

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 231**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2009 PCT/US2009/004791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO2010021752**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2009 E 09808534 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2321640**

54 Título: **Formulación para administración oral de proteínas**

30 Prioridad:

21.08.2008 US 90831 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOGENICS LLC (100.0%)
501 Rockford Place
Corona del Mar, CA 92526, US**

72 Inventor/es:

**SIEGEL, MATTHEW, JOHN y
BERNER, BRET**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 616 231 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

Formulación para administración oral de proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y a composiciones para la estabilización de proteasas destinadas a la administración oral contra la degradación en el estómago y en el jugo gástrico y en otros fluidos fisiológicos que pueden oxidar y degradar estas proteínas. Por tanto, la presente invención se refiere a los campos de biología, química, biología molecular, química médica, medicina y farmacología.

Descripción de divulgaciones relacionadas

Se sabe que la administración oral de proteínas en el tracto gastrointestinal es problemática, como resultado de la mala estabilidad de las proteínas debido tanto al pH gástrico como a la digestión proteolítica por enzimas, así como la mala absorción. Se han realizado muchos intentos para administrar proteínas por vía oral o localmente en el estómago. Las patentes de Estados Unidos 7.291.598; 7.265.097 y 7.244.709, por ejemplo, todas utilizan nanopartículas que contienen chitosano para mejorar la absorción y la estabilidad de las proteínas en el tracto gastrointestinal (GI). En la patente de Estados Unidos 6.541.606 se utilizan proteínas cristalinas para evitar la degradación en el estómago y para el tratamiento de enfermedades del tracto GI y tratar la potencial bioadhesión a las placas de Peyer para mejorar la absorción de proteínas en el tracto GI. En la patente de Estados Unidos 7.351.741 se describen aditivos para mejorar la absorción de las proteínas en el tracto GI. En estas patentes se describen los problemas de estabilidad de las proteínas en el tracto GI debido al pH ácido en el estómago y debido a la digestión enzimática, así como a una mala absorción en el tracto GI. La inestabilidad de las proteínas en el tracto GI o el estómago debido a la oxidación o la digestión proteolítica no se describe en ninguna de las referencias mencionadas anteriormente.

La lactasa, una β -galactosidasa que metaboliza la lactosa, y la papaína, una proteasa de cisteína, ambas enzimas se administran por vía oral en forma de suplementos dietéticos. La lactasa es administrada como una ayuda digestiva para individuos que son deficientes en la capacidad de digerir la lactosa. Por ejemplo, la lactasa de *Aspergillus oryzae* se administra como Lactaid® (Pleasantville, NJ) como suplemento dietético y en las patentes de Estados Unidos 6.660.313 y 6.562.339 se describen formulaciones de lactasa para la administración oral en los suplementos dietéticos. La papaína, una proteasa de cisteína, se administra como una ayuda digestiva. Sin embargo, su temperatura óptima es 65 °C y no está claro que la papaína sea una enzima activa en el estómago.

En las patentes de Estados Unidos 7.320.788 y 7.303.871 se describe el uso de glutenasas, solo y en combinación, como enzimas administradas por vía oral para digerir el gluten para el tratamiento (y prevención de los síntomas) de celiaquía. Una de las enzimas descritas como glutenasa es una versión recombinante de una cisteína endoproteasa aislada originalmente a partir de cebada. En 1953, por primera vez se reconoció que la ingestión de gluten, una proteína de la dieta habitual presente en el trigo, la cebada y el centeno causa enfermedad en individuos sensibles. El gluten es una mezcla compleja de moléculas de glutenina y prolamina ricas en glutamina y prolina, que se piensa que es responsable de la inducción de la enfermedad. La ingestión de tales proteínas por individuos sensibles produce aplanamiento del revestimiento epitelial similar a un forro normalmente sustancioso del intestino delgado que se sabe que es responsable de la digestión terminal eficiente y extensa de péptidos y otros nutrientes. Los síntomas clínicos de la celiaquía incluyen fatiga, diarrea crónica, mala absorción de nutrientes, pérdida de peso, distensión abdominal, anemia, así como un riesgo sustancialmente mayor del desarrollo de osteoporosis y neoplasias malignas intestinales (linfoma y carcinoma). La enfermedad tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 200 en las poblaciones europeas.

Una enfermedad relacionada es la dermatitis herpetiforme, que es una erupción crónica caracterizada por grupos de vesículas intensamente pruriginosas, pápulas y lesiones similares a la urticaria similar. Los depósitos de IgA se producen en casi toda la piel de aspecto normal y perilesional. En del 75 al 90 % de los pacientes con dermatitis herpetiforme y en algunos de sus parientes se produce enteropatía sensible al gluten asintomática. El inicio suele ser gradual. El picor y el ardor son graves y el rascado a menudo oculta las lesiones primarias con eczematización de la piel cercana, lo que lleva a un diagnóstico erróneo de eccema. La adhesión estricta a una dieta libre de gluten durante períodos prolongados puede controlar la enfermedad en algunos pacientes. En ocasiones se prescribe dapsona, sulfapiridina y colchicina para el alivio del picor producido por la dermatitis herpetiforme.

La celiaquía y la dermatitis herpetiforme se consideran en general enfermedades autoinmunes y los anticuerpos que se encuentran en el suero de los pacientes indican una base inmunológica de la enfermedad. Los anticuerpos frente a la transglutaminasa tisular (tTG) y la gliadina aparecen en casi el 100 % de los pacientes con celiaquía activa y la presencia de tales anticuerpos, en particular de la clase IgA, se ha utilizado en el diagnóstico de la enfermedad.

La gran mayoría de los pacientes con celiaquía y dermatitis herpetiforme expresan las moléculas HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] y/o DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)]. Se cree que el daño intestinal está causado por las interacciones entre oligopéptidos específicos de gliadina y HLA-DQ2 o DQ8, que a su vez inducen proliferación de

linfocitos T en las capas subepiteliales. Las células T 1 colaboradoras y las citocinas aparentemente desempeñan un papel importante en un proceso inflamatorio local que conduce a la atrofia de las vellosidades del intestino delgado.

5 En la actualidad, el único tratamiento para la celiaquía es la estricta evitación de todos los alimentos que contienen gluten, aunque se están realizando ensayos clínicos de glutenasas. Aunque la retirada del gluten ha transformado el pronóstico para los niños con diagnóstico de celiaquía y mejorado sustancialmente para pacientes adultos, algunas personas aún mueren de la enfermedad, principalmente adultos con enfermedad grave desde el principio. Una causa importante de muerte es la enfermedad linforreticular (especialmente linfoma intestinal). No se sabe si una dieta libre de gluten disminuye este riesgo. La remisión clínica aparente se asocia a menudo con recaídas histológicas que se detectan únicamente mediante biopsias de revisión o mediante el aumento de los títulos de EMA.

15 El gluten es tan ampliamente utilizado, por ejemplo, en sopas comerciales, salsas, helados, perritos calientes y otros alimentos, que los pacientes necesitan listas detalladas de los productos alimenticios que deben evitar y asesoramiento experto de un dietista familiarizado con la celiaquía. La ingestión de pequeñas cantidades de gluten puede prevenir la remisión o inducir recaídas. También pueden ser necesarios suplementos de vitaminas, minerales y hematínicos, dependiendo del grado de deficiencia experimentado por un paciente particular. Unos pocos pacientes responden mal o nada a la retirada del gluten, ya sea porque el diagnóstico es incorrecto o porque la enfermedad es resistente. En este último caso, los corticosteroides orales (por ejemplo, prednisona 10 a 20 mg dos veces al día) pueden inducir respuesta.

25 Tal vez, la nueva terapia más prometedora en el desarrollo clínico es el uso de glutenasas como se describe en las patentes de Estados Unidos 7.320.788 y 7.303.871 (véanse también las publicaciones PCT N.º 2008/115428; 2008/115411; 2007/044906; y 2007/047303; y US 20080193436) para prevenir y/o tratar los síntomas de celiaquía y/o dermatitis herpetiforme mediante la disminución de los niveles de oligopéptidos tóxicos del gluten en los productos alimenticios, ya sea antes o después de la ingestión por un paciente. Estas publicaciones de patente describen que ciertos oligopéptidos del gluten son resistentes a la escisión por las enzimas gástricas y pancreáticas, que la presencia de tales péptidos en el intestino delgado da lugar a efectos tóxicos en la celiaquía (y la dermatitis herpetiforme) de los pacientes y que el tratamiento enzimático puede eliminar tales péptidos y sus efectos tóxicos. Por digestión con glutenasas, estos oligopéptidos tóxicos se escinden en fragmentos, lo que previene o alivia sus efectos tóxicos en los pacientes de celiaquía o dermatitis herpetiforme.

35 Muchas glutenasas comprenden residuos de cisteína y/o metionina y las proteínas que contienen cisteína o metionina pueden estar sujetos a oxidación durante el almacenamiento ya sea como la enzima a granel o como formas farmacéuticas, y las enzimas con cisteína en el sitio activo, específicamente las cisteína proteasas, se pueden inactivar mediante la oxidación de la cisteína. La estabilidad de estas proteínas durante el almacenamiento o después de la liofilización puede mejorarse mediante la adición de acetilcisteína o metionina para secuestrar el ataque de radicales libres.

40 Se sabe que diversos antioxidantes son útiles como conservantes durante el almacenamiento de productos farmacéuticos y alimentos, incluyendo antioxidantes que contienen azufre, tioles libres, tales como cisteína, homocisteína, tioglicerol, acetilcisteína, así como sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio y similares, disulfuros (tales como ditiotreitól y ácido α -lipoico, donde se pueden generar tioles libres), y otras clases de antioxidantes, tales como agentes quelantes, tales como EDTA, ácido ascórbico, ácido gálico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, y otros conocidos en la técnica porque se sabe que previenen la oxidación. La selección de un antioxidante que funciona para una proteína particular, a menudo no es predecible e implica ensayo y error.

50 Debido a la prevención de la oxidación en formas farmacéuticas implica volúmenes limitados de fármaco, cantidades pequeñas de antioxidante puede ser eficaz, ya que la concentración del antioxidante en la forma farmacéutica es relativamente grande. Sin embargo, la cantidad de antioxidante en la forma farmacéutica tendría una actividad insignificante en el volumen más grande del estómago, que puede ser 1 litro en volumen o más.

55 Se ha notificado que ciertas cisteína proteasas, en particular, papaína y ciertas catepsinas, están desactivadas por S-nitrosilación de la cisteína del sitio activo (véase Wang et al. (2000) JBC 2002 277(21):18568-73; Ascenzi et al. (2001) Curr. Protein Pept. Sci. 2: 137-153.; y Venturini et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 270: 437-441.). Se ha demostrado que ciertos donantes de NO que contienen sulfhidrilo inhiben de forma reversible esta enzima mediante la formación de enlaces S-NO en el sitio activo, Cys25. Esta inhibición se invirtió mediante ditiotreitól, pero no con ácido ascórbico. Los investigadores presumieron que un enlace disulfuro entre la papaína y el donante de S-NO era responsable de la inhibición.

