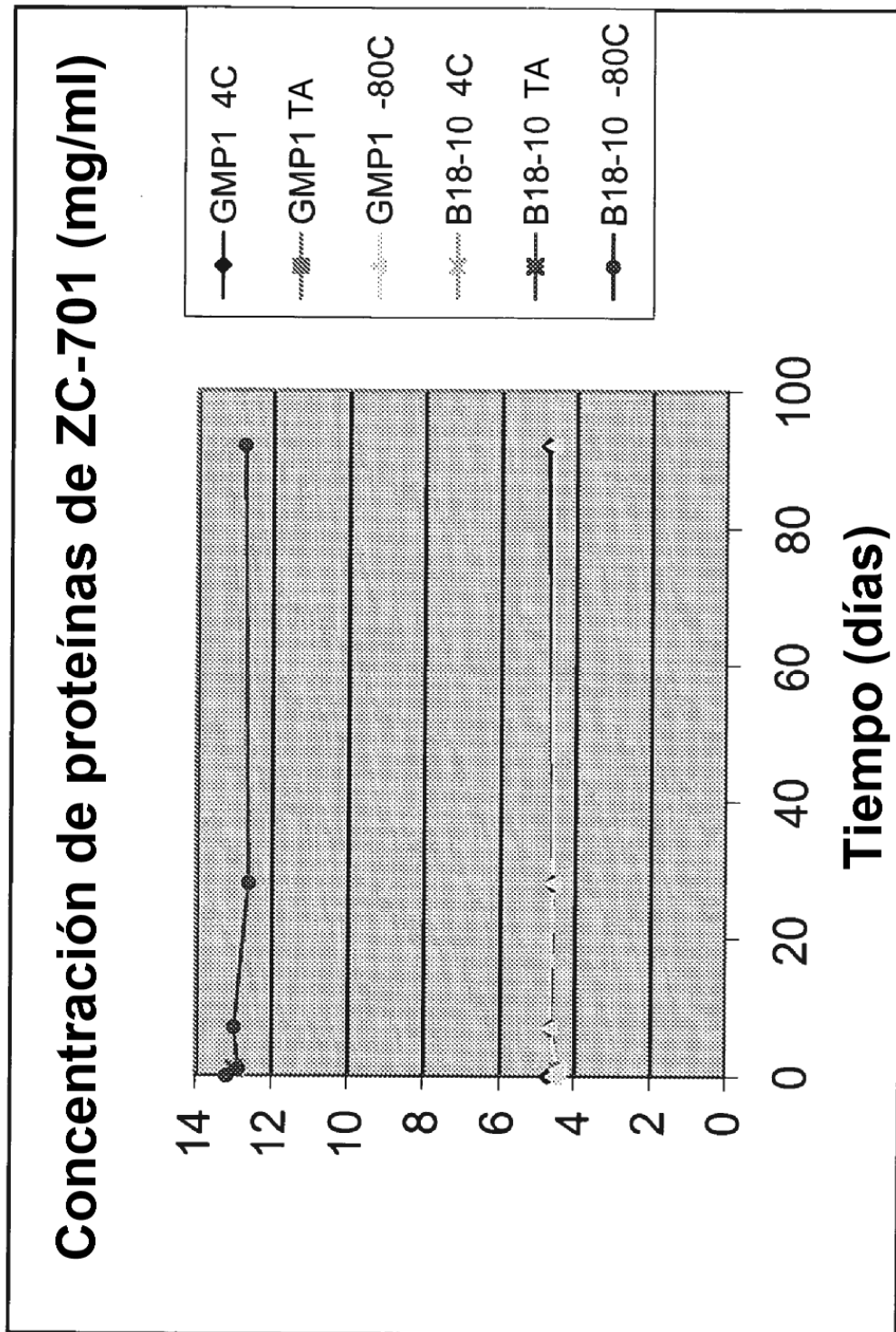


Figura 12

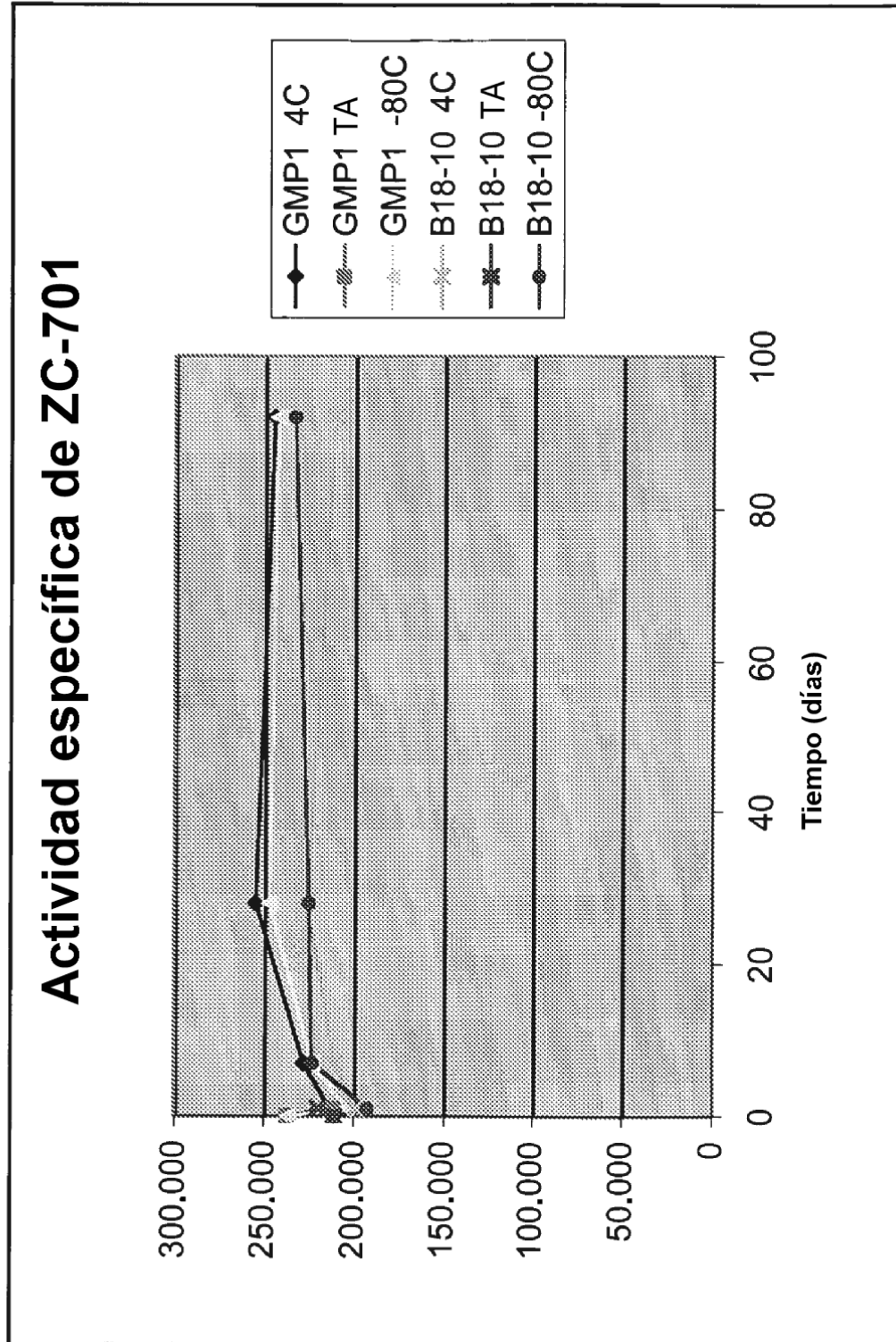


