

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 944**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2008 PCT/US2008/081911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09059082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08845718 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2214699**

54 Título: **Procedimiento, composición y artículo de fabricación para proporcionar alfa-1-antitripsina**

30 Prioridad:

02.11.2007 US 984975 P

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

11.05.2017

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons, 79 TW Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**ARORA, VIKRAM;
PAMARTHI, MOHAN y
SCUDERI, PHILIP**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 611 944 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

Procedimiento, composición y artículo de fabricación para proporcionar alfa-1-antitripsina

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a alfa-1-antitripsina (α 1-AT) para su utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno por vía subcutánea.

10 ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

La deficiencia de α 1-AT es un trastorno genético relativamente frecuente que predispone a los individuos afectados a una enfermedad hepática y/o enfisema pulmonar. El tipo más frecuente de deficiencia de α 1-AT denominado inhibidor de la proteasa de tipo Z (PiZ), se transmite como un rasgo autosómico recesivo y afecta a aproximadamente 1 de cada 1700 nacidos vivos en la mayoría de las poblaciones del norte de Europa y de América del norte. La mutación PiZ es una sustitución de un solo nucleótido que da como resultado una sustitución de un solo aminoácido (glutamato 342 a lisina).

Se cree que la principal función fisiológica de la α 1-AT es la inhibición de la elastasa de los neutrófilos, la catepsina G y la proteinasa 3. La α 1-AT producida en los individuos con deficiencia PiZ de α 1-AT es funcionalmente activa, aunque puede haber una disminución en su capacidad específica de inhibición de la elastasa. El sitio predominante de síntesis de α 1-AT es el hígado, sin embargo, también se sintetiza en tipos de células extrahepáticas, incluyendo macrófagos, células epiteliales intestinales y células intestinales de Paneth.

La semivida en el plasma de la α 1-AT de tipo M (α 1-ATM) (PiM es el alotipo normal) es de aproximadamente cinco días. La semivida de la proteína mutante PiZ (α 1-ATZ) es ligeramente inferior, pero esta diferencia no es suficiente para justificar los niveles plasmáticos bajos de α 1-AT en los individuos PiZ homocigotos.

La patogenia de la lesión pulmonar en la deficiencia de α 1-AT es atribuible a la marcada reducción de la actividad de α 1-AT disponible. Se ha descubierto que la α 1-AT constituye más del 90% de la actividad inhibidora de elastasa de los neutrófilos en el líquido de lavado alveolar pulmonar. Por lo tanto, parece que la enfermedad pulmonar destructiva que se observa en muchos individuos con deficiencia de α 1-AT se debe a una perturbación en el equilibrio neto entre la elastasa y la α 1-AT dentro de los pulmones. La actividad no inhibida de la elastasa, catepsina G, y proteinasa 3 de neutrófilos, a su vez, da como resultado la destrucción lenta de la integridad del tejido conectivo de los pulmones. Esta destrucción de tejido conectivo conduce a una sobredistensión y una reducción de la fuerza de retracción de los pulmones, que se traduce en una disminución del flujo de aire espiratorio. El tabaquismo agrava el problema al provocar la inactivación oxidativa de la α 1-AT que está presente.

En la actualidad, las opciones de tratamiento para individuos con patologías asociadas con la deficiencia de la α 1-AT son limitadas. Liver disease associated with α 1-AT deficiency is treated by orthotopic liver transplantation. Perlmutter, Ann. Med. 28:385-94, 1996. Se ha tratado la terapia génica somática para reemplazar el gen defectuoso de α 1-AT, pero aún no se ha utilizado con éxito. Los pacientes con enfisema relacionado con la deficiencia de α 1-AT han sido tratados con α 1-AT plasmática purificada administrada por vía intravenosa o mediante administración de aerosol intratraqueal. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.093.316. La eficacia de este régimen de tratamiento, sin embargo, aún no se ha establecido.

La terapia de suplemento de α 1-AT se ha utilizado en individuos deficientes en forma de administraciones intravenosas repetidas de forma crónica. Este modo de administración puede asociarse con problemas incluyendo, por ejemplo, el requisito de un trabajador de la salud para la administración, un acceso venoso malo, reacción de hipersensibilidad inmediata, el alto coste del procedimiento y las amplias fluctuaciones de los niveles plasmáticos de α 1-AT.

El documento WO 2005/014648 da a conocer la administración intravenosa de α 1-AT.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento para proporcionar α 1-AT que sea, como mínimo, fácil de administrar, sea adecuado para la administración a largo plazo y alcance niveles de biodisponibilidad en plasma de α 1-AT deseables.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer:

Realizaciones de la presente invención son:

1. Alfa-1 antitripsina (α 1-AT) para su utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno o

enfermedad asociada con la deficiencia de α 1-AT en un sujeto mediante administración subcutánea, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la administración subcutánea de α 1-AT es, como mínimo, de aproximadamente el 120% de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT administrada por vía intravenosa, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es suficiente para mantener en el

5 sujeto un nivel valle de α 1-AT en sangre, como mínimo, de aproximadamente 80 mg/dl, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 300 mg de α 1-AT por kg de peso corporal del sujeto.

2. α 1-AT para su utilización, según la realización 1, en la que la formulación es una formulación liofilizada para reconstituir antes de la administración.

10 3. α 1-AT para su utilización, según cualquiera de las realizaciones 1 ó 2, en la que la formulación comprende además una hidrolasa.

4. α 1-AT para su utilización, según cualquiera de las realizaciones 1 ó 2, en la que la formulación comprende además una hialuronidasa.

15 En una realización, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es suficiente para mantener un nivel valle de α 1-AT en sangre, como mínimo, de aproximadamente 80 mg/dl.

La α 1-AT se proporciona para administración subcutánea. En una realización, la formulación es una formulación liofilizada, en la que antes de la administración, la formulación liofilizada se puede reconstituir con una solución acuosa adecuada, por ejemplo una solución acuosa que comprende agua. La liofilización y reconstitución de formulaciones liofilizadas son, generalmente, conocidas en la técnica.

20

En algunos aspectos, la α 1-AT se puede administrar por vía subcutánea para diversas aplicaciones, incluyendo terapias humanas y veterinarias, sola o en combinación con uno o más reactivos, por ejemplo, un reactivo capaz de mejorar la farmacocinética y/o la farmacodinámica de la α 1-AT administrada por vía subcutánea.

25

En otro aspecto, la presente memoria ilustra una composición farmacéutica que comprende α 1-AT y una hialuronidasa, en la que la composición es adecuada para la administración por vía subcutánea a un sujeto.

30 DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gráfico de la concentración en plasma de alfa-1 antitripsina (α 1-AT) como una función del tiempo después de la administración por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC-1 y SC-2).

35 La figura 2 es un gráfico de la concentración en plasma de alfa-1 antitripsina (α 1-AT) como una función del tiempo después de la administración por vía subcutánea repetida (SC-3, SC-4 y SC-5).

