

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 004**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 17177676 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 3290046**

54 Título: **Composiciones de C1-INH y métodos para la prevención y el tratamiento de trastornos asociados con la deficiencia del inhibidor de C1 esterasa**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791399 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2019

73 Titular/es:

SHIRE VIROPHARMA INCORPORATED (100.0%)
300 Shire Way
Lexington MA 02421, US

72 Inventor/es:

GALLAGHER, CYNTHIA;
RUDDY, STEPHEN y
MANNING, MARK CORNELL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 713 004 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de C1-INH y métodos para la prevención y el tratamiento de trastornos asociados con la deficiencia del inhibidor de C1 esterasa

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los agentes terapéuticos y métodos de uso de los mismos. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento y/o prevención de trastornos asociados con la deficiencia de inhibidor de C1 esterasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Varias publicaciones y documentos de patente se citan en toda la memoria con el fin de describir el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las citas completas de estas referencias se pueden encontrar en toda la memoria.

El angioedema hereditario (AEH) es un trastorno raro, genético, que amenaza la vida, causado por una deficiencia del inhibidor de C1 esterasa (véase, en general, www.haei.org y www.haea.org). Al menos 6.500 personas en los Estados Unidos y al menos 10.000 personas en Europa tienen AEH. Pacientes con AEH experimentan ataques recurrentes, debilitantes, que amenazan la vida impredecibles de la inflamación y la hinchazón submucosa/subcutánea. La inflamación es normalmente de la laringe, el abdomen, la cara, las extremidades y el tracto urogenital. Este trastorno genético es el resultado de un defecto en el gen que controla la síntesis del inhibidor de la C1 esterasa. De acuerdo con ello, la restauración de los niveles de inhibidor de C1 esterasa activa en estos pacientes a o cerca de los niveles normales es una medida eficaz para el tratamiento de AEH. Sin embargo, se desean nuevos y mejores métodos de tratamiento y prevención de trastornos asociados con una deficiencia del inhibidor de C1 esterasa, tal como AEH.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, en la presente se proporciona una composición que comprende por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa presente a 400 U/ml o más y un fosfato, para su uso en métodos para inhibir, tratar y/o prevenir el angioedema hereditario (HAE) en un sujeto, en donde la composición se administra por vía subcutánea.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 proporciona una secuencia de aminoácidos de inhibidor de la C1 esterasa humano.

La Figura 2 proporciona un gráfico del efecto de la concentración de proteínas en la viscosidad para muestras de concentración inicial de giro.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La restauración de los niveles de inhibidor de C1 esterasa activa en pacientes que tienen un trastorno asociado con niveles deficientes o reducidos de inhibidor de la C1 esterasa activa (por ejemplo, AEH) es una medida eficaz para el tratamiento de tales trastornos. Actualmente, inhibidor de la C1 esterasa (tales como Cinryze® (ViroPharma, Inc.; Exton, PA)) se administra a un paciente por vía intravenosa por un profesional médico. En la presente memoria, las formulaciones de un inhibidor de la C1 esterasa (tales como Cinryze®) se proporcionan que también son eficaces para administración subcutánea (SC). Sorprendentemente, la administración subcutánea del inhibidor de la C1 esterasa es suficiente para mantener los niveles en sangre del inhibidor de la C1 esterasa. La administración SC de un inhibidor de C1 esterasa cumple una necesidad médica no satisfecha debido a las limitaciones de la administración intravenosa en pacientes con AEH.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones para el uso en métodos para inhibir (por ejemplo, reducir o ralentizar), tratar y/o prevenir un trastorno asociado con la deficiencia de Inhibidor de la C1 esterasa en un sujeto. En una realización particular, los procedimientos comprenden la administración (por vía subcutánea) a un sujeto en necesidad del mismo de al menos un inhibidor de la C1 esterasa. En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa es administrado por vía subcutánea después de una administración inicial del inhibidor de C1 esterasa por vía intravenosa.