Figura 13

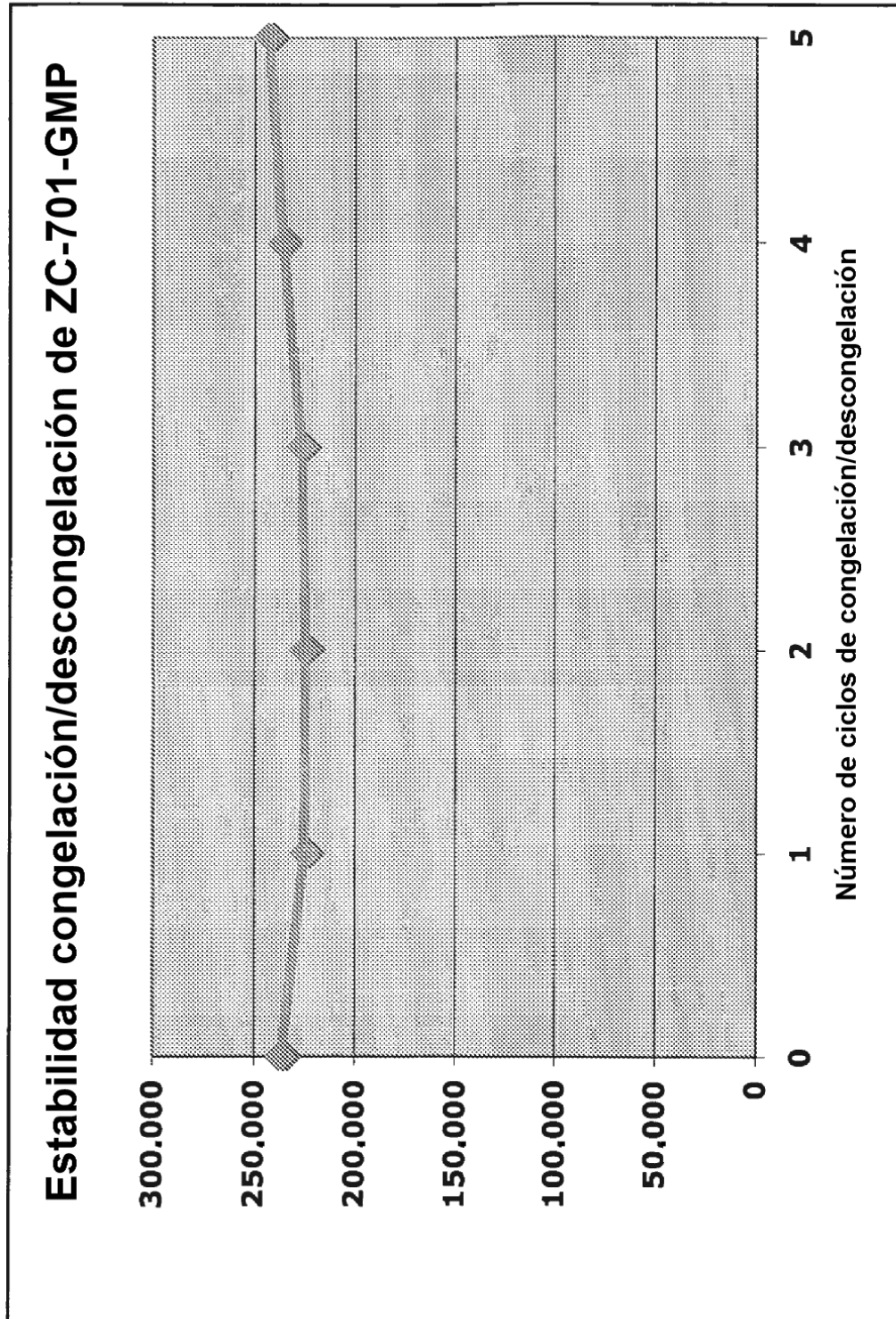


Figura 14

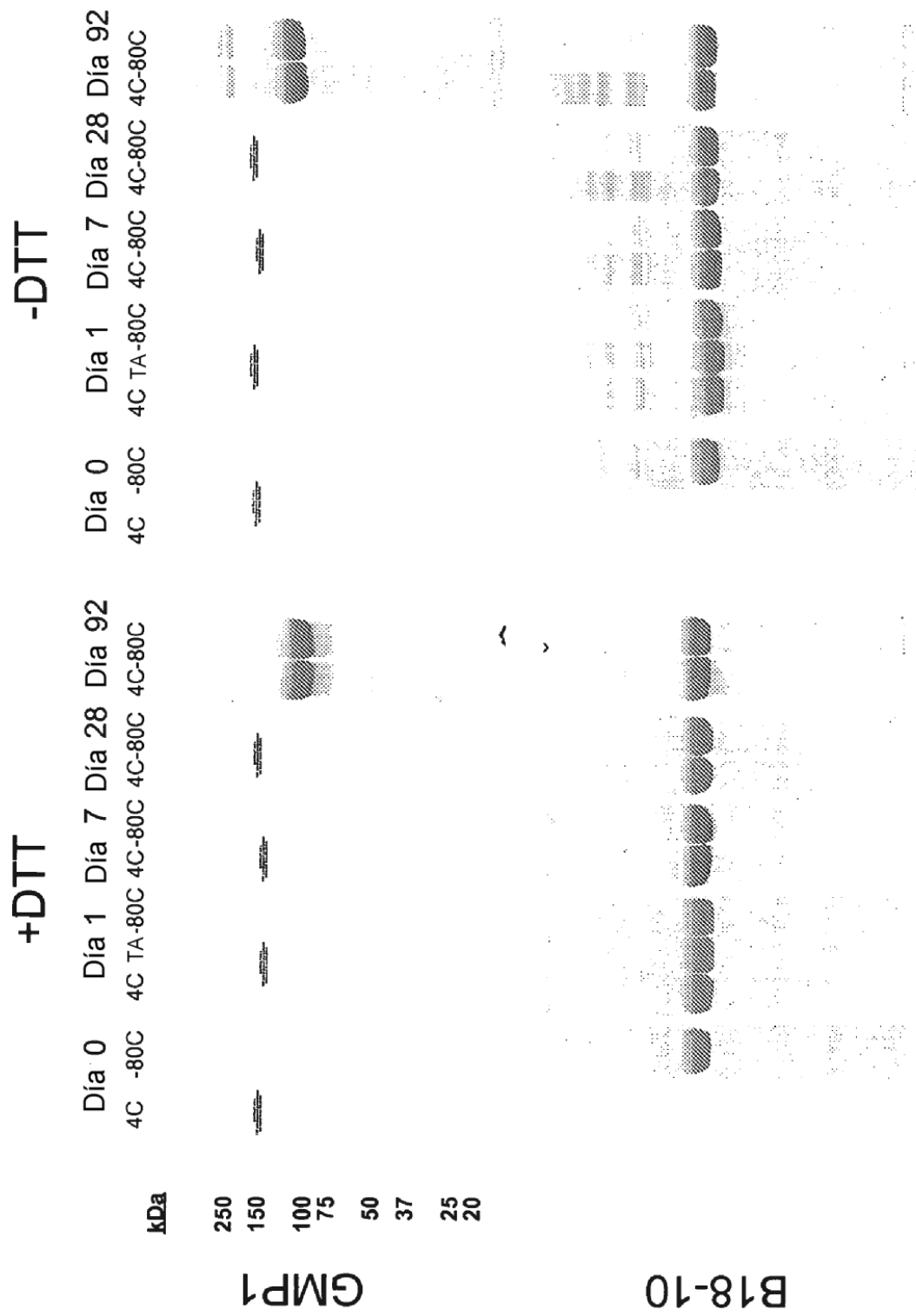