60 Se ha demostrado que el nitrato en la saliva, en ratas, se convierte en nitrito, que después se puede convertir adicionalmente en NO al pH gástrico en ayunas de 2 (Bjorne et al. (2004) J. Clin. Invest. 113: 106-114). En tales condiciones, el aumento de la formación de NO a partir de nitritos y el aumento del flujo sanguíneo, presumiblemente mediado por NO, se observaron repetidamente. Se sabe que, desde el lado serosal, el óxido nítrico actúa en el estómago para influir en la motilidad gastrointestinal, posiblemente mediante la formación de intermedios de la proteína S-nitrosiltiol.

Por lo tanto, sigue habiendo la necesidad de formulaciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias que pueden mejorar la estabilidad de una proteína en el estómago alimentado. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas de una proteína adecuada para la administración oral que estabiliza la proteína en el estómago alimentado. La presente invención proporciona una formulación farmacéutica sólida de una endoproteinasa B2 de cebada (EPB2) o una forma recombinante de la misma adecuada para administración oral en forma de dosis unitaria que comprende un antioxidante que contiene azufre seleccionado de un sulfato, un tiol libre y el grupo que consiste en sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, N-acetilcisteína, homocisteína, cisteína, monotioglicerol, tiosulfato de sodio, ácido α -lipoico, y ditiotreitól. En diversas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende opcionalmente un agente quelante. En una realización, el agente quelante es EDTA. En otras realizaciones, el agente quelante es ácido cítrico.

En una realización, la endoproteasa de cebada EPB2 se mezcla con una proil endopeptidasa (PEP). En una realización, la PEP es PEP DE *Sphingomonas capsulata* o una forma modificada de dicha proteasa, o una versión recombinante de cualquiera de ellas. En una realización, la PEP es PEP de *Aspergillus niger* o una forma modificada de dicha proteasa, o una versión recombinante de cualquiera de ellas.

La presente invención es útil en un método para prevenir y/o tratar la celiaquía y/o dermatitis herpetiforme en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de administrar por vía oral una cisteína proteasa estabilizada que contiene la formulación farmacéutica de la invención a dicho paciente, simultáneamente con la ingestión de un producto alimenticio que contiene gluten por el paciente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona formas de dosis unitarias de las nuevas composiciones de la invención, como se define en las reivindicaciones. En diversas realizaciones, la forma de dosis unitaria se puede utilizar convenientemente en el método de la invención. Las formas farmacéuticas y las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para el tratamiento de mamíferos, así como de seres humanos.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la actividad de ALV001* (la forma activa de la proenzima ALV001) durante la incubación con el fluido gástrico posprandial.

La figura 2 muestra la actividad de ALV001 durante la incubación con el fluido gástrico posprandial.

La figura 3 es una transferencia Western de ALV001 que muestra la estabilización de ALV001 en el fluido gástrico posprandial con 1-tioglicerol.

La figura 4 muestra la actividad de ALV003 durante la incubación con el fluido gástrico posprandial en ausencia o presencia de 1-tioglicerol.

La figura 5 muestra la inversión de la pérdida de actividad enzimática con antioxidante.

La figura 6 muestra la estabilización de ALV001 en fluido gástrico posprandial con agentes reductores.

La figura 7 muestra la estabilización como en la figura 6, con tiosulfato de sodio a 0,5 mM, metabisulfito de sodio a 0,5 mM y ácido lipoico a 5 mM.

La figura 8 muestra un curso de tiempo para la estabilización con sulfito de sodio.

La figura 9 muestra una titulación de metabisulfito de sodio.

La figura 10 muestra una restauración de la actividad después de la adición de agentes reductores.

La figura 11 muestra una dependencia de la dosis de metabisulfito de sodio en la estabilización de ALV001.

La figura 12 muestra una titulación de metabisulfito en la concentración 2X de enzima ALV001.

La figura 13 muestra que el metabisulfito de sodio estabiliza la actividad de ALV001 en zumo de naranja. 3 mg/ml ALV001 se reconstituyeron en zumo de naranja con o sin metabisulfito de sodio 840 μ M. La actividad de la enzima cromogénica se midió en los puntos de tiempo indicados para determinar la cantidad relativa de enzima funcional.

La figura 14 muestra que la cisteína estabiliza la actividad de ALV001 en condiciones gástricas simuladas posprandiales. Una comida libre de gluten se masticó y escupió en el fluido gástrico en reposo. ALV003 y diferentes niveles de cisteína se añadieron a tiempo 0 y la estabilidad de la actividad ALV001 analizó mediante el control de actividad de la enzima cromogénica en el tiempo. La secreción de ácido gástrico se simuló durante todo el experimento.

La figura 15 muestra el estudio de estabilidad de ALV001. Se formularon 150 mg de enzima con 300 mg de ácido cítrico monohidrato y 8 mg de bisulfito de sodio se introdujeron en una botella de polipropileno y se sellaron en bolsas de aluminio. Un ensayo cromogénico se midió en puntos específicos de tiempo para evaluar la estabilidad.

Descripción detallada de la invención

65 En la técnica actual de la administración oral (la administración de una sustancia por vía oral, es decir, la administración oral) de las proteínas, no se ha tratado la estabilización en el tracto GI para evitar la oxidación de

proteínas; en cambio, el foco de los esfuerzos del pasado ha estado en la inestabilidad potencial de la proteína ingerida por vía oral de ácido o a la proteólisis mediante enzimas digestivas. Por lo tanto, la necesidad de proporcionar una estabilización adicional de las proteínas administradas por vía oral a la oxidación no se ha apreciado antes de la presente invención. Por otra parte, los beneficios de tal estabilización pueden ser particularmente beneficiosos, en particular para la administración oral de enzimas en el estómago con el fin de mejorar la proteólisis. La presente invención surgió al menos en parte del descubrimiento de que la oxidación puede desempeñar un papel clave en la degradación de tales enzimas administrados por vía oral.

La enzima ALV001, una forma modificada recombinante de la cisteína proteasa conocida como EPB2 de cebada, se inactivó rápidamente en los extractos *ex vivo* de fluido gástrico humano alimentado y a velocidades que eran significativamente más rápidas que las observadas a un pH similar (3 a 5) y el contenido de pepsina. Un aspecto de la presente invención surge del descubrimiento de que la adición de antioxidantes, en particular antioxidantes que contienen azufre, tales como sulfitos o tioles libres o agentes que generan tioles libres en el fluido gástrico, estabilizan ALV001 (y por lo tanto, otras cisteína proteasas y proteínas que contienen cisteína) en el fluido gástrico. Sorprendentemente, estos antioxidantes que contienen azufre también pueden regenerar la enzima activa a partir de ALV001 inactivada en fluido gástrico. Otros antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina (en los que el grupo sulfhidrilo está metilado) no estabilizaron (conservaron la actividad de) ALV001. El ETDA ayudó a estabilizar ALV001 en el fluido gástrico *ex vivo*, aunque en menor medida que los antioxidantes, y, por tanto, los agentes quelantes generalmente proporcionan cierta estabilización, solos o en combinación con un antioxidante, de acuerdo con la invención. Entre los antioxidantes, son particularmente eficaces en la estabilización de ALV001 el sulfito de sodio y el metabisulfito de sodio.

Como se usa en este documento, un "antioxidante" es una molécula capaz de ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Entre tales antioxidantes se incluyen, sin limitaciones, agentes reductores, ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipoico, melatonina, ácido úrico, carotenos, retinoides, tocoferoles y tocotrienoles, por ejemplo, α -tocoferol (vitamina E), la ubiquinona (coenzima Q), y similares.

Como se usa en el presente documento un "agente reductor" es cualquier compuesto en la subclase de compuestos antioxidantes fisiológicamente aceptables que reduce otra especie en una reacción redox (reducción-oxidación) y, al hacerlo, se oxida y, de este modo, sirve como donante de electrones en la reacción redox. Entre los agentes reductores incluyen, sin limitaciones, metionina, glutatiol, ditiotreitól, ditioueritrol, β -mercaptoetanol, metabisulfito de sodio, tioglicolato, cisteína, N-acetilcisteína, homocisteína, monotioglicerol, sulfito de sodio, bisulfito de potasio, tiosulfito de sodio, y similares. Algunos de estos agentes comprenden un grupo tiol libre (es decir, mercaptán), por ejemplo monotioglicerol, tiosulfito de sodio, metabisulfito de sodio, y similares. Los agentes que están en una forma oxidada, pero que comprenden un tiol libre en ácido incluyen, sin limitaciones, ácido α -lipoico, ditiotreitól, glutatiól, y similares.

Para ciertos antioxidantes, los niveles necesarios para actuar en un volumen de un litro del estómago requerirían una cantidad de antioxidante en la forma farmacéutica (o que deben tomarse acompañando a la forma farmacéutica) que son más grandes de lo que actualmente está aceptado por razones toxicológicas en la Guía de ingredientes inactivos de la FDA. En consecuencia, su uso en las composiciones de la invención requeriría, probablemente, pruebas clínicas adicionales del propio antioxidante. Por el contrario, los sulfitos y metabisulfitos, especialmente sus sales de sodio y de potasio y combinaciones, con su larga historia como conservantes en la industria alimentaria y su potencia inusual como agentes reductores de las cisteína proteasas como se describe en el presente documento, son excipientes farmacéuticos eficaces y aceptados.

En algunas realizaciones de la invención, el antioxidante se selecciona de sulfito de sodio, bisulfito de sodio, bisulfato de potasio, metabisulfito de potasio, tiosulfato de sodio, glutatiól, cisteína, homocisteína, ditionito de sodio, tioglicerol, y acetilcisteína, solos o en combinación. En otras realizaciones, un antioxidante que contiene azufre se selecciona del grupo que consiste en sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, N-acetilcisteína, homocisteína, cisteína, monotioglicerol, tiosulfato de sodio, ácido α -lipoico, y ditiotreitól. En algunas realizaciones, el antioxidante es metabisulfito de sodio.

La dosis de un antioxidante para los propósitos de la presente invención se puede determinar empíricamente mediante ensayos conocidos en la materia, por ejemplo mediante la prueba de un intervalo de dosis para el efecto estabilizante de una concentración conocida de proteína. Un experto en la técnica entenderá que el intervalo de dosificación dependerá del antioxidante específico. En algunas realizaciones, la dosis de antioxidante es al menos aproximadamente 2 mg por forma farmacéutica; al menos aproximadamente 5 mg por forma farmacéutica; al menos aproximadamente 10 mg por forma farmacéutica, al menos aproximadamente 50 mg por forma farmacéutica; y no más de aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica, por lo general no más de aproximadamente 300 mg por forma farmacéutica.