La figura 3 es (A) una representación típica de secciones de H y E de la piel y el tejido subyacente de conejos de control no tratados (diapositiva 1), tratados con vehículo (diapositivas 2 y 3: 1 hora y 72 horas después de la dosis, respectivamente) y tratados con h-AT (diapositivas 4 y 5: α 1-AT 1 hora y 72 horas después de la dosis, respectivamente); y (B) una representación típica de secciones de inmunohistología de pulmones teñidos con anticuerpo monoclonal primario frente a h-AT seguido de un anticuerpo monoclonal secundario frente al complejo de hAT-anticuerpo y acoplado a un cromóforo diaminobenzedina y sometidos a contrateñimiento con hematoxilina (diapositivas 1 y 2: vehículo 1 hora después de la dosis; diapositivas 3 y 4: α 1-AT 1 hora y 72 horas después de la dosis, respectivamente).

40

La figura 4 es un gráfico que muestra alfa-1 antitripsina en plasma tras la administración IV y SC (\pm hialuronidasa) en conejos.

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Según la presente invención, se ha descubierto sorprendentemente que la administración subcutánea de α 1-AT es un procedimiento intrínsecamente sencillo y novedoso de proporcionar α 1-AT a un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal). Un régimen de dosificación que comprende la administración subcutánea de α 1-AT es, sorprendentemente, muy adecuado para proporcionar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT. La administración subcutánea (por ejemplo, inyección subcutánea utilizando una aguja) no requiere profesionales de la salud capacitados para administrar el fármaco. Opcionalmente se puede administrar una unidad de dosis a partir de un dispositivo preenvasado que perfora la piel en la medida correcta y libera la dosis. Además, la administración subcutánea es la causa de menos molestias para el sujeto con respecto a lo que resulta habitual con las inyecciones intramusculares e intravenosas, así como con los supositorios rectales. En resumen, la administración subcutánea de α 1-AT, tal como se describe en el presente documento, proporciona una mejora para el tratamiento o la prevención de trastornos o enfermedades asociadas con la deficiencia de α 1-AT.

50

55 Se pretende que el término " α 1-AT," tal como se utiliza en el presente documento, sea amplio, a menos que se indique específicamente lo contrario. El término se refiere a todos los polimorfos de origen natural de la α 1-AT. El término también incluye fragmentos funcionales de α 1-AT, proteínas quiméricas que comprenden α 1-AT o fragmentos funcionales de las mismas, homólogos obtenidos por sustitución análoga de uno o más aminoácidos de α 1-AT, y los homólogos de especie. El término también se refiere a todos los polipéptidos de α 1-AT que son un

60

producto de la tecnología de ADN recombinante que incluye una α 1-AT que es un producto de la tecnología transgénica. Por ejemplo, el gen que codifica la α 1-AT se puede insertar en un gen de mamífero que codifica una proteína del suero de la leche de tal manera que la secuencia de ADN se expresa en la glándula mamaria, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.322.775. El término también se refiere a todas las proteínas de α 1-AT sintetizadas químicamente por medios bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida. El término se refiere también a α 1-AT preparada a partir de plasma. El término se refiere también a α 1-AT que está disponible comercialmente. Por ejemplo, se preparan Prolastin® (Talecris Therapeutics, Inc., Research Triangle Park, NC), Aralast® (Baxter International, Inc., Deerfield, IL) y Zemaira® (CSL Behring, Kankakee, IL) a partir de combinados de plasma humano. La α 1-AT de plasma humano también está disponible comercialmente en la firma Sigma-Aldrich Chemical Co. como los productos A9024, A6150 y 10814 (Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI). La α 1-AT también está disponible en la firma PPL Therapeutics, East Mains, Ormiston, East Lovian, EH35 5NG, Escocia. La patente de Estados Unidos No. 6.974.792 describe un procedimiento de preparación de α 1-AT.

El término "subcutáneo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a por debajo de la piel (por ejemplo, en el tejido conectivo subyacente a la dermis y por encima de la fascia del tejido muscular).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, tal como, por ejemplo, la reducción o inhibición del enfisema asociado con la deficiencia congénita de α 1-AT. Una cantidad terapéuticamente eficaz de α 1-AT puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, y la capacidad de la α 1-AT para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una con la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la α 1-AT es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como, por ejemplo, la prevención o la inhibición del enfisema asociado con la deficiencia congénita de α 1-AT. Una cantidad profilácticamente eficaz puede determinarse, tal como se ha descrito anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz.

Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente la dosis y frecuencia de la administración subcutánea para proporcionar un régimen de dosificación que es terapéuticamente o profilácticamente eficaz.

Por tanto, la administración subcutánea se refiere a la liberación de una dosis deseada de la α 1-AT por debajo de la piel a través de un dispositivo de administración de medicamentos. El dispositivo de administración de medicamentos puede penetrar en la epidermis del individuo que se va a tratar y da como resultado la introducción de la dosis deseada de α 1-AT en los tejidos del individuo. El dispositivo de administración de la presente invención puede incluir, pero sin limitaciones a los mismos, cualquier inyector tradicional de aguja hipodérmica, inyector sin aguja de accionamiento neumático, inyector de chorro o inyector sin aguja de gas a presión (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.730.723, 5.891.086, 5.957.886 y 5.851.198).

En una realización, el sujeto es un ser humano, en el que el sitio de la administración subcutánea incluye, pero sin limitaciones a los mismos, supraescapular, parte superior del pecho, parte superior del muslo, y combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos de trastornos y enfermedades asociados con o causados por niveles por debajo de lo normal de α 1-AT en plasma y para los que las presentes realizaciones dirigidas a la administración subcutánea pueden ser especialmente útiles se incluyen, sin limitaciones a los mismos, enfermedad pulmonar, tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (por ejemplo, enfisema), enfermedad hepática, enfermedad vascular (por ejemplo, aneurismas intracraneales, displasia fibromuscular arterial, trastornos hemorrágicos graves e hipertensión), paniculitis, enfermedades oculares (por ejemplo, uveítis anterior), vasculitis necrotizante sistémica y granulomatosis de Wegener.

Un factor que puede considerarse cuando se determina una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT para la administración subcutánea es la concentración de la α 1-AT funcionalmente activa expresada en un compartimento biológico del sujeto, tal como, por ejemplo, en el tracto respiratorio inferior o el fluido de revestimiento epitelial (ELF) del sujeto. Otro factor que también puede considerarse a la hora de determinar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT para la administración subcutánea es la farmacología (por ejemplo, la farmacocinética) de la α 1-AT.

La farmacocinética de la α 1-AT se refiere a la concentración o los niveles de α 1-AT en la sangre del sujeto. Los parámetros o medidas farmacocinéticas de los niveles de α 1-AT en la sangre incluyen el área bajo la curva (AUC), C_{\min} (es decir, valle) y la C_{\max} . La AUC es la exposición total de α 1-AT en la sangre del sujeto durante un periodo de dosificación fijo (por ejemplo, 8, 12 y 24 horas). La C_{\min} (es decir, el nivel valle) es el nivel sanguíneo más bajo de la

α 1-AT durante un periodo de dosificación fijo. La $C_{m\acute{a}x}$ es el nivel más alto o pico alcanzado por la α 1-AT en la sangre del sujeto durante un periodo de dosificación fijo.

5 Cabe destacar que los valores de las dosis pueden variar con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse en el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional del cuidador y los intervalos de dosificación indicados en la presente memoria descriptiva son únicamente ejemplos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la presente invención.

10 Los regímenes de dosificación por vía subcutánea se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica o profiláctica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo subcutáneo, varias dosis divididas se pueden administrar por vía subcutánea en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente tal como indican las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica. Además, una o más dosis subcutáneas se pueden administrar como parte de un régimen que comprende otros modos de administración de α 1-AT, incluyendo, pero sin limitaciones, la administración intravenosa.