Figura 15

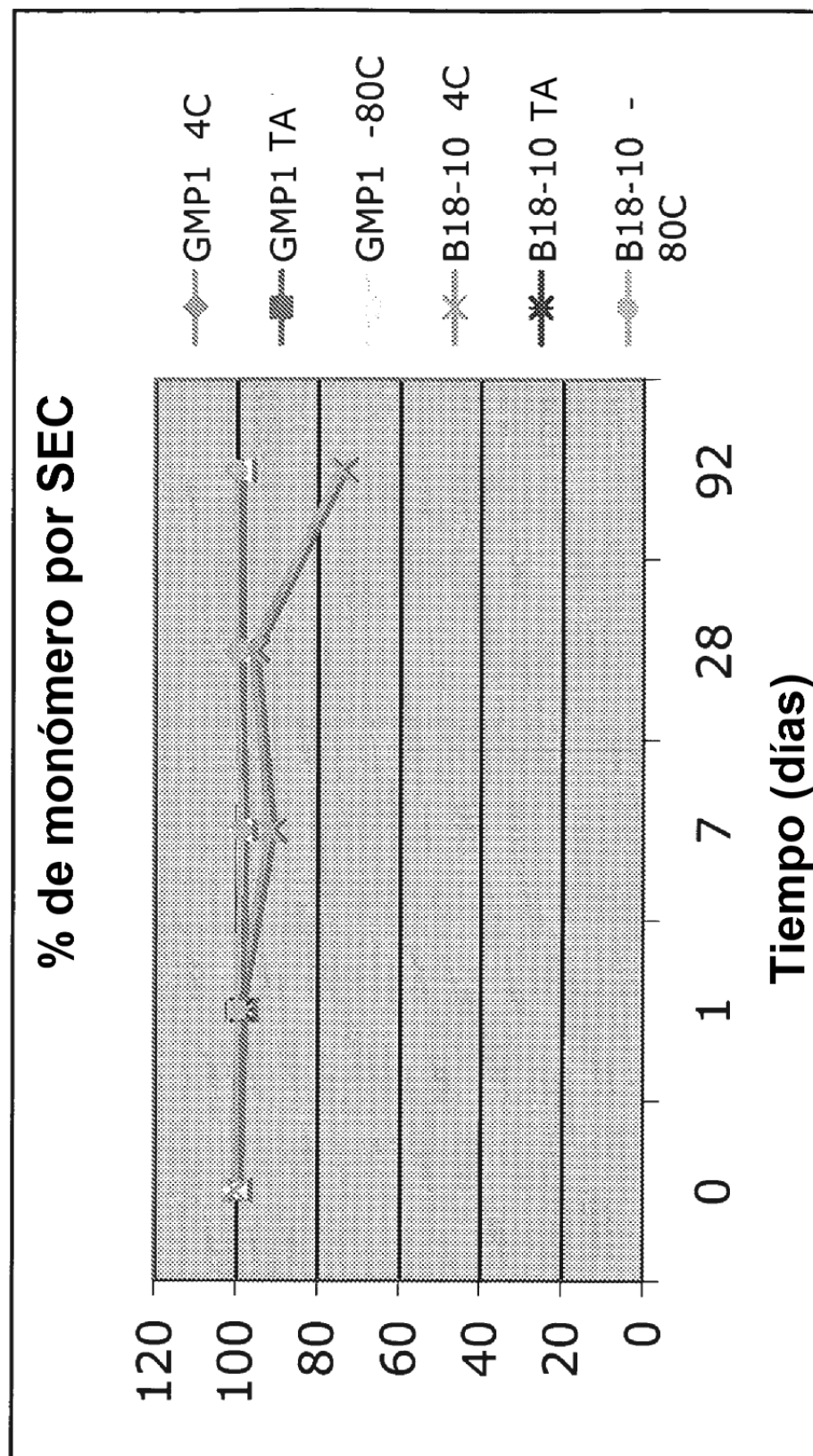


Figura 16