Inhibidores de la C1 esterasa también se conocen como inhibidores de C1 (C1 INH). Inhibidores de la C1 esterasa son inhibidores de complemento C1 y pertenecen a la superfamilia de inhibidores de proteinasa de serina. El inhibidor de la C1 esterasa humana es una proteína de 500 aminoácidos, incluyendo una secuencia de señal de 22 aminoácidos (Carter et al. (1988) Eur J. Biochem., 173: 163). En el plasma, el inhibidor de la C1 esterasa es una glicoproteína fuertemente glicosilada de aproximadamente 76 kDa (Perkins et al. (1990) J. Mol Biol, 214: 751). La

actividad de un inhibidor de la C1 esterasa puede ensayarse por métodos conocidos (véase, por ejemplo, Drouet et al. (1988) Clin Chim Acta, 174: 121-30). En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa es humano. Una secuencia de aminoácidos de inhibidor de C1 esterasa humana se proporciona en GenBank N° de acceso CAA30314 (véase también ID de gen: 710, que también proporciona secuencias de nucleótidos del inhibidor de la C1 esterasa) y la Figura 1. Un inhibidor de la C1 esterasa para uso en los métodos de la invención instantánea puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99, o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la Figura 1. El inhibidor de la C1 esterasa puede ser aislado o purificado a partir de plasma (por ejemplo, plasma humano) o producido de forma recombinante. Cuando purificado a partir de plasma, el inhibidor de la C1 esterasa puede ser nanofiltrado y pasteurizado. En una realización particular, el inhibidor de C1 esterasa derivado de plasma es Cinryze®. En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa está presente en las composiciones de la presente invención en una concentración elevada. De hecho, las composiciones que comprenden niveles muy altos de inhibidor de la C1 esterasa se han determinado a ser sorprendentemente estables y activas. En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa está presente a de aproximadamente 400 U/ml a aproximadamente 600 U/ml, o aproximadamente 500 U/ml.

En una realización particular, las composiciones de la presente invención no contienen citrato o ácido cítrico. Las composiciones que carecen de ácido citrato y ácido cítrico son particularmente útiles para la administración subcutánea del inhibidor de la C1 esterasa como citrato/ácido cítrico puede causar una reacción en el lugar de inyección. En una realización particular, la memoria intermedia de las presentes composiciones es fosfato de sodio (por ejemplo, aproximadamente 5 mM a fosfato de sodio aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM de fosfato de sodio, o alrededor de 20 mM de fosfato de sodio). En una realización particular, la memoria intermedia de las presentes composiciones comprende un grupo carboxílico. Por ejemplo, el tampón puede ser, sin limitación, citrato, succinato, tartrato, maleato, acetato, y sales de los mismos. En una realización particular, la memoria intermedia de la presente composición es el citrato de sodio o citrato (por ejemplo, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de citrato de sodio, aproximadamente 10 mM a citrato de sodio aproximadamente 30 mM, o alrededor de 20 mM de citrato sódico).

Las composiciones de la presente invención pueden tener un intervalo de pH de aproximadamente 6,5 o superior, en particular aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0, en particular aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y más particularmente aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender polisorbato 80 (TWEEN). Composiciones que comprenden polisorbato 80 son particularmente útiles, ya que reducen/mitigan la agregación de proteínas. Polisorbato 80 también puede limitar las interacciones de proteína cuando la composición entra en contacto con lubricantes/aceites que contienen silicio, tales como los utilizados en las jeringas y otros dispositivos de administración. Las composiciones que comprenden polisorbato 80 también son útiles para las preparaciones liofilizadas. En una realización particular, el polisorbato 80 está presente a una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%, en particular de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,075%, particularmente aproximadamente 0,05%.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender sacarosa. La sacarosa puede añadirse como un agente de "volumen", así como un lio-protector. En una realización particular, se añade sacarosa a composiciones a liofilizar. En una realización particular, las composiciones comprenden de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 125 mM de sacarosa, en particular de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM de sacarosa.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender al menos un aminoácido o sal del mismo, en particular metionina y/o arginina. La arginina tiene una carga positiva en su cadena lateral que se puede utilizar para amortiguar soluciones con fosfato. La metionina actúa como un estabilizador (por ejemplo, mediante la limitación de la oxidación). Los aminoácidos pueden estar presentes en la composición como aminoácidos individuales o presentes como péptidos cortos (por ejemplo, 2 a aproximadamente 5 aminoácidos, en particular di-péptidos o tri-péptidos).

La presente descripción abarca composiciones para su uso en métodos de tratamiento, inhibición, y/o prevención de cualquier condición o enfermedad asociada con una deficiencia absoluta o relativa de inhibidor de C1 esterasa funcional. Tales trastornos incluyen, sin limitación, angioedema adquirida (AAE) y angioedema hereditario (AEH). En la invención, el trastorno es AEH y/o los ataques asociados con el mismo. Como se ha indicado anteriormente, AEH es una enfermedad que amenaza la vida y debilitante que se manifiesta como recurrente, ataques de hinchazón submucoso/subcutáneo debido a una deficiencia de inhibidor de la C1 esterasa (Zuraw, BL (2008) N. Engl J. Med, 359: 1027 -1036). En una realización particular, el angioedema hereditario es de tipo I o de tipo II. Tanto tipo I como tipo II tienen un gen defectuoso para la síntesis de inhibidor de C1 esterasa que producen ya sea ningún inhibidor C1 (AEH tipo I), ya sea un inhibidor de C1 disfuncional (AEH tipo II) (Rosen et al. (1965) Science 148: 957 -958; Bissler et al. (1997) Proc Assoc Am Physicians 109: 164-173; Zuraw et al. (2000) J. Allergy Clin Immunol 105: 541-546; Bowen et al. (2001). Clin Immunol. 98: 157-163).