15 En un aspecto, la α 1-AT es para su utilización en un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno o enfermedad asociado con la deficiencia de α 1-AT en un sujeto.

20 La α 1-AT se va a proporcionar por vía subcutánea en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz.

25 Por ejemplo, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz que se va a administrar por vía subcutánea puede ser suficiente para lograr o mantener un nivel valle en sangre de α 1-AT (por ejemplo, nivel plasmático) por encima de un nivel umbral objetivo. En una realización, el nivel umbral objetivo es, como mínimo, de aproximadamente 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, y 200 mg/dl.

30 En otra realización, en la que el sujeto es un ser humano, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es suficiente para lograr o mantener un nivel valle en sangre de α 1-AT, como mínimo, de aproximadamente 50 mg/dl. En otras realizaciones, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es suficiente para mantener un nivel valle de α 1-AT en sangre, como mínimo, de aproximadamente 80 mg/dl. En una realización, la etapa de administración comprende una pluralidad de inyecciones subcutáneas de una composición que comprende una concentración de α 1-AT.

35 La dosis y la frecuencia de la administración subcutánea de α 1-AT pueden adaptarse a cada sujeto individual. Por consiguiente, tanto la dosis como la frecuencia pueden variar.

40 En una realización, la dosis que se va a administrar por vía subcutánea es, como mínimo, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 90 mg a aproximadamente 200 mg, y de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg por kg de peso corporal del sujeto por administración. La dosis es de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 300 mg por kg de peso corporal del sujeto.

45 Las dosis se puede administrar por vía subcutánea a dichas frecuencias y durante el tiempo que se considere necesario y seguro, según el cuidador determina fácilmente mediante pruebas estándar (por ejemplo, médico o veterinario) dependiendo del trastorno o enfermedad específica que se va a tratar.

50 En una realización, la dosis se administra por vía subcutánea, como mínimo, una vez por una unidad de tiempo, de manera ilustrativa, como mínimo, una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, y así sucesivamente por una unidad de tiempo. En otra realización, la unidad de tiempo es una hora, un día, una semana, cada dos semanas, cada tres semanas, un mes, cada 1, 2, 3, 4, 5, y 6 meses, etc.

55 En su caso, las dosis y frecuencias de administración subcutánea se pueden ajustar hacia arriba o hacia abajo. En otras realizaciones, la administración subcutánea se puede realizar antes, simultáneamente o después de otros modos de administración de α 1-AT, tales como, por ejemplo, administración intramuscular o intravenosa.

60 En una realización, la presente invención da a conocer un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno o una enfermedad asociada con la deficiencia de α 1-AT en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o prevención. El procedimiento comprende proporcionar, por vía subcutánea, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT al sujeto. En una realización, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es, como mínimo, aproximadamente 72 mg/kg de peso corporal por semana. En otra realización, la etapa de administración comprende una o más inyecciones subcutáneas del sujeto, en la que las una o más inyecciones comprenden cada una un volumen de una composición que comprende una concentración de α 1-AT, en la que cada una de la una o más inyecciones se administra por vía subcutánea durante una duración de la administración. En algunas realizaciones, se proporciona la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT a través de una pluralidad

de inyecciones subcutáneas que se repiten semanalmente. La pluralidad de inyecciones subcutáneas se puede administrar el mismo día o, como mínimo, en dos días diferentes de cada semana.

Se pueden utilizar diversas formulaciones diferentes que contienen α 1-AT según la presente invención. El ingrediente activo en tales formulaciones es α 1-AT, que puede ser α 1-AT humana o no humana recombinante pero, como se ha indicado anteriormente, también puede incluir α 1-AT extraída de fuentes de plasma. Aunque la α 1-AT está generalmente presente por sí sola como el único ingrediente activo, la α 1-AT puede estar presente con uno o más ingredientes activos adicionales.

Independientemente del ingrediente activo, puede haber diferentes tipos de formulaciones de α 1-AT que pueden utilizarse en relación con la presente invención. Todas las formulaciones incluyen α 1-AT y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración subcutánea. En una realización, la formulación es una composición de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que comprende una concentración de α 1-AT. En otra realización, la concentración es, como mínimo, de aproximadamente 50 mg/ml.

Por lo tanto, cualquier formulación que hace que sea posible administrar por vía subcutánea α 1-AT a un sujeto puede utilizarse en relación con la presente invención, incluyendo formulaciones que se pueden administrar también por vía intravenosa. La información específica con respecto a las formulaciones que se pueden utilizar en relación con la administración subcutánea se describen en "Ciencias farmacéuticas de Remington" ("Remington's Pharmaceutical Sciences"), A. R. Gennaro editor (última edición) Mack Publishing Company. En cuanto a las formulaciones de insulina, también es útil tener en cuenta Sciarra y otros [Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 65, No. 4, 1976].

La α 1-AT se puede liofilizar en el recipiente en el que la reconstitución de la proteína α 1-AT se debe llevar a cabo con el fin de evitar una etapa de transferencia. Generalmente, la liofilización se traducirá en una formulación liofilizada en la que el contenido de humedad de la misma es menor que aproximadamente el 5%, y preferentemente menor que aproximadamente el 3%. Y, típicamente, cuando es el momento de administrar por vía subcutánea la α 1-AT al sujeto, la formulación liofilizada se puede reconstituir con un diluyente adecuado para conseguir la concentración de α 1-AT deseada.

La reconstitución tiene lugar, generalmente, a una temperatura de aproximadamente 25°C para asegurar la completa hidratación, aunque se pueden utilizar otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente o excipientes y de proteína. Entre los ejemplos de diluyentes se incluyen, pero sin limitaciones, agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, y solución de Ringer o solución de dextrosa. El diluyente contiene, opcionalmente, un conservante. La cantidad de conservante utilizado se determina evaluando para diferentes concentraciones de conservantes la compatibilidad con la proteína y el ensayo de la eficacia del conservante.

La formulación reconstituida debe administrarse al sujeto, tal como, por ejemplo, un ser humano, según procedimientos conocidos, mediante administración subcutánea (es decir, bajo la piel). Para tales fines, la formulación se puede inyectar utilizando una jeringa. Sin embargo, se dispone de otros dispositivos para la administración de la formulación, tales como dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos Inject-case® y Genject®); plumas inyectoras (tales como, GenPen®); dispositivos sin aguja (por ejemplo, MediJector® y BioJector®); y sistemas de administración de parches subcutáneos. La proteína puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias. La colocación subcutánea de un equipo de infusión con alas, por ejemplo, se puede utilizar para minimizar las inyecciones repetidas con la aguja.

En una realización, la concentración de α 1-AT en la formulación para administración subcutánea es, como mínimo, de aproximadamente 0,1 mg/ml, de manera ilustrativa, como mínimo, de aproximadamente 0,1, 1, 10, 100, 1.000 mg/ml. Además, la actividad específica de la α 1-AT en la formulación para administración subcutánea puede variar. En una realización, la actividad específica es, como mínimo, de aproximadamente 0,05 mg de α 1-AT activa por mg de proteína total, de manera ilustrativa, como mínimo, de aproximadamente 0,05, 0,1, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, o más de α 1-AT activa por mg de proteína total.