En algunas realizaciones, el antioxidante es metabisulfito de sodio, que puede estar presente a una concentración de aproximadamente 2-50 mg por forma farmacéutica, preferiblemente a desde aproximadamente 4-16 mg por forma farmacéutica, y, lo más preferiblemente, a de aproximadamente 6-10 mg por forma farmacéutica. En otras

realizaciones, el antioxidante es cisteína, que puede estar presente a una concentración de aproximadamente 5-400 mg por forma farmacéutica, preferiblemente a desde aproximadamente 10-350 mg por forma farmacéutica, y, lo más preferiblemente, a de aproximadamente 50-300 mg por forma farmacéutica.

5 En diversas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende opcionalmente un agente quelante. El agente quelante es un componente fisiológicamente aceptable. Entre los ejemplos del agente quelante se incluyen, sin limitaciones, ácido etilendiaminotetraacético, etilendiaminotetraacetato (EDTA), etilendiaminotetraacetato de sodio, EGTA, ácido fítico, ácido cítrico, por ejemplo, ácido cítrico anhidro, y similares. Estos pueden ser usados solos o en mezcla. En una realización, el agente quelante es EDTA.

10 La dosis de un agente quelante puede determinarse empíricamente mediante ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el ensayo un intervalo de dosis para el efecto de estabilización en una concentración conocida de proteína, por lo general en combinación con un antioxidante seleccionado. Un experto en la técnica entenderá que el intervalo de dosificación dependerá del agente quelante específico y de la proteína que se va a administrar.

15 En algunas realizaciones, la dosis es de al menos aproximadamente 5 mg por forma farmacéutica; al menos aproximadamente 10 mg por forma farmacéutica; al menos aproximadamente 50 mg por forma farmacéutica, al menos aproximadamente 100 mg por forma farmacéutica; y no más de aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica, por lo general no más de aproximadamente 300 mg por forma farmacéutica.

20 En algunas realizaciones, el agente quelante es ácido cítrico, por ejemplo, ácido cítrico anhidro, monohidrato de ácido cítrico, que puede estar presente a una dosis de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica, por lo general a una dosis de aproximadamente 25 a 350 mg por forma farmacéutica, y se pueden proporcionar a una dosis de aproximadamente 45 - 275 mg por forma farmacéutica.

25 En las formulaciones de la presente invención, un antioxidante, por ejemplo, un agente reductor como se ha descrito anteriormente, se proporciona a una concentración eficaz para estabilizar el agente activo de la proteasa cuando se expone al fluido gástrico, particularmente cuando se expone a fluido gástrico posprandial. Las formulaciones están destinadas para su uso *in vivo*. Sin embargo, por conveniencia, la estabilidad se puede analizar *in vitro*, por ejemplo, mediante la combinación de la proteasa con fluido gástrico posprandial y la evaluación de la actividad proteolítica en un período de tiempo adecuado, por ejemplo, durante aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, o más. Una concentración eficaz es suficiente para mantener al menos aproximadamente 25 % de la actividad enzimática de partida, al menos aproximadamente 50 % de la actividad enzimática de partida, al menos aproximadamente 75 % de la actividad enzimática de partida, o al menos aproximadamente 90 % de la actividad enzimática de partida, o es suficiente sustancialmente para mantener

30 la actividad original durante al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, o más.

35

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevas formulaciones de proteínas adecuadas para administración oral, en las que las proteínas son más resistentes a la degradación oxidativa que las composiciones actualmente disponibles. Los expertos en la técnica apreciarán que este descubrimiento puede aumentar el potencial terapéutico de una amplia variedad de proteínas para administración oral, dado que las pruebas o las propiedades anteriores de una proteína pueden haber indicado que la proteína no proporcionaría un beneficio terapéutico en la administración oral. Por ejemplo, aunque la papaina se comercializa como un nutracéutico, no ha encontrado uso como agente terapéutico. A pesar de su alta temperatura óptima, la papaina puede proporcionar un beneficio terapéutico si se administra en una formulación de la invención.

40

45 Por tanto, los expertos en la técnica apreciarán que la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas de una proteína como se define en las reivindicaciones adecuadas para administración oral, que estabilizan la proteína en el estómago alimentado. En una realización, la formulación comprende, además de la proteína, un antioxidante que contiene azufre y/o un agente quelante.

50

Se ha notificado que las cisteína proteasas son útiles para diversos propósitos terapéuticos. Por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 6.241.973 se describen cisteína proteasas útiles para blanquear los dientes. La publicación PCT n.º WO 2004/058816 describe cisteína proteasas útiles en las vacunas contra fasciola hepática. La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. N.º 20080039400 describe cisteína proteasas útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y otras afecciones. La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. N.º describe cisteína proteasas útiles en el tratamiento de la intolerancia a los alimentos. La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. N.º 20070148267 describe cisteína proteasas útiles en la regulación de la ingesta de alimentos. La publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. N.º 20060134017 y 20060134018 describen cisteína proteasas útiles en la prevención de la adhesión bacteriana a superficies biológicas, es decir, para la prevención de la formación de placa. Las cisteína proteasas también se han descrito para tratamientos sistémicos, incluyendo, por ejemplo, la inducción de la apoptosis en tipos de cáncer. Las composiciones de la invención son, por consiguiente, útiles en tales métodos.

55

60

La endoproteasa de cebada EPB2 o una forma recombinante de la misma es una proteasa capaz de digerir un péptido de gluten que es tóxico para un paciente de celiaquía en fragmentos no tóxicos, ya sea solo o en combinación con otra proteasa.

65

Tal como se utiliza en el presente documento, una "formulación farmacéutica", o "forma farmacéutica" incluye cualquier formulación destinada a la administración a seres humanos o mamíferos y, por lo tanto, incluye no solamente las formulaciones que se someten a pruebas clínicas y la aprobación de las autoridades reguladoras, tales como la FDA, sino también formulaciones que no requieren la aprobación regulatoria, tales como nutracéuticos.

Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones de la invención, incluyendo formulaciones farmacéuticas y formas farmacéuticas, pueden también incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos habitualmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o a seres humanos. El diluyente se selecciona de manera que no afecte adversamente a la actividad biológica de la proteasa. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, agua tamponada, solución salina fisiológica, PBS, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos, excipientes y similares. Las composiciones también pueden incluir sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tampón, agentes de ajuste de la toxicidad, agentes humectantes y detergentes.

Las composiciones de la invención también pueden incluir cualquiera de diversos agentes estabilizantes, tales como un antioxidante, por ejemplo. Las proteínas o polipéptidos en una composición de la invención también pueden formar complejos con moléculas que mejoran sus atributos in vivo. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso), y lípidos.

Orientación adicional con respecto a las formulaciones que son adecuadas para diferentes tipos de administración se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de los procedimientos para la liberación de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Para la administración oral, el principio activo se puede administrar por vía oral en formas farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, tal como en un sobre o en pulverización, o en formas farmacéuticas líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El o los componentes activos se pueden encapsular en cápsulas de gelatina o hipromelosa junto con los ingredientes inactivos y vehículos en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio. Ejemplos de ingredientes activos adicionales que se pueden añadir para proporcionar un color, gusto, estabilidad, capacidad tampón, dispersión y otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato sódico, dióxido de titanio y tinta blanca comestible. Se pueden usar diluyentes similares para formar pastillas comprimidas. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar en forma de productos de liberación sostenida, para proporcionar la liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Las pastillas comprimidas pueden estar recubiertas con azúcar o recubiertas con película para enmascarar el gusto y proteger el comprimido de la atmósfera, o con recubrimiento entérico para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden contener agentes colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación por el paciente.

Los componentes utilizados para formular las composiciones farmacéuticas de la invención son, preferiblemente, de alta pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente nocivos (por ejemplo, normalmente al menos de calidad de National Food (NF), generalmente al menos de calidad analítica, y, más normalmente, al menos de calidad farmacéutica). En la medida en que un compuesto dado tiene que sintetizarse antes de su uso, el producto resultante está normalmente sustancialmente libre de cualquier agente potencialmente tóxico, en particular cualquier endotoxina, que pueden estar presentes durante el proceso de síntesis o purificación.

Las formulaciones nutracéuticas se definen como "un alimento o parte de un alimento que ofrece beneficios médicos y/o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de enfermedades". (Dr. Stephen DeFelice, director of Foundation for Innovation In Medicine). Los productos van desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas, a alimentos manipulados genéticamente, alimentos funcionales, productos a base de hierbas y alimentos procesados, tales como cereales, sopas y bebidas. Los alimentos funcionales, el término más popular entre los consumidores pero no una categoría de producto claramente delineada, los define Clare Hasler, doctorada por la University of Illinois, como alimentos que incluye "cualquier alimento, o ingrediente alimentario modificado, que pueden proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene". Las formulaciones nutracéuticas de interés incluyen alimentos para uso veterinario o humano, tales como las barras de alimentos saludables, bebidas y suplementos de bebidas, y similares. Estos alimentos se han potenciado mediante la inclusión de una proteasa biológicamente activa en una composición como se proporciona en el presente documento.

Cuando la forma farmacéutica o las formas farmacéuticas son para el tratamiento de la celiacía y contienen la enzima ALV001, al menos una forma farmacéutica puede contener ALV001 solo o en combinación con ALV002. El contenido total de ALV001 administrada con una comida cuando ALV001 se administra sin ALV002 es de 50 a 2.000

mg de la proteína ALV001, preferiblemente entre 100 y 1.000 mg, y aún más preferiblemente entre 100 y 600 mg de ALV001. Cuando ALV001 y ALV002 se administran en una combinación, ya sea en la misma o en distintas formas farmacéuticas, se pueden administrar en una proporción de 10:1 a 1:10, más preferiblemente de 3:1 a 1:3, y, lo más preferiblemente, en una proporción de 1,5:1 a 1:1,5. Si se administra en una proporción de de aproximadamente 1:1, el contenido total de enzima administrada con una comida puede ser de 50 a 2.000 mg, más preferiblemente de 50 a 900 mg, y lo más preferiblemente de 100 a 400 mg.

La actividad proteolítica de ALV001 a 25 °C contra el sustrato cromogénico Z-Phe-Arg-pNA se evalúa mediante la medición de la tasa de cambio en la absorbancia de la luz a 410 nm. El método se basa en la liberación de para-nitroanilina (pNA, 4-nitroanilina) en solución, que absorbe la luz a 410 nm. La especificación es ≥ 5.000 u/mg para ALV001.

La actividad proteolítica de ALV002 a 25 °C contra el sustrato cromogénico Z-Gly-Pro-pNA se evalúa mediante la medición de la tasa de cambio en la absorbancia de la luz a 410 nm. El método se basa en la liberación de para-nitroanilina (pNA, 4-nitroanilina) en solución, que absorbe la luz a 410 nm. La especificación es ≥ 3.000 u/mg para ALV002.