El uso de las composiciones de la presente invención, que comprenden por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa, para tratar, inhibir o prevenir HAE, abarca la administración de la composición. Las composiciones que comprenden al menos un inhibidor de la C1 esterasa y, opcionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, uno adecuado para la administración subcutánea o intravenosa) están abarcados por la presente invención como se define en las reivindicaciones. Tales composiciones se pueden administrar, en una cantidad terapéuticamente eficaz, a un paciente en necesidad del mismo para el tratamiento de un trastorno asociado con la deficiencia de inhibidor de C1 esterasa. La presente descripción también abarca kits que comprenden al menos una composición de la presente invención, por ejemplo, que comprende una composición de al menos un inhibidor de la C1 esterasa y, opcionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, uno adecuado para la administración intravenosa o subcutánea) como se define en las reivindicaciones. Los kits pueden comprender además al menos uno de tampón de la reconstitución, jeringas (por ejemplo, desechables) para administración parenteral (por ejemplo, subcutánea) de inyección, y el material de instrucciones. En un aspecto particular, el kit comprende al menos una jeringa pre-cargada que comprende el inhibidor de la C1 esterasa y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una jeringa puede ser cargada con inhibidor de C1 esterasa al menos una con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración (por ejemplo, la administración intravenosa o subcutánea). Alternativamente, una sola jeringa puede ser cargada con inhibidor de la C1 esterasa liofilizada. En un aspecto particular, las jeringas precargadas tienen una composición farmacéutica que contiene polisorbato 80 como componente (por ejemplo, en una cantidad que previene la interacción proteína-silicona o la agregación de proteínas).

Los agentes y composiciones de la presente divulgación se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyección (por ejemplo, para la administración local (directa) o sistémica. En la invención, la composición se administra subcutáneamente de acuerdo con la invención. En general, el vehículo farmacéuticamente aceptable de la composición se selecciona del grupo de diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos. Las composiciones pueden incluir diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris HC1, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol). La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, en forma líquida, o puede estar en forma de polvo seco (por ejemplo, liofilizada para su reconstitución posterior).

En una realización particular, las composiciones se formulan en forma liofilizada. Cuando las composiciones se proporcionan en forma liofilizada, las composiciones se reconstituyen antes de su uso (por ejemplo, dentro de una hora, horas, o días o más de uso) por un tampón apropiado (por ejemplo, agua estéril, una solución salina estéril, o una solución estéril que comprende los portadores farmacéuticamente aceptables apropiados (por ejemplo, para reconstituir las composiciones como se ha descrito anteriormente en este documento). El tampón (de la reconstitución puede ser proporcionado en los kits de la presente descripción o se pueden obtener o proporcionar por separado).

Tal como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión y similares que pueden ser apropiados para la ruta de administración deseada de la preparación farmacéutica, como se ejemplifica en el párrafo anterior. El uso de tales medios para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con las moléculas que han de administrarse, se contempla su uso en la preparación farmacéutica.

La selección de una preparación farmacéutica adecuada depende del método de administración elegida. En este caso, una preparación farmacéutica comprende las moléculas dispersas en un medio que es compatible con el tejido al que se está administrando. Los métodos para preparar parenteralmente o administrar por vía subcutánea composiciones son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA)).

Tal como se ha indicado anteriormente, los agentes de la presente divulgación se administran parenteralmente - por ejemplo por inyección intravenosa en el torrente sanguíneo y/o por inyección subcutánea. Las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, intravenosa y subcutánea son conocidas en la técnica. Si se selecciona la inyección parenteral como un procedimiento para la administración de las moléculas, se deben tomar medidas para asegurar que suficientes cantidades de las moléculas alcancen sus células diana para ejercer un efecto biológico.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la presente invención como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico pueden prepararse de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencional. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración (subcutánea). Para parenterales, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril, aunque otros ingredientes, por ejemplo, ayudan a la solubilidad o con fines conservantes, pueden ser incluidos. Las suspensiones inyectables también se pueden preparar, en cuyo caso portadores líquidos

apropiados, agentes de suspensión y similares pueden ser empleados.