En general, una administración subcutánea individual de α 1-AT comprende un volumen de una formulación de α 1-AT, en la que el volumen se administra durante una duración de administración. El volumen dependerá, por supuesto, en parte de la concentración de α 1-AT en la formulación que se va a administrar. Además, la duración de la administración puede depender de uno o más factores incluyendo, pero sin limitaciones, el volumen que se administra y el nivel de incomodidad del sujeto. Por ejemplo, una dosis que tiene un volumen relativamente grande se puede proporcionar como volúmenes más pequeños separados que se pueden administrar al mismo tiempo o en un momento diferente en el mismo sitio subcutáneo o en uno diferente (por ejemplo, administración simultánea de dos volúmenes más pequeños en dos sitios subcutáneos diferentes).

En una realización, el volumen que se administra en un sitio subcutáneo es menor de aproximadamente 3 ml. Preferentemente, la duración de la administración del volumen es, como mínimo, de aproximadamente 0,5 segundos (s), de manera ilustrativa, como mínimo, de aproximadamente 0,5 s, 1 s, 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s, 1 minuto (min), 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min y 1 hora.

En otros aspectos, la α 1-AT se puede administrar por vía subcutánea para diversas aplicaciones, incluyendo terapias humanas y veterinarias, sola o en combinación con uno o más reactivos, por ejemplo, un reactivo capaz de mejorar la farmacocinética y/o la farmacodinámica de la α 1-AT administrada por vía subcutánea. Por ejemplo, en una realización, el uno o más reactivos se deben administrar a un sujeto de forma simultánea con α 1-AT, por ejemplo por medio de una única composición farmacéutica estéril que comprende α 1-AT y el uno o más reactivos. En otras realizaciones, el uno o más reactivos se administran a la vez antes de o después de la administración de α 1-AT.

El uno o más reactivos se pueden administrar mediante inyección, por ejemplo, inyección parenteral, incluyendo, pero sin limitación a las mismas, inyección subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular e intravenosa. La vía de administración y la cantidad de los uno o más reactivos administrada puede variar en función de diversas variables del sujeto, incluyendo el tamaño, el peso, la edad, la gravedad de la enfermedad y la capacidad de respuesta a la terapia. Los procedimientos para determinar la vía de administración y la dosificación adecuadas de los uno o más reactivos generalmente se pueden determinar caso por caso. Dichas determinaciones son rutinarias para un experto ordinario en la técnica (véase, por ejemplo, "Principios de Harrison de medicina interna" ("Harrison's Principles of Internal Medicine"), 11^a Ed., 1987).

En una realización, el uno o más reactivos es una hidrolasa tal como, por ejemplo, una glicosidasa. Entre los ejemplos ilustrativos no limitantes de una glicosidasa se incluyen hialuronidasa, α -amilasa, β -amilasa, queratanasa, dextranasa, endoglicoceramidasa II, quitosanasa, quitinasa, tioglucosidasa, pectinasa, pectoliasa, lisozima, neuraminidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa, invertasa, trehalasa, amiloglucosidasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa, celulasa, hesperidina, pululanasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, α -L-fucosidasa, β -N-acetilglucosaminidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, β -glucanasa, laminarinasa, isoamilasa, inulina, xilanas, agarasa, endoglicosidasa H, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3, endoglicosidasa H, endoglicosidasa F1, O-glucosidasa, proteína Fpg, ADNasa, diastasa, y xilanas.

En algunas realizaciones, la glicosidasa es una hialuronidasa. Por ejemplo, la hialuronidasa puede ser una enzima que es capaz de escindir los enlaces glicosídicos β -N-acetilhexosamina-(1-4) en ácido hialurónico, condroitina, y/o sulfatos de condroitina. Por ejemplo, la hialuronidasa se puede administrar como adyuvante para aumentar la absorción de α 1-AT mejorando de este modo su farmacocinética y/o farmacodinamia. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la hialuronidasa puede actuar como una sustancia de diseminación o difusión que modifica la permeabilidad del tejido conectivo a través de la hidrólisis del ácido hialurónico, un polisacárido que se encuentra en la sustancia fundamental intercelular del tejido conectivo y de determinados tejidos especializados, tales como el cordón umbilical y el humor vítreo. La hialuronidasa, como mínimo, puede hidrolizar el ácido hialurónico mediante la división del enlace glucosaminídico entre el C1 de fracción de glucosamina y el C4 de ácido glucurónico. Se cree que esto puede disminuir temporalmente la viscosidad del cemento celular y promover la difusión de los fluidos inyectados o de los trasudados o exudados localizados, lo que facilita su absorción. La velocidad de difusión puede ser proporcional a la cantidad de enzima, y la medida puede ser proporcional al volumen de la solución. El conocimiento de los mecanismos implicados en la desaparición de la hialuronidasa inyectado es limitado, sin embargo, se cree que la sangre de una serie de especies de mamíferos provoca la inactivación de la hialuronidasa.

La dosificación específica apropiada para la administración puede determinarla fácilmente un experto en la técnica y/o según los factores tratados en el presente documento. Además, un experto ordinario en la técnica reconocerá que las estimaciones para dosificaciones apropiadas en seres humanos pueden extrapolarse a partir de determinaciones del nivel de actividad enzimática de la enzima *in vitro* y/o las dosis eficaces en estudios con animales. Por ejemplo, en los casos en los que X unidades (U) de hialuronidasa pueden ser eficaces en la mejora de la farmacocinética y/o la farmacodinamia de un régimen de α 1-AT administrada por vía subcutánea en un conejo con un peso de aproximadamente 3 kg y, dada esta información, las dosis de hialuronidasa correspondientes en un ser humano con un peso aproximado de 75 kg pueden ser aproximadamente 25 veces (por ejemplo, aproximadamente 25 veces X unidades) la dosis eficaz en los conejos.

Se conocen una serie de inyecciones de hialuronidasa, tales como, por ejemplo, formulaciones comercializadas como Amphadase® (150 unidades/ml de solución inyectable), Hydase® (150 unidades/ml de solución inyectable), Hylenex® (150 unidades/ml de solución inyectable), Vitrase® (200 unidades/ml de solución inyectable) y Vitrase® (6.200 unidades de inyección). Por ejemplo, según un fabricante, Amphadase® (Amphastar Pharmaceuticals, Inc., Rancho Cucamonga, CA) es una preparación de hialuronidasa testicular bovina purificada suministrada como una solución estéril e incolora lista para utilizar y la absorción y la dispersión de otros fármacos inyectados puede mejorarse mediante la adición de 50 a 300 unidades de Amphadase®, a la solución inyectable. Cada vial de Amphadase® contiene 150 unidades USP de hialuronidasa por ml con 8,5 mg de cloruro sódico, 1 mg de edetato

disódico, 0,4 mg de cloruro de calcio, tampón de fosfato de sodio monobásico y no más de 0,1 mg de timerosal (derivado de mercurio). La solución lista para utilizar es transparente e incolora con un pH aproximado de 6,8 y una osmolalidad de 295 a 355 mOsm.