La presente invención proporciona un método para prevenir y/o tratar la celiaquía y/o la dermatitis herpetiforme en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de administrar por vía oral una cisteína proteasa estabilizada que contiene la formulación farmacéutica de la invención, en la que la formulación se estabiliza con un antioxidante, y en la que la proteasa es capaz de degradar gluten en fragmentos no tóxicos para pacientes celíacos tras la administración oral, a dicho paciente simultáneamente con la ingestión por un paciente de un producto alimenticio que contiene gluten. Las patentes de Estados Unidos n.º 7.320.788 y 7.303.871 describen métodos para la identificación de proteasas capaces de degradar el gluten en fragmentos no tóxicos para los pacientes de celiaquía.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas y formas farmacéuticas, es decir, formas de dosis unitarias, de las nuevas composiciones descritas en el presente documento. En diversas realizaciones, la forma de dosis unitaria se puede utilizar convenientemente en el método de la presente divulgación.

Ejemplos

1. Demostración de la inestabilidad de ALV001 en fluido gástrico humano posprandial

Los fluidos gástricos posprandiales humanas congeladas se descongelaron y se centrifugaron a 21.000 g durante 5 minutos para sedimentar el material insoluble y el sobrenadante se utilizó para este ejemplo. Se añadieron entre 50 y 200 μ l de fluido gástrico a los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C. Cuando se añadieron antioxidantes, se añadieron en esta etapa. ALV001 o ALV001 activado* (véase la solicitud de patente PCT N.º 2008/003425 con respecto a cómo ALV001* (la forma activa de ALV001) se produce tras la escisión proteolítica de ALV001) se disolvió en una proporción de 20 μ l de agua/mg de polvo, la concentración se midió mediante la absorbancia a 280 nm y se añadió la proteína al fluido gástrico a una concentración de 0,1 a 0,3 mg/ml. En el tiempo de obtención de muestras especificado, una muestra de 1,6 μ l de fluido gástrico se diluyó en tampón de ensayo para dar un volumen final de 280 μ l, y la concentración se midió mediante un ensayo de actividad cromogénica utilizando Z-Phe-Arg-p-nitroanilina (pNA) como sustrato. El método se basa en la capacidad de pNA para absorber a 410 nm cuando se libera del sustrato. ALV001 es la proenzima o cimógeno para la endoproteasa B (isoforma 2) que escinde el lado C-terminal de la arginina en la secuencia Phe-Arg. La escisión enzimática y la posterior liberación de pNA pueden controlarse mediante el cambio de absorbancia a 410 nm. Para determinar la velocidad de reacción, la absorbancia a 410 nm se midió cada 10 segundos durante 1 minuto. La pendiente de la línea de regresión dividida por la concentración de la enzima era la actividad enzimática indicada.

La estabilidad de ALV001* en el fluido gástrico humano se analizó para 4 voluntarios sanos en ayunas y a los 15, 30, 45, 60, 75, y 90 minutos después de una comida. El fluido gástrico se retiró de estos temas a través de una sonda nasogástrica. Se midió la actividad enzimática de ALV001 después de 1,5, 5, 10, 20, y 60 minutos de la adición al fluido gástrico. También se realizaron transferencias Western para investigar la degradación proteolítica de ALV001* en el fluido gástrico.

La figura 1 muestra que la actividad de ALV001* era solo detectable en el fluido gástrico posprandial de 15 y 30 minutos del sujeto 4 e incluso entonces desapareció después de 20 minutos de incubación. Se observaron resultados similares para los otros 3 sujetos y con la adición del cimógeno, ALV001. En el fluido gástrico en ayunas, se esperaba una rápida degradación enzimática de ALV001* debido al pH bajo, por ejemplo, pH 1,3 para el sujeto 4, y el contenido de pepsina. El fluido gástrico posprandial tiene un aumento transitorio de pH al intervalo de 3,5 o 4 o incluso mayor, y en este mayor pH, se reduce la actividad de la pepsina, y cabe esperar que ALV001* sea más resistente a la digestión proteolítica y a la degradación por la acidez.

Como se muestra en la Figura 2, para el sujeto 1 en la muestra posprandial de 15 minutos a pH 4,0, mediante el ensayo cromogénico, se demostró que la enzima ALV001 se inactivaba rápidamente, pero la enzima todavía estaba intacta, medida mediante transferencia Western, mostrada en Figura 3. En el mismo sujeto, en las muestras

gástricas posprandiales de 30 y 60 minutos, que estaban a pH de 2,5 y 1,2, respectivamente, la enzima estaba inactiva y había sufrido proteólisis. Se obtuvieron Datos similares con las muestras de otros pacientes. La conclusión fue que una pérdida inesperada de la actividad enzimática de esta cisteína proteasa ALV001 en las primeras muestras de fluido gástrico posprandial era el resultado de un mecanismo que no estaba relacionado con la proteólisis.

2. Demostración de estabilización de ALV001 en fluido gástrico posprandial por 1-tioglicerol (monotioglicerol)

La figura 4 muestra los resultados de la adición de un intervalo de concentraciones de monotioglicerol (MTG), de 0,01 a 50 mM, a los pocillos de fluido gástrico posprandial de 15 minutos como se ha descrito anteriormente. También se incluyó un control sin MTG. La tasa de pérdida de la actividad enzimática de ALV001 disminuyó con el aumento de las concentraciones de MTG sin pérdida a MTG 50 mM. Por lo tanto, el antioxidante MTG evitó la pérdida de la actividad enzimática de esta cisteína proteasa.

Además, como se muestra en la Figura 5, la preincubación de ALV003, una combinación de ALV001 y ALV002 (una forma recombinante de prolil endopeptidasa de Sphingomonas) a una relación de aproximadamente de la enzima 1:1, en fluido gástrico posprandial de 15 minutos, seguido de la adición de MTG 50 mM frente a ninguna adición mostró que el antioxidante MTG podría revertir la pérdida de actividad enzimática de ALV001*. Después de aproximadamente 20 minutos, la adición de MTG a ALV001* no funcional preincubado, se restauró caso toda la actividad enzimática.

3. Demostración de estabilización de ALV001 en fluido gástrico posprandial mediante determinados agentes reductores

Numerosos agentes reductores, en particular, N-acetilcisteína, L-cisteína, homocisteína, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP), ácido lipoico, tiosulfato de sodio, sulfito de sodio, y metabisulfito de sodio, demostraron todos ellos que estabilizaban ALV001* en el fluido gástrico posprandial temprano. En contraste, L-metionina y el ácido ascórbico no estabilizaron la enzima. El EDTA potenció la estabilidad de ALV001*, lo que sugiere una dependencia de metales para la inactivación.

Mostrado en la figura 6, determinados agentes reductores se añadieron en 5 mM al fluido gástrico posprandial ex vivo que se obtuvo de un voluntario sano 15 minutos después de comer y se incubó a 37 °C. La proenzima ALV001 se añadió al fluido gástrico. El tampón acetato a pH 4,5 se utilizó como control, porque ALV001 está completamente activada en estas condiciones. Se tomaron muestras para determinar la actividad de ALV001 después de 1,5, 5, 10, 20, 45 minutos.

Como se puede ver en la figura, la cisteína proteasa ALV001 era completamente activa en tampón de acetato. En contraste, la enzima se inactiva rápidamente en agua, gluten, e incluso con la adición de ácido ascórbico, un antioxidante. Hay evidencia de la estabilización con el agente quelante, EDTA. Se observaron mejoras sustanciales en la estabilidad con los agentes reductores, cisteína y N-acetilcisteína, y la estabilización más eficaz se demostró con el agente reductor sulfito de sodio.

Como se muestra en la Figura 7, en un segundo conjunto de pruebas realizadas de la misma manera, se demostró que el tiosulfato de sodio a 0,5 mM, metabisulfito de sodio a 0,5 mM, y el ácido lipoico en 5 mM mejoraban la estabilidad de ALV001 en fluido gástrico posprandial.

Como se muestra en la Figura 8, el sulfito de sodio era un agente reductor particularmente eficaz para estabilizar la ALV001, persistiendo la eficacia hasta 0,05 mM. El metabisulfito de sodio mejoró la estabilidad de ALV001 incluso a concentraciones de 50 µM.

Como se muestra en la figura 9, en otra serie de prueba se examinó la capacidad de estos agentes reductores y un agente quelante para invertir la degradación de ALV001 en el fluido gástrico. Se añadió ALV001 al fluido gástrico posprandial y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Los agentes reductores se añadieron a 5 mM a al fluido gástricos y, después, se tomaron muestras para examinar la actividad de ALV001 a 1,5, 5, 10, 20, y 40 minutos después de la adición de los agentes reductores. El control de tampón y EDTA no restauraron la actividad enzimática y el sulfito de sodio y la acetilcisteína restauraron parcialmente la actividad enzimática.

Como se muestra en la figura 11, la dependencia de la dosis de metabisulfito de sodio y la estabilidad mejorada de ALV001 a 0,12 mg/ml se midió en fluido gástrico posprandial. Las muestras se recogieron a 1,5, 5, 10, 20 y 40 minutos. Aunque el metabisulfito de sodio proporcionó estabilización considerable, incluso a 25 µM, se observó la mejor estabilización a 50 µM. Esta prueba se repitió a dos veces la concentración de la enzima para asegurar que el efecto no dependía de la concentración de la enzima, la Figura 12.

4. Prueba de la estabilidad de la forma farmacéutica

65 mg de ALV003, una mezcla que consiste en 38 mg de ALV001 (Lote A031207) y 27 mg de ALV002 (Lote B061707) se pesaron en cada tamaño de cápsulas de hipromelosa 0 (Qualicaps). Para un conjunto de cápsulas, primero se añadieron 0,8 mg por cápsula de metabisulfito de sodio (Spectrum, Lote WG 0855) al polvo de ALV003 y se mezcló a mano con una espátula antes de la colocación en las cápsulas. Las cápsulas de hipromelosa se introdujeron en viales de 30 ml de polipropileno con botes de 1 g de desecante (Sorb-It). Los viales se transfirieron a cámaras de estabilidad a 25 °C/60 % de HR y 40 °C/75 % de HR. Las muestras fueron retiradas a los intervalos inicial (T = 0), 2, 4 y 8 semanas para el análisis de la actividad enzimática.

5. Metabisulfito de sodio en el zumo de uva como antioxidante

Las composiciones de la invención incluyen productos alimenticios modificados para contener una proteasa terapéutica y un anti-oxidante, agente reductor, y/o agente quelante. Este ejemplo ilustra el uso del agente reductor metabisulfito de sodio en combinación con la cisteína proteasa ALV001 tomada o mezclada con zumo de uva y otros zumos. Para demostrar la capacidad de estabilizar ALV001 en el fluido gástrico por el zumo de uva, como un ejemplo, se realizó el siguiente experimento. ALV001 se preparó en agua a 20µl/mg de polvo o aproximadamente 9,5 mg/ml. En una placa de 96 pocillos se añadieron 54µl fluido gástrico posprandial de 15 minutos pre-incubado a 37 °C, 5 µl de jugo y 2,66 µl de ALV001 diluido a 1: 1 con agua. Los zumos analizados eran zumo de uva blanca espumoso (Welch's), zumo de uva blanca (Welch's), zumo de uva blanca (Safeway), zumo de lima Realime y zumo de limón (Safeway). Estos zumos de frutas contienen metabisulfito como conservante. Se usó agua como control. El control de agua mostró la rápida degradación habitual de ALV001 en fluido gástrico posprandial. El zumo de lima y de limón mostró degradación más lenta de ALV001 y los 3 zumos de uva se mantuvieron estables durante el transcurso de tiempo de 20 minutos de la prueba.