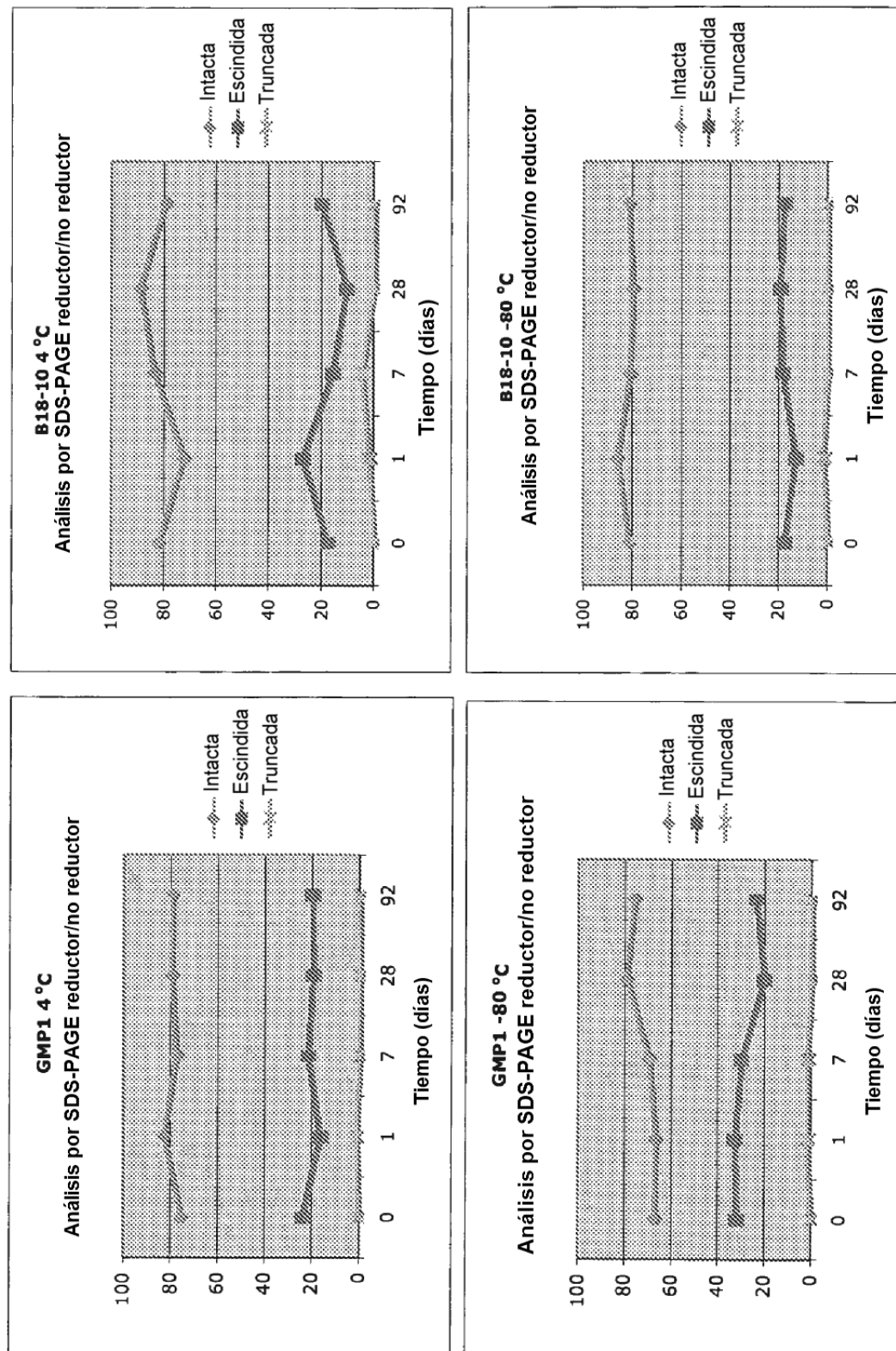


Figura 17

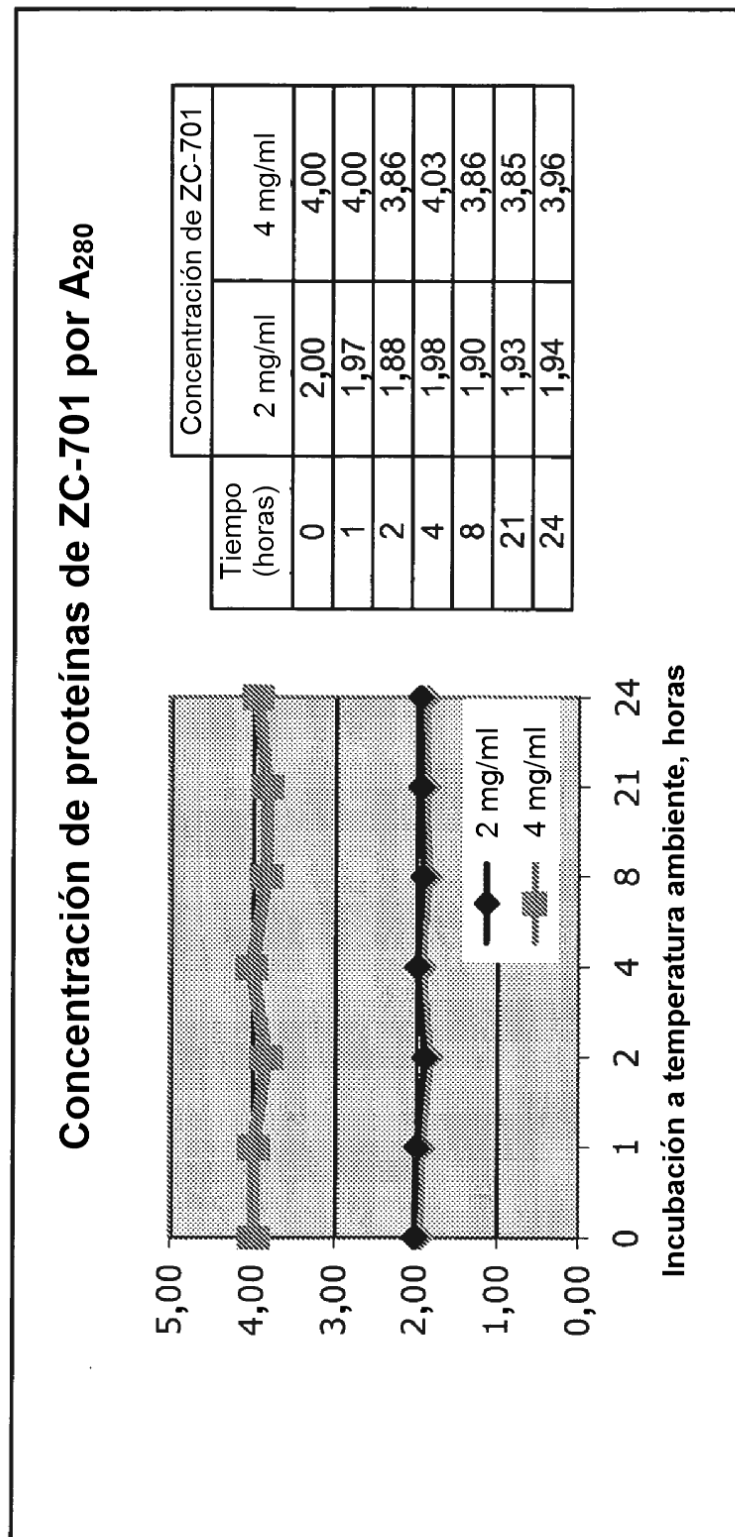