5 La α 1-AT se puede administrar por vía subcutánea a un sujeto en una composición que comprende α 1-AT en combinación con una cantidad eficaz de una hialuronidasa, en el que la cantidad eficaz es suficiente para aumentar la absorción, dispersión, o ambas cosas, de α 1-AT. En una realización, la hialuronidasa se administra simultáneamente con α 1-AT. En otra realización, la hialuronidasa se administra simultáneamente con α 1-AT, en la que la composición comprende además la hialuronidasa. En algunas realizaciones, la hialuronidasa se administra simultáneamente con α 1-AT, en la que la composición que comprende α 1-AT se administra en un sitio diferente del sitio de administración de la hialuronidasa.

10 En otras realizaciones, la presente memoria descriptiva ilustra una composición farmacéutica que comprende α 1-AT y una hialuronidasa y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la composición es adecuada para la administración por vía subcutánea a un sujeto. En una realización, el sujeto es un ser humano. La composición farmacéutica puede estar en forma de una formulación liofilizada.

15 Se puede proporcionar un artículo de fabricación que contiene composiciones o formulaciones liofilizadas de la presente invención y proporciona instrucciones para su reconstitución y/o utilización. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringuillas (tales como jeringuillas de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado por diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene las composiciones o formulaciones liofilizadas y la etiqueta en el recipiente o asociada con el mismo puede indicar las instrucciones para la reconstitución y/o utilización. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se reconstituye a las concentraciones de proteína como se ha descrito anteriormente. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWF1). El artículo de fabricación puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, cargas, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de utilización.

Ejemplos

35 Ejemplo 1 Biodisponibilidad en plasma de α 1-AT humana administrada por vía subcutánea

Para determinar la biodisponibilidad en plasma de la α 1-AT tras la administración subcutánea (SC) (y, para compararlo con la inyección intravenosa de α 1-AT), se examinó la administración única de dos niveles de dosis subcutáneas y en comparación con una única administración intravenosa de α 1-AT.

40 Los conejos blancos New Zealand (~ 3 kg de peso corporal) se aclimataron durante, como mínimo, 1 semana antes de su utilización. Se proporcionó alimento y agua a demanda. Se monitorizó a los conejos diariamente para determinar su bienestar.

45 Los conejos se asignaron a los Grupos A, B o C (N = 5 cada uno) de peso corporal similar. Se trató a los conejos con acepromazina (1,0 mg/kg de peso corporal) mediante inyección SC para facilitar la vasodilatación en las orejas. En la oreja se aplicó Nair® u otro depilatorio para facilitar la eliminación del pelo y exponer los vasos sanguíneos. De cinco a diez minutos después, se retiró la crema Nair® y el pelo frotando con esponjas de gasa húmedas hasta retirar toda la crema. Se secaron las orejas se secaron y se aplicó la crema anestésica local, lidocaína (1%). Después de 15 minutos, la oreja se limpió con un hisopo con alcohol y para el grupo intravenoso (grupo IV), se administró α 1-AT (50 mg/ml) (200 mg/ kg de peso corporal) a través de la vena de la oreja.

50 Para los grupos de administración subcutánea (grupos SC-1 y SC-2), se afeitó el pelo en dos secciones (2" x 2") en el lado dorsal. Se administró α 1-AT (200 mg/kg de peso corporal (grupo SC-1); 240 mg/kg de peso corporal (grupo SC-2)) por vía subcutánea en los dos sitios utilizando una aguja Monoject de calibre 25 unida a una jeringa. Antes de la infusión, se retiró el pistón de la jeringa para asegurarse de que la punta de la aguja no está en un vaso sanguíneo. Después de la infusión, se realizó observación visual para garantizar la falta de permeabilidad.

55 Se extrajo sangre al tiempo cero (antes de la dosis), 5 minutos, 3 horas, 6 horas, 9 horas, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 días. Se extrajo una muestra de sangre de 1,5 ml del catéter arterial utilizando una jeringa cargada con 150 ul de citrato de sodio al 3,8% y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga.

60 Después de la extracción de sangre inicial, se devolvió a los animales a sus jaulas de retención. En cada tiempo de extracción posterior, se devolvió a los animales a sus jaulas de restricción, la muestra de sangre se tomó como se ha descrito anteriormente y se devolvió a los animales a sus jaulas de retención. Antes de las extracciones de

65

sangre sucesivas, se sedó a los conejos con 1 mg/ml de acepromazina y la muestra de sangre de 1,5 ml se recogió directamente de la arteria de la oreja con una aguja de calibre 22 g y una jeringa de 3 ml cargada con citrato de sodio al 3,8%. Se sacrificó a los conejos al final del estudio mediante infusión intravenosa de pentobarbital. Se sacrificó a todos los conejos según las políticas del Servicio de Salud Pública sobre el cuidado humano de animales de laboratorio. Todos los efectos adversos en los conejos se abordaron en estricta conformidad con los protocolos veterinarios aprobados en la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Facultad de Medicina Veterinaria.

Las muestras de sangre se centrifugaron después de la recogida a 3.000 rpm en una centrífuga de mesa, las muestras de plasma se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Las muestras de plasma se analizaron para detectar los valores de h-AT mediante inmunonefelometría.

Como se muestra en la figura 1, el perfil de eliminación plasmática de la α 1-AT administrada por vía intravenosa (es decir, el grupo IV) sigue un patrón bifásico con una fase alfa inicial rápida y una fase beta lenta con una semivida de eliminación terminal ($\tau_{1/2}$) de 53 horas. La α 1-AT administrada por vía subcutánea (es decir, SC-1 y SC-2) alcanzó la $C_{m\acute{a}x}$ en aproximadamente 48 horas. La disponibilidad fraccional (F) derivada del área bajo la curva de concentración (AUC) de los grupos SC-1 (es decir, 100% de la dosis IV) y SC-2 (es decir, el 120% de la dosis IV) fue, respectivamente, un 27% menor ($P < 0,05$) y un 8% menor (no estadísticamente significativo) en comparación con el grupo IV. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Perfil plasmático

Grupo	AUC (h-mg/ml) Media \pm SD	Media F \pm SD
IV	179,0 \pm 11,2	1,00 \pm 0,06
SC1	131,4 \pm 13,1*	0,73 \pm 0,07*
SC2	164,6 \pm 21,0	0,92 \pm 0,12

*Estadísticamente significativa del grupo IV de $P < 0,05$

Ejemplo 2

Biodisponibilidad en plasma tras administraciones subcutáneas repetidas de α 1-AT humana

Se estudió la biodisponibilidad plasmática de α 1-AT tras tres administraciones subcutáneas (SC) repetidas.

Los conejos se prepararon como se ha indicado anteriormente y fueron asignados a tres grupos y se les administró la dosis los días 0, 2, 4 y 6. A los conejos del grupo 1 (es decir, SC-3) se administraron dosis de 50 mg/kg, a los conejos del grupo 2 (es decir, SC-4) se administraron dosis de 60 mg/kg, y a los conejos del grupo 3 (es decir, SC-5) se administraron dosis de 70 mg/kg. Las muestras de sangre se recogieron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y 12 días después de la dosificación y se procesaron como se ha indicado anteriormente para el análisis.