Por lo tanto, en una realización de la invención, se administra ALV003 u otra glutenasa (por ejemplo, 300 mg de fármaco) en una cápsula de HPMC y se toma con un vaso, de aproximadamente 100 a 250 ml o más, de zumo de uva.

6. Metabisulfito de sodio en zumo de naranja como antioxidante

3 mg/ml ALV001 se reconstituyeron en zumo de naranja con o sin metabisulfito de sodio 840 µM. La actividad enzimática cromogénico se midió como se ha descrito anteriormente, en los puntos de tiempo indicados, para determinar la cantidad relativa de enzima funcional, como se muestra en la Figura 13. Los datos muestran una mayor estabilidad en presencia de metabisulfito de sodio.

7. Cisteína como antioxidante

Una comida libre de gluten se masticó y escupió en el fluido gástrico en reposo. ALV003 y diferentes niveles de cisteína se añadieron a tiempo 0 y la estabilidad de la actividad ALV001 se midió mediante el control de actividad de la enzima cromogénica en el tiempo. La secreción de ácido gástrico se simuló durante todo el experimento. Como se muestra en la figura 14 muestra que la cisteína estabiliza la actividad de ALV001 en estas condiciones gástricas simuladas posprandiales.

8. Ácido cítrico monohidrato y bisulfito de sodio como antioxidante

Se formularon 150 mg de enzima (ALV001) con 300 mg de ácido cítrico monohidrato y 8 mg de metabisulfito de sodio se introdujeron en una botella de polipropileno y se sellaron en bolsas de aluminio. Un ensayo cromogénico se midió en puntos específicos de tiempo para evaluar la estabilidad, como se muestra en la figura 15.

9. Formas farmacéuticas

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene 300 mg o 900 mg de ALV003, opcionalmente en forma de comprimido, con manitol y celulosa microcristalina añadidos y 8 mg de metabisulfito de sodio.

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene un polvo liofilizado de ALV001 en el que se había añadido metabisulfito de sodio a la solución antes de la liofilización en lugar de monoglicérol en una proporción de 100:8 (p/p) a una proporción de 900:4 (p/p).

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene un polvo liofilizado de ALV001 en el que se había añadido metabisulfito de sodio a la solución antes de la liofilización en lugar de monoglicérol en una proporción de 100:8 (p/p) a una proporción de 900:4 (p/p).

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene liberación inmediata de ALV001 en un intervalo de 100 a 900 mg y metabisulfito de sodio en un rango de 1 a 10 mg.

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene liberación controlada de ALV001 en un intervalo de 100 a 900 mg y metabisulfito de sodio en un rango de 1 a 10 mg, liberados de 30 minutos a 6 horas.

5 La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene liberación controlada de ALV001 en un intervalo de 100 a 900 mg y metabisulfito de sodio en un rango de 1 a 10 mg, liberados de 30 minutos a 6 horas.

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene liberación pulsada de ALV001 en un intervalo de 100 a 900 mg y metabisulfito de sodio en un rango de 1 a 10 mg en un pulso de liberación inmediata y un segundo pulso liberado de 20 minutos a 6 horas después.

10 La presente divulgación proporciona una forma farmacéutica que contiene una proteasa y una cantidad de un antioxidante que alcanza una concentración de antioxidante de al menos 30, 50, 100, o 200 μM en el estómago.

15 La presente divulgación proporciona una forma farmacéutica que contiene una proteasa y una cantidad de un compuesto que genera una concentración de tiol libre de al menos 100, 200 o 500 μM en el estómago.

La presente invención proporciona una forma farmacéutica que contiene metabisulfito de sodio y puede contener tanto ALV001 como ALV002, donde un componente enzimático se formula para proporcionar una liberación inmediata y el otro componente enzimático se libera de forma pulsada o para proporcionar una liberación controlada.

20 Todas las formas farmacéuticas de ALV001 anteriores pueden también modificarse para incluir una segunda proteasa. En una realización, la segunda proteasa es una prolil endopeptidasa (PEP). En una realización, la PEP es PEP de *Sphingomonas capsulata*, por ejemplo y sin limitaciones, como se describe en la publicación de PCT n.º 2008/115411. En diversas realizaciones, entre 1-2.000 mg de PEP y ALV001 se dosifican en una relación PEP:ALV001 en peso de de entre 1:100 a 100:1, más preferiblemente entre 1:20 a 20:1, más preferiblemente entre 1:5 y 5:1, y, lo más preferiblemente, a una proporción de 1:1. En una realización, la forma farmacéutica se construye de manera que ALV001 y el antioxidante, por ejemplo, metabisulfito de sodio, se liberan inmediatamente y el PEP se libera de forma inmediata; o se entrega en uno o más, pulsos cortos tardíos (a partir de 10 minutos a 3 horas); o se libera según un modo de liberación sostenida durante 10 minutos a 3 horas.

30 En una realización, la presente divulgación proporciona una forma farmacéutica en la que el antioxidante es un antioxidante que no es metabisulfito de sodio.

35 La presente divulgación proporciona formas farmacéuticas oral que comprenden una proteína y un antioxidante seleccionados del grupo que consiste en sulfito de sodio, bisulfito de sodio, bisulfato de potasio, metabisulfito de potasio, solo o combinación; tiosulfato de sodio; glutatión, cisteína, homocisteína, ditionito de sodio, tioglicerol; y acetilcisteína

40 La presente divulgación proporcionar de rodillos gránulos compactos o gránulos de la enzima. El antioxidante puede estar contenido en los gránulos o sedimentos o mezclado con los gránulos o sedimentos y, o bien se cargan o comprimen una forma farmacéutica.

45 Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden estar en la forma de, por ejemplo y sin limitación, partículas, partículas en cápsula o bolsita, o comprimido. Los comprimidos pueden ser de una sola capa, de dos capas, o de múltiples capas y pueden estar recubiertos o sin recubrir. La formulación puede, por ejemplo y sin limitaciones, añadirse a un alimento o bebida y, después, administrarse, por ejemplo, como una formulación en polvo o gránulo rociada o como una extensión en forma de una mermelada o en polvo. Una cápsula de bajo contenido en agua puede ser deseable para la estabilidad, y se pueden usar cápsulas de hipromelosa, HPMC, de tamaño 1, 0, o 00. Las cápsulas pueden envasarse en un ambiente seco, ya sea con desecante o paquetes de desecantes o en blíster con nitrógeno seco o en otro entorno seco.

50 Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un lubricante, tal como estearato de magnesio, ácido esteárico, fumarato de estearilo de sodio o lactilato de estearilo de sodio, aceite vegetal hidrogenado (tal como, triglicéridos hidrogenados y refinados de ácidos esteárico y palmítico). Estos pueden ser de 0,3 a 5% del peso de la forma farmacéutica. Si hay manitol contenido a una concentración alta en el polvo liofilizado, pueden usarse las concentraciones más altas de lubricante.

55 La cisteína proteasa de (u otro ingrediente farmacéutico activo de otra proteína) en polvo se puede mezclar con lubricante u otros excipientes, tales como un relleno o aglutinante y se granula. Si la cisteína proteasa es inestable con agua y la temperatura, se pueden compactar con rodillo en gránulos, si es necesario mediante el uso de rodillos refrigerados para la estabilidad. Opcionalmente, se puede incluir un agente que modifica o controla el pH, al menos durante los primeros minutos después de que la forma farmacéutica está en el tracto GI, para facilitar la activación de las proteínas de cimógeno como ALV001.

65 Las cargas, tales como fosfato dicálcico, celulosa microcristalina, maltodextrinas, manitol, lactosa, sacarosa, trehalosa se pueden incluir y mezclar con los polvos o incluirse en el polvo liofilizado o polvo secado por

pulverización. Estas cargas hidrofílicas, tales como celulosa microcristalina, pueden evitarse para ciertas enzimas, tales como ALV001.

5 Los excipientes de liberación controlada se pueden mezclar para formar matrices poliméricas que contienen el fármaco. Estas matrices pueden ser de aproximadamente 1 mm de diámetro con respecto al tamaño de un comprimido completo 10 a 12 mm de ancho y hasta 1,8 cm o más de longitud. Estas matrices pueden proporcionar de liberación prolongada en el estómago siendo retenido con comida para V2 a 8 horas, dependiendo del tamaño. Estas matrices pueden o no pueden ser hinchables. Si los polímeros hidrófilos de liberación prolongada hinchables que son apropiados incluyen polímeros de celulosa y sus derivados (tales como por ejemplo hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina, polisacáridos y sus derivados, óxidos de polialquileo, polietilenglicoles, quitosano, poli(alcohol vinílico), goma xantana, copolímeros de anhídrido maleico, poli(vinilpirrolidona), almidón y polímeros a base de almidón, poli(2-etil-2-oxazolona), poli(etilenimina), hidrogeles de poliuretano y ácidos poliacrílicos reticulados y sus derivados. Otros ejemplos son copolímeros de los polímeros mencionados en la frase precedente, incluyendo copolímeros de bloque y polímeros injertados. Los recubrimientos de liberación extendida también se podrían preparar sobre estas partículas utilizando algunos de los polímeros anteriores.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica sólida de una endoproteinasa B2 de cebada (EPB2) o una forma recombinante de la misma, adecuada para administración oral en forma de dosis unitaria, que comprende un antioxidante que contiene azufre seleccionado de un sulfato, un tiol libre y el grupo que consiste en sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, N-acetilcisteína, homocisteína, cisteína, monotioglicerol, tiosulfato de sodio, ácido α -lipoico y ditiotreitól.
- 10 2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho antioxidante está presente en una dosis de al menos aproximadamente 2 mg por forma farmacéutica a no más de aproximadamente 500 mg por forma farmacéutica.
- 15 3. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho antioxidante que contiene azufre es metabisulfito de sodio, que está presente a razón de aproximadamente 2 - 50 mg por forma farmacéutica.
- 15 4. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho antioxidante que contiene azufre es cisteína, que está presente a razón de aproximadamente 5 - 400 mg por forma farmacéutica.
- 20 5. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende un quelante.
- 20 6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el quelante es EDTA o ácido cítrico.
- 25 7. La formulación farmacéutica de la reivindicación 6, en la que dicho quelante está presente en una dosis de al menos aproximadamente 5 mg por forma farmacéutica a no más de aproximadamente 500 mg/forma farmacéutica.
- 25 8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicho quelante es ácido cítrico, que está presente a razón de 10 a 500 mg por forma farmacéutica.
- 30 9. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la dosis unitaria comprende además una proil endopeptidasa.
- 30 10. La formulación farmacéutica de la reivindicación 9, en la que dicha proil endopeptidasa es una PEP de *Sphingomonas capsulata* o una forma recombinante de la misma.
- 35 11. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación es una cápsula, un comprimido, un polvo, un sobre o un pulverizador.
- 40 12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para prevenir y/o tratar celiaquía y/o dermatitis herpetiforme en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de administrar por vía oral dicha formulación a dicho paciente de forma simultánea a la ingesta por el paciente de un producto alimentario que contiene gluten.