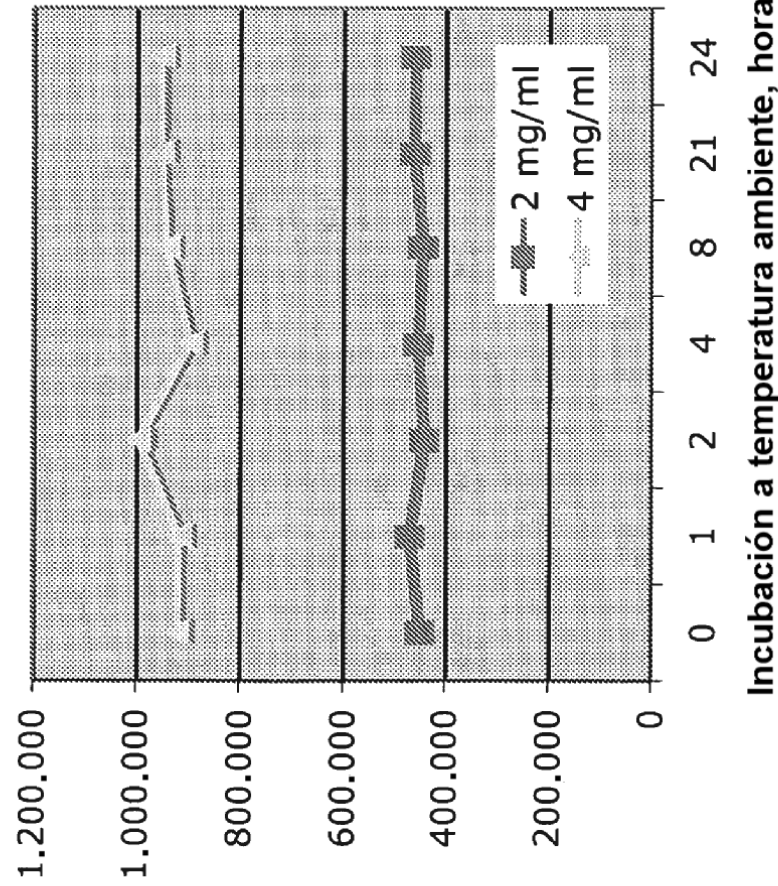


Figura 18

Actividad enzimática de ZC-701 por ensayo de PNP



Tiempo (horas)	Concentración de ZC-101	
	2 mg/ml	4 mg/ml
0	453.052	918.826
1	473.930	914.627
2	444.707	995.306
4	456.621	894.107
8	446.712	939.504
21	463.832	950.253
24	462.478	948.930

Figura 19