Como se muestra en la figura 2, los niveles plasmáticos de la α 1-AT administrada por vía subcutánea en los tres grupos (es decir, SC-3, SC-4, y SC-5) siguieron aumentando con la administración repetida hasta el día 7 y, a partir de entonces, los niveles disminuyeron gradualmente hacia el valor basal el día 12. La AUC de los grupos de SC-3, SC-4, y SC-5 fueron 127 \pm 11, 159 \pm 8, y 162 \pm 12, respectivamente. La disponibilidad fraccional (F), que se determinó mediante la comparación de la AUC con el grupo de dosis única IV a partir del experimento descrito en el ejemplo 1 anterior, fue de 0,71 \pm 0,03, 0,89 \pm 0,04, 0,91 \pm 0,07 para SC-3, SC-4, y SC-5, respectivamente. El valor F para SC-3 fue menor que el de SC-4 y SC-5 en aproximadamente un 20% ($P < 0,05$). Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Área bajo la curva y disponibilidad fraccional (F)

Grupo	AUC (h-mg/ml) Media \pm SD	Media F \pm SD
1: SC-3	127 \pm 11*	0,71 \pm 0,03*
2: SC-4	159 \pm 8	0,89 \pm 0,04
3: SC-5	162 \pm 12	0,91 \pm 0,07

* $P < 0,05$ en comparación con la dosis única IV a 200 mg/kg descrita en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Histopatología en el sitio de la inyección de α 1-AT humana administrada SC

Para determinar la histopatología en el sitio de la inyección y la presencia de α 1-AT humana en el tejido pulmonar, se realizó inmunohistoquímica después de la administración subcutánea repetida de alfa-1 antitripsina (h-AT) humana en conejos.

5 Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (IACUC) de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Se aclimató a los conejos blancos New Zealand macho, después de su llegada a las instalaciones de animales, durante, como mínimo, 1 semana antes de su utilización. Durante este período de aclimatación, cada animal se introdujo en un inmovilizador, tres veces/semana durante un mínimo de 15 minutos para aclimatar los animales al inmovilizador. Se proporcionó alimento y agua a demanda. Se monitorizó a los conejos diariamente para determinar su bienestar.

10 Se pesó a los animales y se asignaron a grupos (n = 3) de peso corporal aproximadamente igual, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Diseño del estudio

Grupos	N	Tratamientos	Volumen total (ml)	Tiempo de obtención de tejido
Grupo 1-A	3	Administración SC diaria de alfa-1-antitripsina durante 3 días	10 ml	1 hora después de la última dosis
Grupo 1-B	3	Administración SC diaria de alfa-1-antitripsina durante 3 días	10 ml	3 días después de la última dosis
Grupo 2-A	3	Administración SC diaria de vehículo (PBS) durante 3 días	10 ml	1 hora después de la última dosis
Grupo 2-B	3	Administración SC diaria de vehículo (PBS) durante 3 días	10 ml	3 días después de la última dosis
Grupo 3-A	1	Sin tratamiento	10 ml	Al mismo tiempo que el grupo A

15 El día antes del inicio del estudio, un área en el costado izquierdo de los animales se recortó de la línea media dorsal extendiéndose 4 cm en dirección ventral y desde la punta de la última costilla al ala del ileon. El día del estudio, se sedó a los animales con la inyección SC de acepromazina (1 mg/kg) y 15 minutos más tarde, se administraron los artículos de ensayo (10 ml de h-AT-56 mg/ml - n.º de lote T06AU02) o vehículo (solución salina tamponada con fosfato) mediante inyección SC por un catéter de mariposa de calibre 23. Se inmovilizó la piel del animal mediante tracción suave y se insertó la aguja de tipo mariposa desde el catéter en el espacio entre la piel y el tejido subcutáneo subyacente para asegurar que hay un mínimo movimiento de la aguja para evitar lesiones de los tejidos.

20 Los artículos de ensayo se administraron SC en el mismo sitio para cada conejo y los bordes del lugar de inyección y la distorsión tisular se marcaron con un rotulador. Las inyecciones como se ha indicado anteriormente se repitieron cada día durante tres días consecutivos.

25 Los tiempos de obtención de tejido se resumen en la tabla 3 anterior. Se anestesió a los animales con ketamina (50 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal) por vía intramuscular (IM) y se les sacrificó con pentobarbital (120 mg/kg o 7ml por conejo de 3 kg) administrado por vía intravenosa (IV).

30 Para el análisis de tejido pulmonar, se abrió la cavidad torácica y se extrajeron los pulmones. Se cateterizó la tráquea y se inflaron los pulmones con 50-100 ml de formaldehído tamponado a pH 7.4. Después del inflado, se introdujeron los pulmones en formaldehído y se procesaron mediante inmunohistoquímica en un plazo de 72 horas. Se realizó tinción específica de h-AT con un anticuerpo monoclonal primario seguido de un anticuerpo monoclonal secundario frente al complejo h-AT y se acopló a un cromóforo de diaminobenzedina y se realizó contratinción con hematoxilina.

35 Para el análisis de los tejidos de la piel, se recogió todo el costado izquierdo y se obtuvo una sección de 3"x 3" de la piel y se realizó una incisión en el músculo subyacente de la pared, se clavó en espuma de poliestireno y se colocó en formaldehído. El tejido se marcó dorsal, ventral, craneal y caudal con un rotulador. La esquina dorso-craneal de la sección cuadrada de tejido se cortó para proporcionar adicionalmente orientación para seccionar y la histopatología.

40 Los resultados de la histología del sitio de inyección de la piel y los tejidos subyacentes y la inmunohistoquímica de pulmón se muestran en la figura 3. La figura 3A, diapositivas 1-5, muestra que no había indicios de inflamación o signos de lesiones en los conejos tratados con h-AT o vehículo en comparación con el control sin tratar, lo que sugiere que la administración SC repetida de h-AT no alteró la piel y la histología del tejido subyacente. Como se muestra en la figura 3B, los pulmones de los conejos tratados con vehículo (diapositivas 1 y 2) no mostraron tinción oscura, lo que indica la falta de h-AT, sin embargo, los conejos tratados con h-AT (diapositivas 3 y 4) mostraron tinción oscura, lo que indica la presencia de h-AT en todo el tejido pulmonar, incluyendo células epiteliales, endoteliales, y el espacio intersticial. Estos resultados sugieren que la administración SC de h-AT está fácilmente disponible en el tejido pulmonar, el órgano diana en el tratamiento de la deficiencia de h-AT.

Ejemplo 4**Efecto de la hialuronidasa sobre la farmacocinética de la alfa-1-antitripsina humana administrada por vía subcutánea**

5 Para determinar el efecto de la enzima hialuronidasa sobre la farmacocinética de la α 1-AT administrada por vía subcutánea, se administró a los conejos α 1-AT con o sin hialuronidasa.

10 Se pesó a los conejos y se les asignó al Grupo A, B o C ($n = 5$) y se correspondió con el peso corporal promedio de cada grupo. Se aclimató a los conejos durante, como mínimo, 1 semana antes del estudio. Durante este período de aclimatación, cada animal se introdujo en un inmovilizador, tres veces a la semana durante un mínimo de 15 minutos para aclimatar a los animales al inmovilizador. Se proporcionó comida y agua a demanda y se monitorizó a los conejos al día para determinar su bienestar. Se colocó a cada conejo en un inmovilizador y se administraron los fármacos del siguiente modo:

15 1. h-AT - por vía intravenosa: Se trató a los conejos con acepromacina (1,0 mg/kg de peso corporal) mediante inyección SC para provocar vasodilatación de las arterias y venas en las orejas. Se administró h-AT (No. de lote T06Au02-56 mg/ml - Talecris Biotherapeutics) [200 mg/kg de peso corporal, 10,7] como un bolo en la vena de la oreja a través de una aguja de tipo mariposa unida a la jeringa.