FIGURA 1

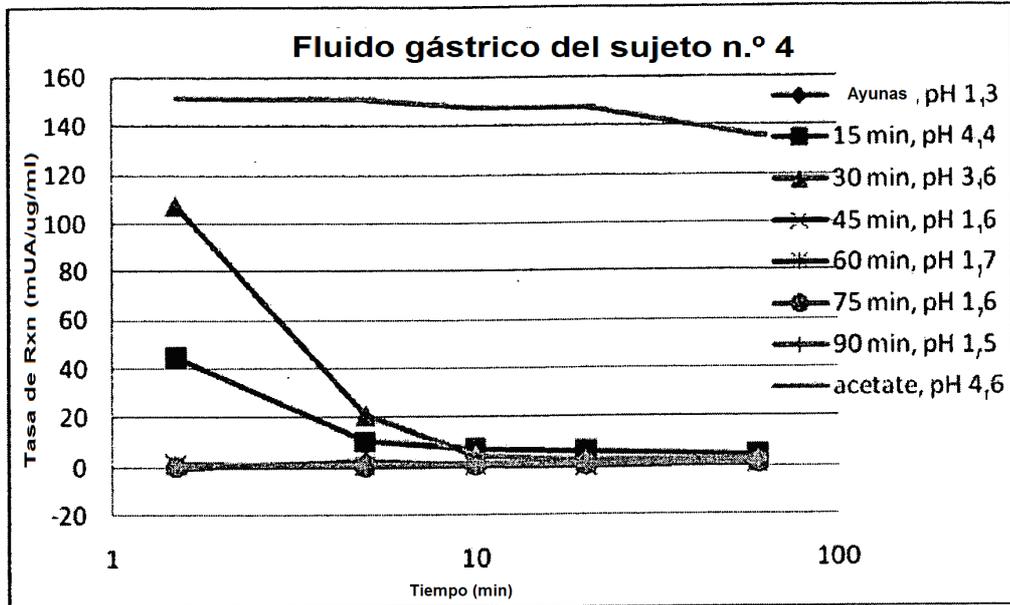


FIGURA 2

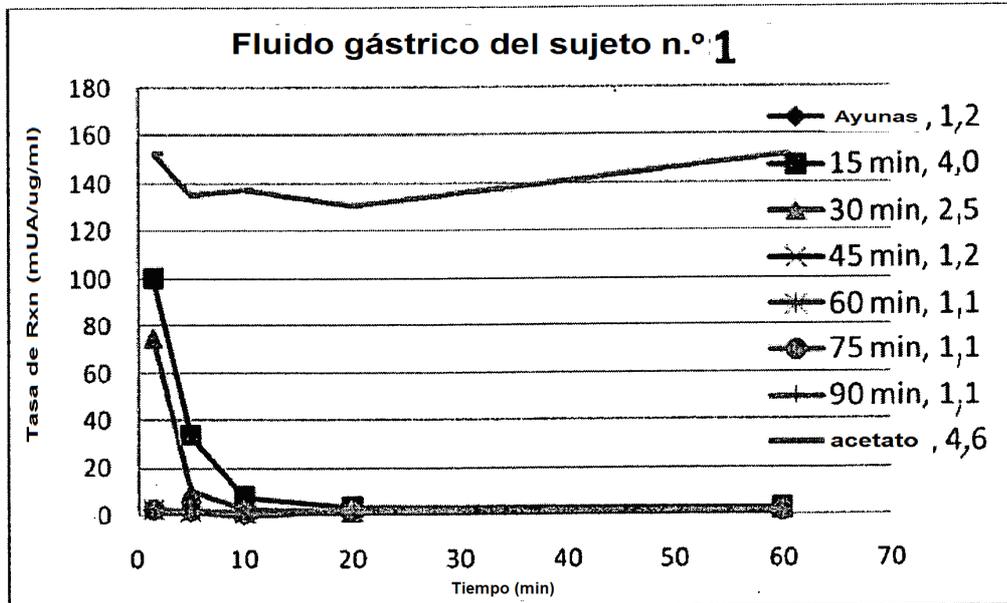


FIGURA 3

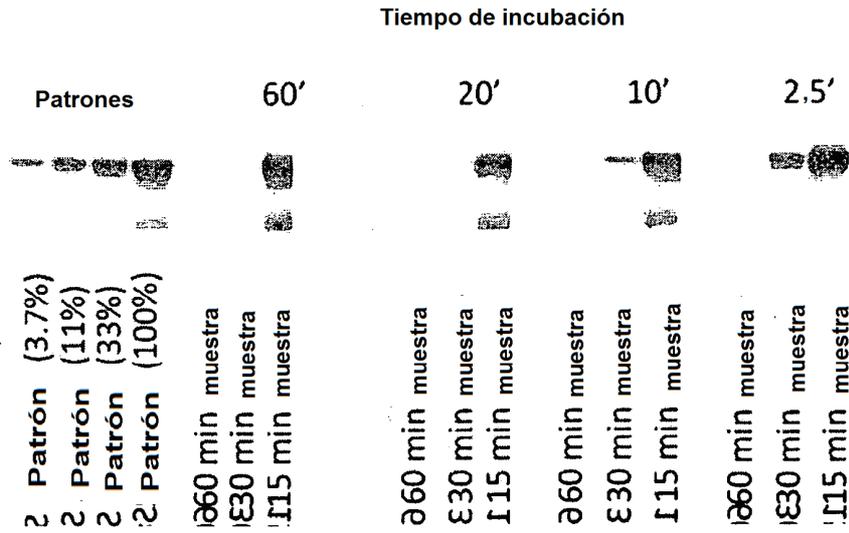


FIGURA 4

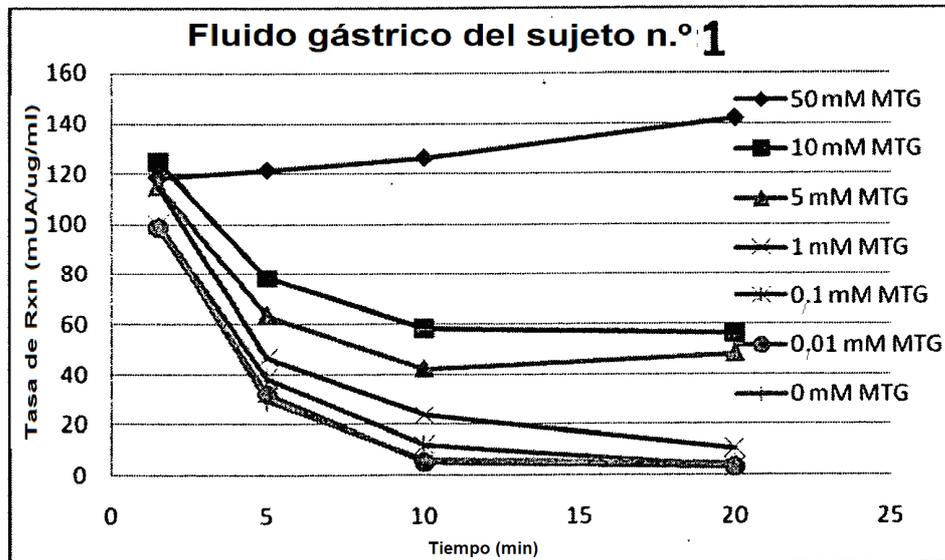


FIGURA 5

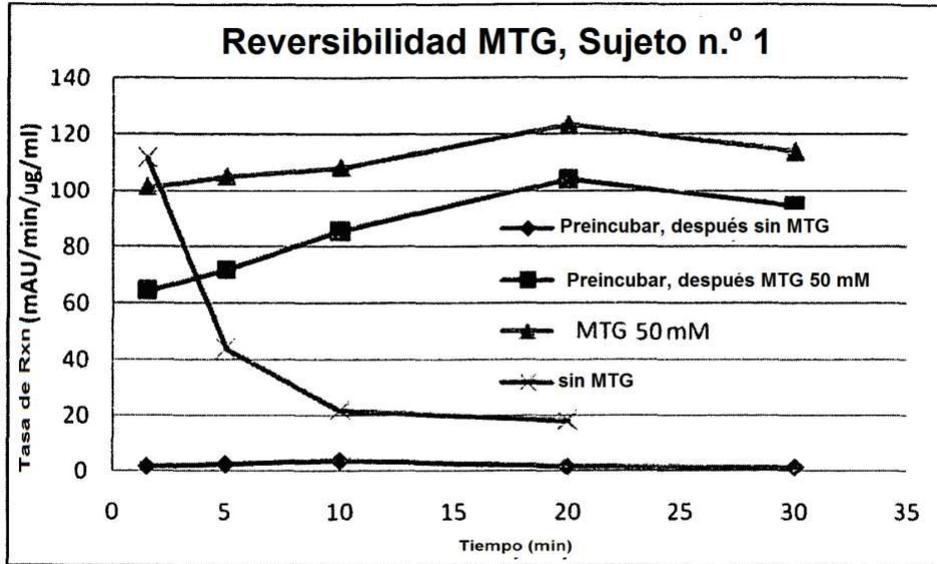


FIGURA 6

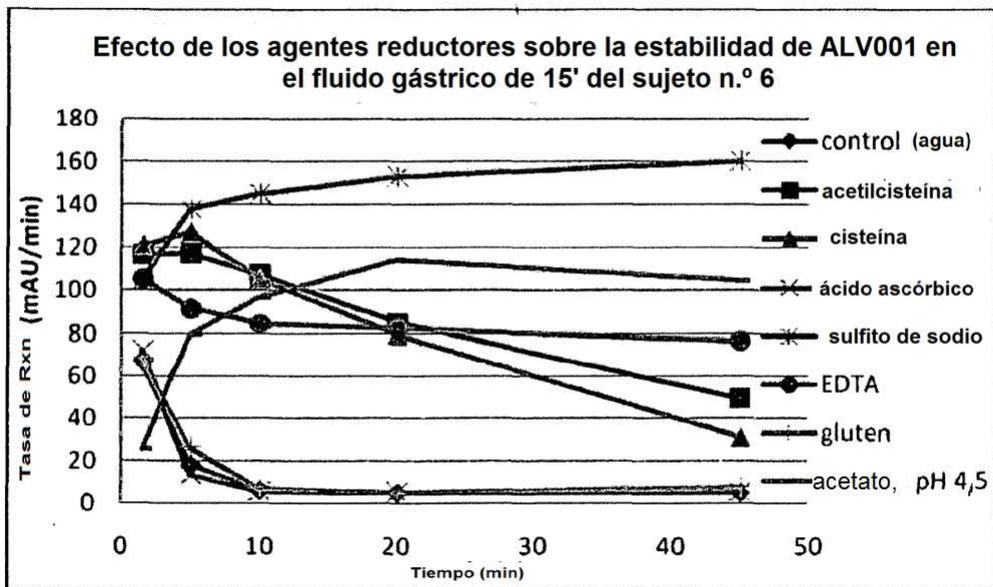


FIGURA 7

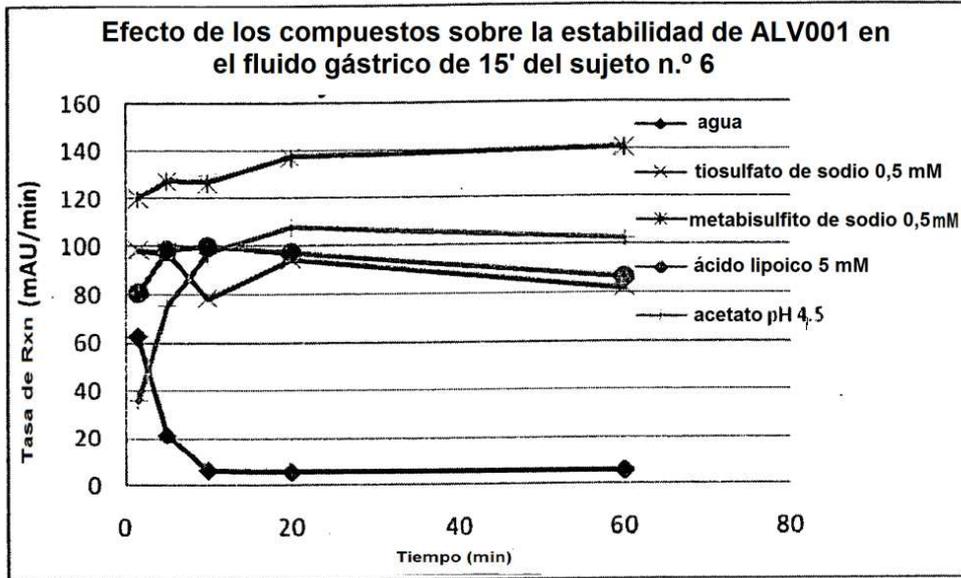


FIGURA 8

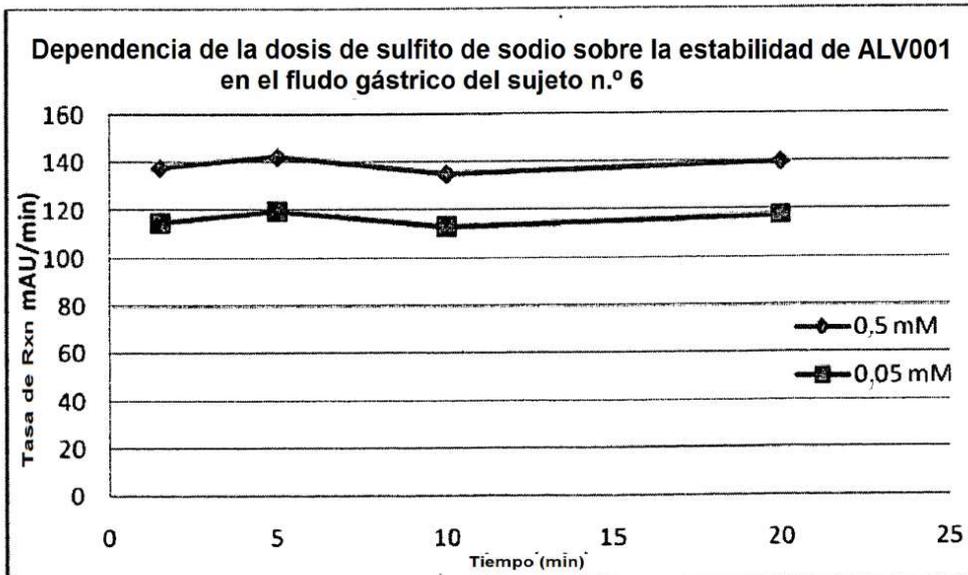


FIGURA 9

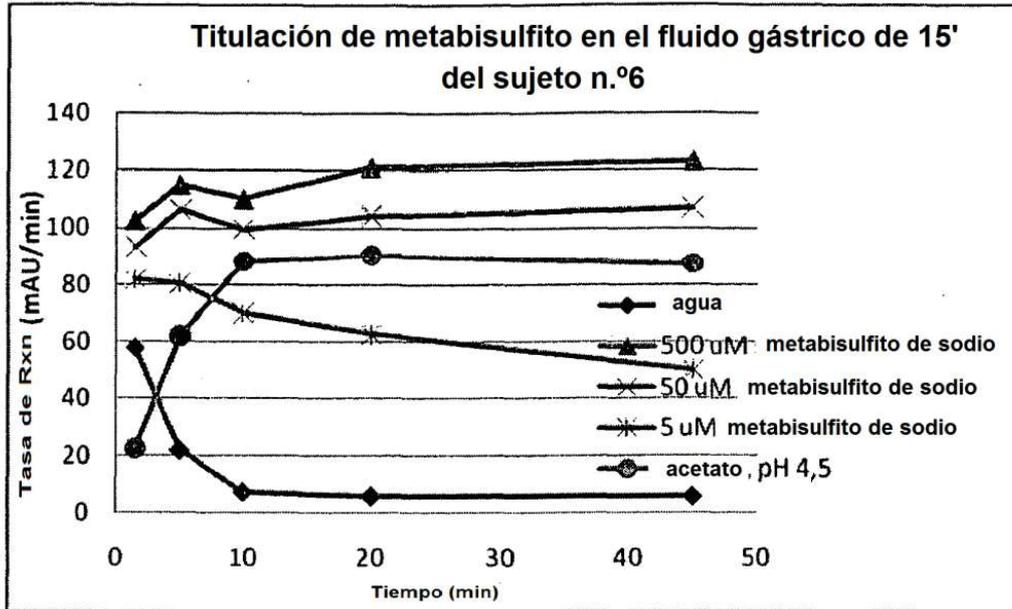


FIGURA 10

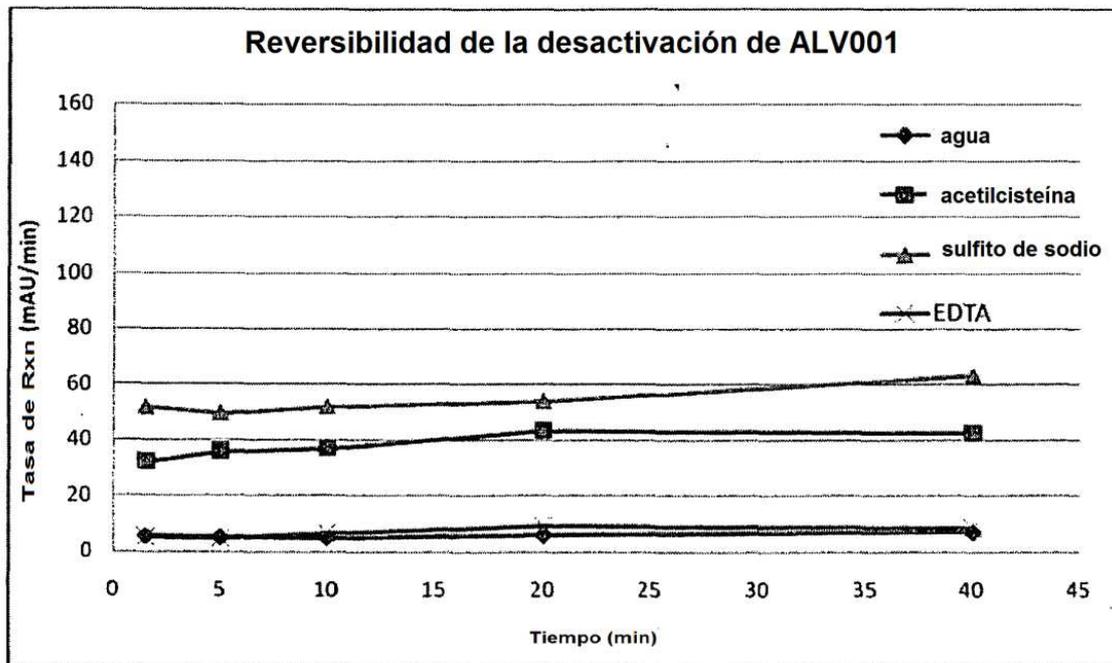


FIGURA 11

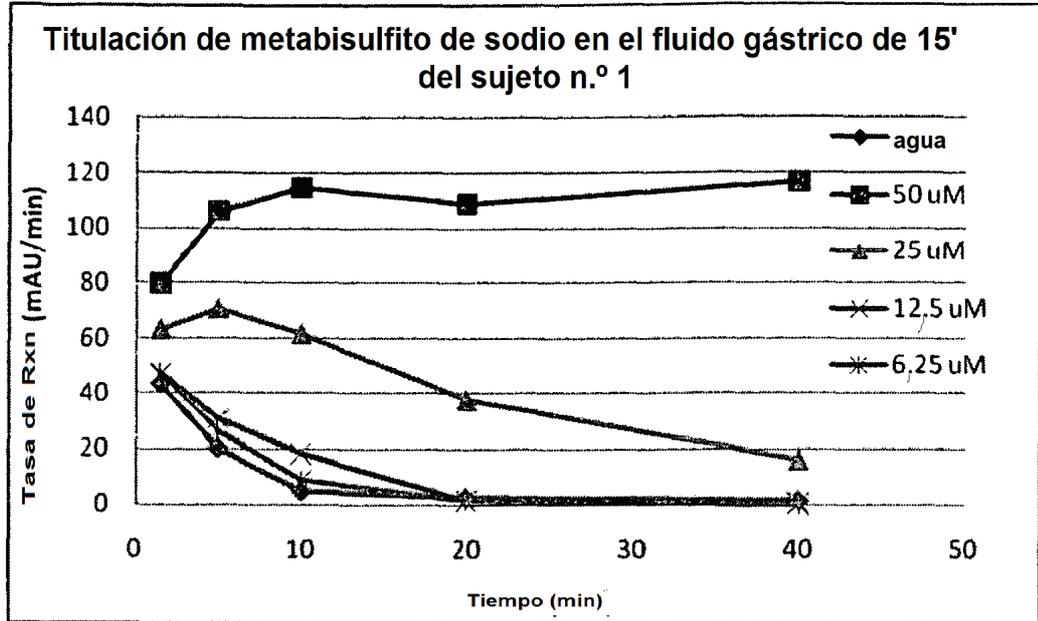


FIGURA 12