20 2. Administración subcutánea: Se trató a los conejos con acepromacina (1,0 mg/kg de peso corporal) mediante inyección SC para provocar vasodilatación de las arterias y venas en las orejas. Se afeitó el pelo en la cara dorsal (2" por 2") se afeitó y se administró h-AT (No. de lote T06Au02- 56 mg/ml-Talecris Biotherapeutics) [h-AT: 200 mg/kg10,7; h-AT + hialuronidasa: 200 mg/kg (10,7 ml/conejo de 3 kg) de h-AT + 3.000 U de hialuronidasa (H-6254 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)] por vía subcutánea a través de una aguja de tipo mariposa unida a una jeringuilla. Antes de la infusión, se tiró del émbolo de la jeringa para observar si había sangre. Después de la infusión, se realizó observación visual para garantizar la falta de permeabilidad.

25 Se extrajo sangre al tiempo cero (antes de la dosis), 5 minutos, 4 horas y 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 días. Se extrajo una muestra de sangre de 1,5 ml de la arteria medial de la oreja utilizando una jeringa cargada con 150 μ l de citrato de sodio al 3,8% y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.000 rpm en una centrífuga de mesa, se congelaron alícuotas de plasma en hielo seco y se guardaron a -80°C .

30 Se analizaron las muestras para determinar la AT humana mediante inmunonefelometría. Los datos se analizaron mediante Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, WA) y se determinaron los parámetros farmacocinéticos, tales como el área bajo la curva (AUC), la disponibilidad fraccional (F), la semivida ($T_{1/2}$), la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo máximo para la concentración plasmática máxima ($T_{m\acute{a}x}$), etc. utilizando WinNonlin 5.2 (vista Pharsight Corp., Mountain CA). Los gráficos se representaron utilizando Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Inc, San Jose, CA). Los datos se sometieron a un análisis estadístico utilizando JMP 7.0 (SAS, Cary, NC).

35 Los niveles de h-AT en plasma de conejo después de la administración IV y SC se muestran en la figura 4. En el grupo de IV, el nivel de h-AT fue máximo en el primer punto de obtención de muestras (5 minutos) y después, los niveles disminuyeron rápidamente con el tiempo hasta el día 10. El $T_{m\acute{a}x}$ (el tiempo hasta los niveles máximos) de h-AT en los grupos que recibieron h-AT SC sola o con hialuronidasa fue 48 horas y 24 horas, respectivamente. Estos resultados muestran que la hialuronidasa redujo el tiempo hasta la concentración plasmática máxima de h-AT en comparación con el grupo que recibió h-AT sola. Como se muestra en la tabla 4, la AUC en plasma de h-AT administrada por vía intravenosa fue de $164,1 \pm 14,3$ h*mg/ml (media \pm SD) y la de los grupos que recibieron h-AT por vía SC con y sin hialuronidasa fueron $131,3 \pm 26,4$ y $126,9 \pm 7,7$ h*mg/ml, respectivamente.

Tabla 4. Área bajo la curva (AUC)

Grupo	AUC (h-mg/ml) Media \pm SD
Alfa-1 AT: IV	164,1 \pm 14,3
Alfa-1 AT: SC	131,3 \pm 26,4*
Alfa-1 AT: SC (más hialuronidasa)	126,9 \pm 7,7*

*P < 0,05 en comparación con el grupo IV

50 Consistente con los resultados en el ejemplo 1 anterior, los resultados también muestran que las dosis iguales de h-AT administrada por vía IV y SC dan lugar a una AUC más baja (20%) para la administración SC en comparación con la AUC IV. Además, la coadministración de hialuronidasa y h-AT dio lugar a una reducción del 23% de la AUC en comparación con el grupo IV y una reducción casi similar en la AUC como la del grupo al que se ha administrado h-AT SC sola. Esto sugiere que la hialuronidasa no afectó significativamente a la AUC en comparación con el grupo al que se había administrado SC h-AT sola. Se puede concluir a partir de los resultados de este estudio que la hialuronidasa solo afecta al $T_{m\acute{a}x}$ pero no la AUC de la h-AT administrada SC en conejos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Alfa-1 antitripsina (α 1-AT) para su utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociada con la deficiencia de α 1-AT en un sujeto mediante administración subcutánea, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de la administración subcutánea de α 1-AT es, como mínimo, de aproximadamente el 120% de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT administrada por vía intravenosa, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es suficiente para mantener en el sujeto un nivel valle de α 1-AT en sangre, como mínimo, de aproximadamente 80 mg/dl, en la que la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de α 1-AT es de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 300 mg de α 1-AT por kg de peso corporal del sujeto.
- 10
2. α 1-AT para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la formulación es una formulación liofilizada para reconstituir antes de la administración.
- 15 3. α 1-AT para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la formulación comprende adicionalmente una hidrolasa.
- 20 4. α 1-AT para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la formulación comprende adicionalmente una hialuronidasa.

FIG. 1

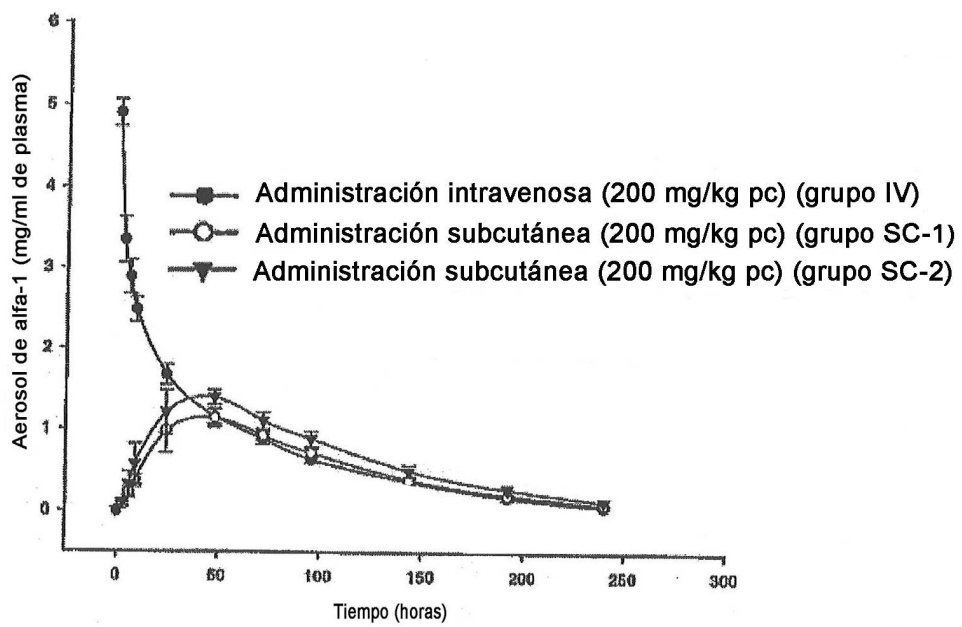


FIG. 2

Niveles de alfa-1 en plasma después de la administración subcutánea repetida en conejos