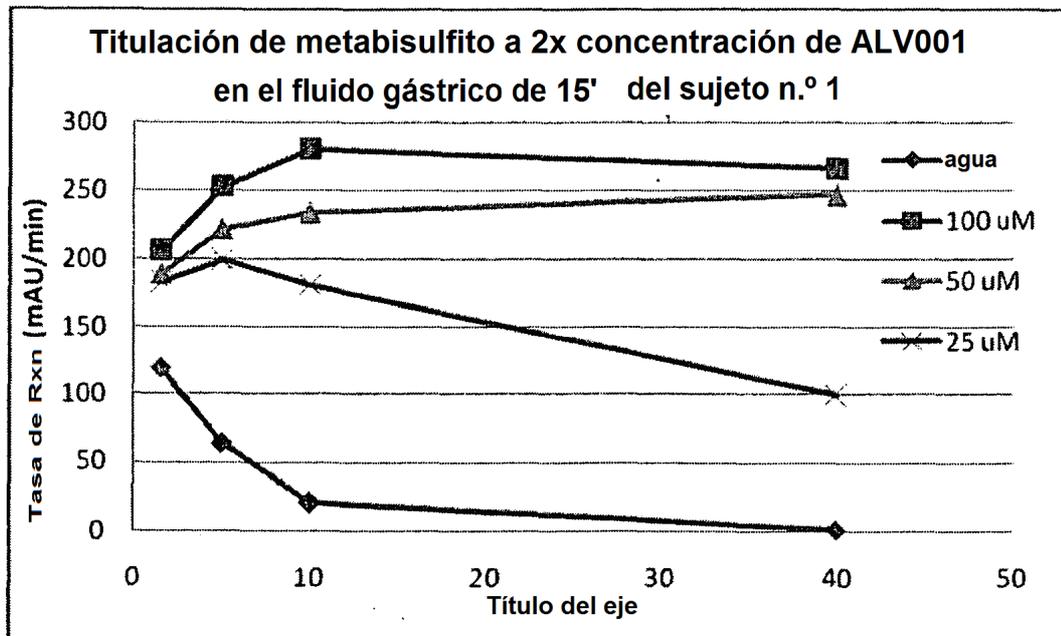


FIGURA 13

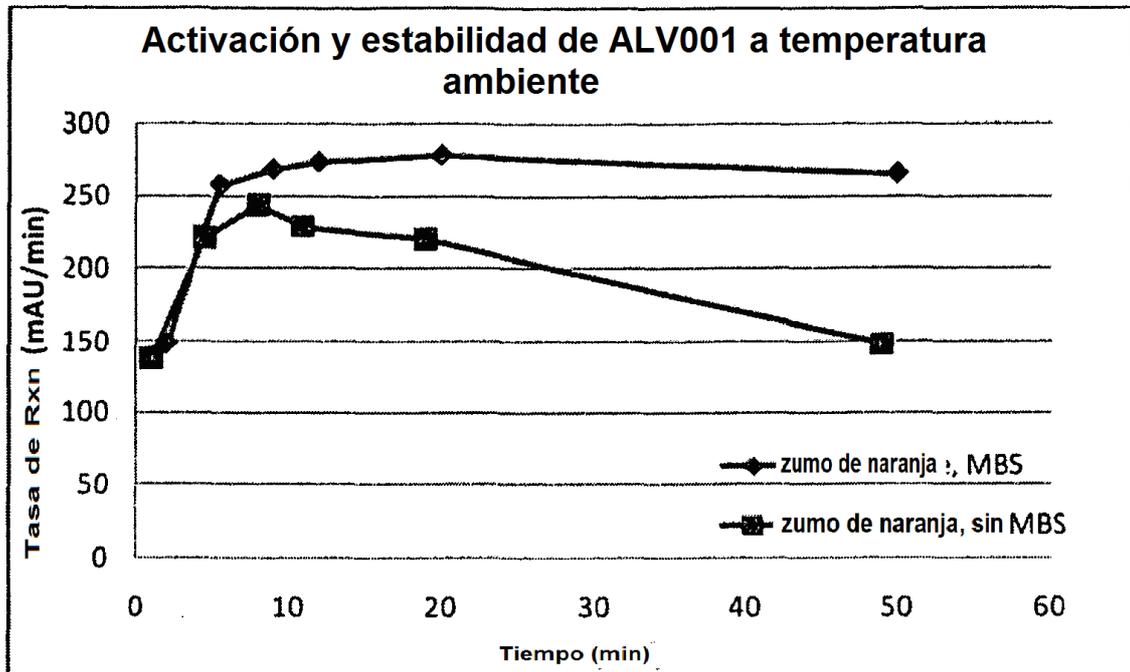


FIGURA 14

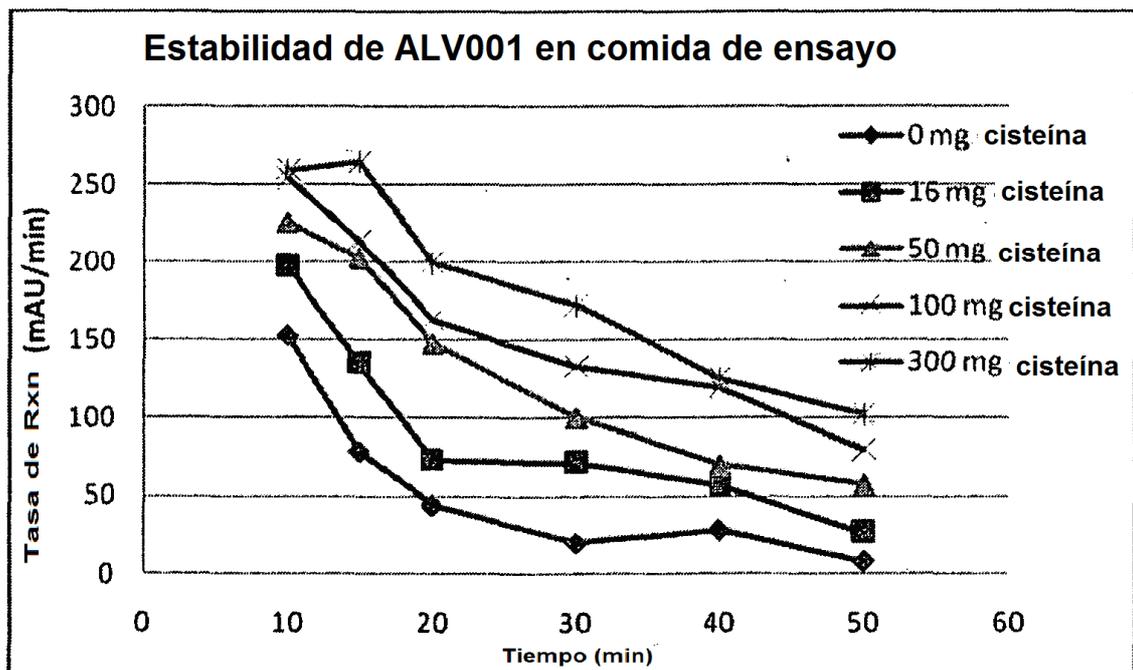
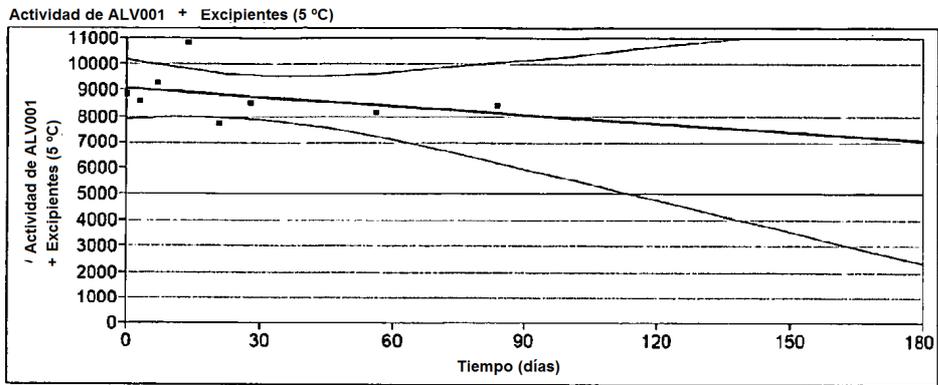
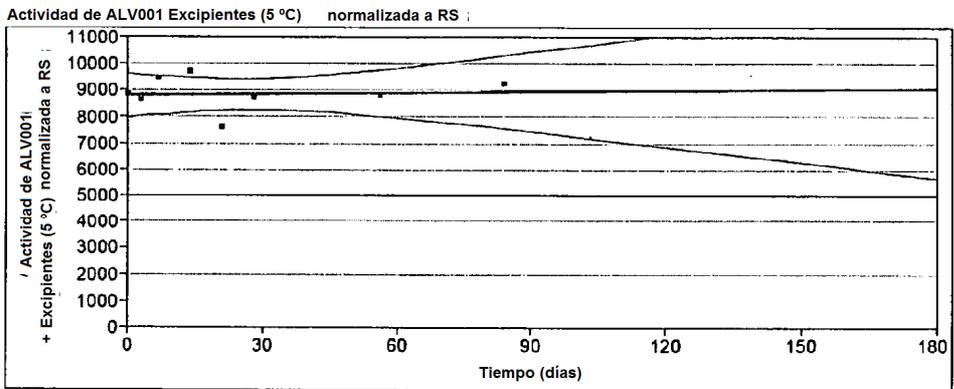


FIGURA 15

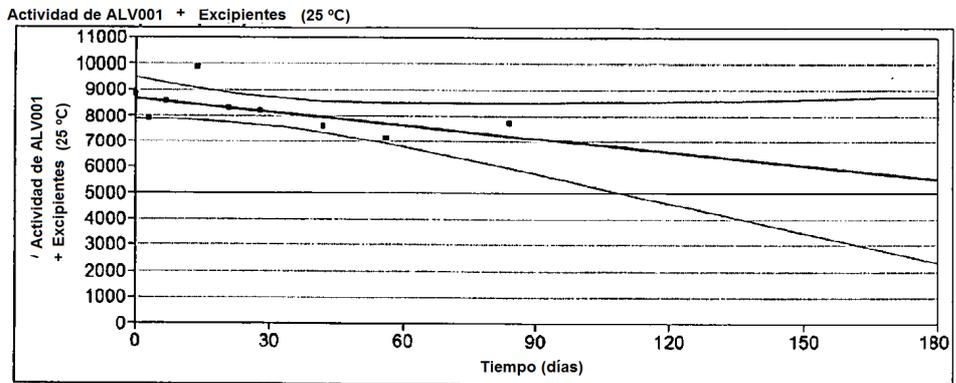
A



B



C



D