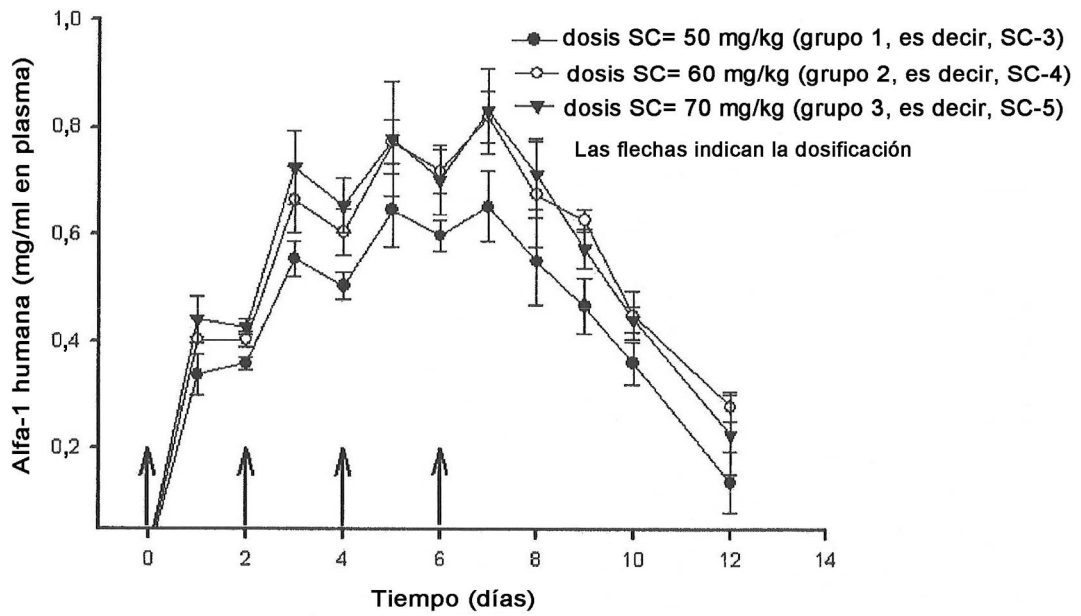


FIG. 3A

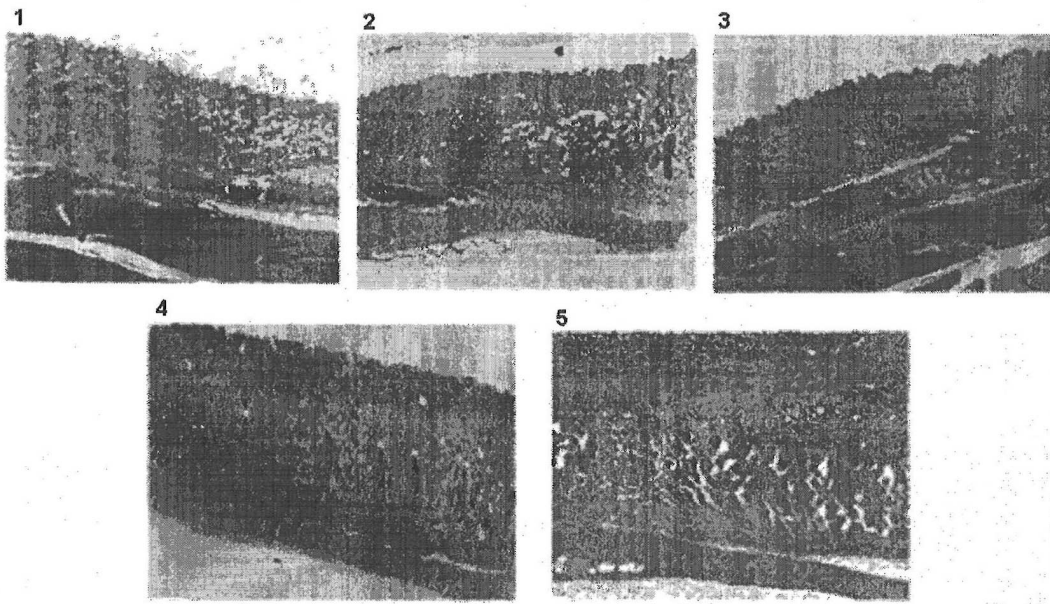


FIG. 3B

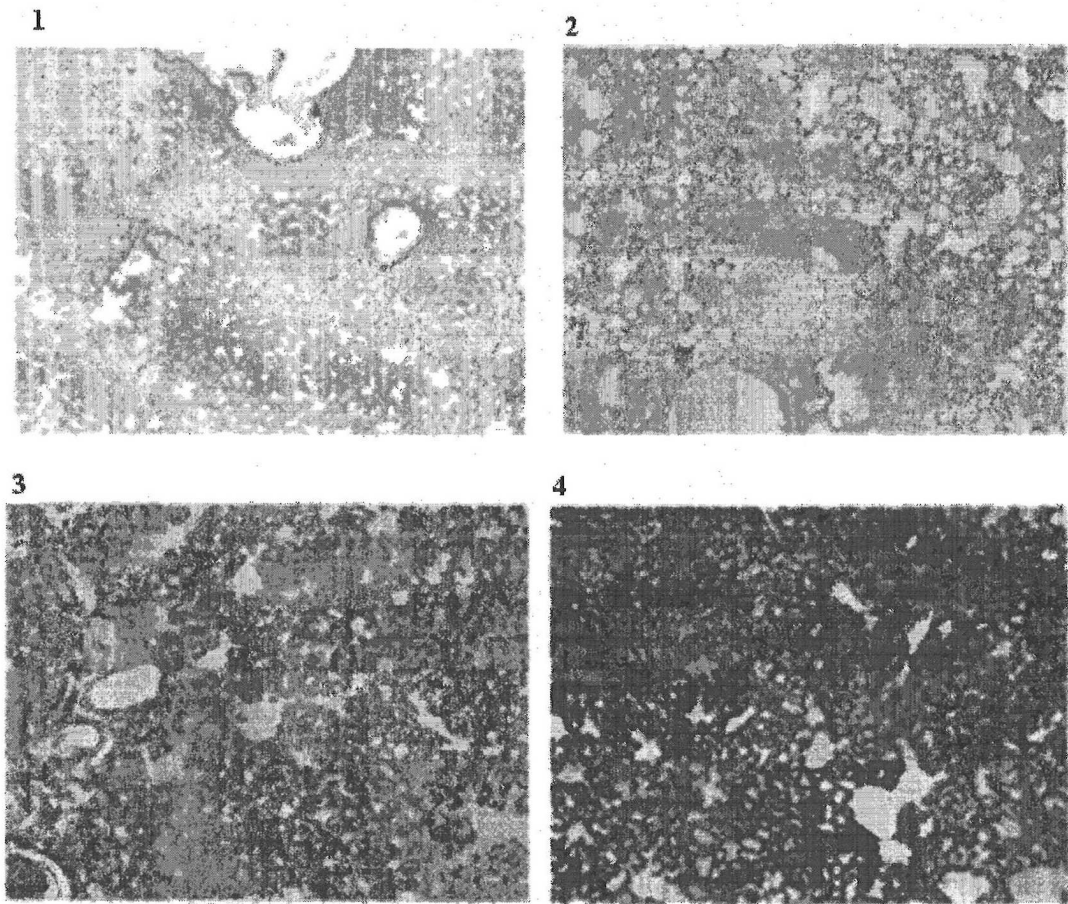


FIG. 4