Una preparación farmacéutica de la invención se puede formular en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de la preparación farmacéutica adecuada para el paciente sometido a tratamiento. Cada dosis debe contener una cantidad de ingrediente activo calculada para producir el efecto deseado en asociación con el vehículo farmacéutico seleccionado. Las unidades de dosificación pueden aumentarse proporcionalmente o disminuirse en base al peso del paciente. Las concentraciones apropiadas para el alivio de un estado patológico particular, se pueden determinar por cálculos de la curva de concentración de dosificación. Unidad de dosificación adecuada también se puede determinar mediante la evaluación de la eficacia del tratamiento.

La preparación farmacéutica que comprende las moléculas de la presente invención se puede administrar a intervalos apropiados, por ejemplo, a diario, cada dos días, cada tres días, cinco de cada 7 días, o al menos uno, dos o tres veces a la semana o más hasta que los síntomas patológicos se reducen o alivian, tras lo cual la dosis puede ser reducida a un nivel de mantenimiento. El intervalo adecuado en un caso particular normalmente dependería de la condición del paciente.

En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa está presente en la composición o se administra en el intervalo de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 10.000 unidades; aproximadamente 500 unidades a aproximadamente 5.000 unidades; aproximadamente 1000 unidades a aproximadamente 3.500 unidades, o aproximadamente 1500 unidades a aproximadamente 2.500 unidades. En una realización particular, se utiliza al menos aproximadamente 2.000 unidades. En una realización particular, una dosis inicial alta del inhibidor de la C1 esterasa (como se indica más arriba (se puede administrar por vía intravenosa)) se utiliza, seguida de dosis de mantenimiento más bajas. Por ejemplo, la dosis inicial alta puede ser al menos 1,5, 2, 3, 4, o 5 veces las dosis posteriores. En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa está presente en la composición de mantenimiento o se administra para el mantenimiento en el intervalo de aproximadamente 100 unidades a aproximadamente 5.000 unidades; aproximadamente 250 unidades a aproximadamente 2.000 unidades; aproximadamente 250 unidades a aproximadamente 1.000 unidades; o aproximadamente 500 unidades. La dosis inicial alta del inhibidor de la C1 esterasa es opcional en los métodos de la invención reivindicada (por ejemplo, puede ser opcional con métodos profilácticos).

En una realización particular, el inhibidor de la C1 esterasa se administra con una frecuencia y dosificación a fin de aumentar el nivel de inhibidor de la C1 esterasa a al menos aproximadamente 0,3 o, más particularmente, 0,4 U/ml o más hasta aproximadamente 1 U/ml (1 unidad/ml es la cantidad media de inhibidor de C1 presente en 1 ml de plasma humano normal) en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el nivel de inhibidor de la C1 esterasa puede mantenerse a o por encima de 0,4 U/ml durante al menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, al menos 95% o más del tiempo o todo el tiempo (por ejemplo, el tiempo durante el cual se está administrando fármaco). Por ejemplo, la administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de la C1 esterasa seguido de 250U cotidianamente o 500U cada dos días resulta en el mantenimiento de justo por debajo de 0,4 U/ml en la sangre. Además, la administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de la C1 esterasa, seguido de 1000 U cada 3 días resulta en el mantenimiento de aproximadamente 0,4 U/ml en la sangre. En particular, para facilidad de uso por el paciente, pueden ser preferibles las administraciones menos frecuentes. La administración de una dosis inicial de 2000U de inhibidor de C1 esterasa seguido por 500U todos los días con las vacaciones de fin de semana de la administración (es decir, 5 de los 7 días) también resulta en el mantenimiento de aproximadamente 0,4 U/ml o superior en la sangre. Notablemente, la administración de sólo las dosis de mantenimiento conduce a un aumento y los niveles en sangre fisiológicamente pertinentes del inhibidor de la C1 esterasa, pero se retrasó en comparación con los que recibieron una dosis alta inicial.

Definiciones

Las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" puede referirse a $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, o $\pm 1\%$.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "huésped", "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, incluyendo seres humanos.

Tal como se utiliza aquí, el término "prevenir" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que está en riesgo de desarrollar una condición (por ejemplo, AEH o ataque AEH), resultando en una disminución en la probabilidad de que el sujeto va a desarrollar la condición.

El término "tratar" como se usa aquí se refiere a cualquier tipo de tratamiento que imparte un beneficio a un

paciente aquejado de un trastorno, incluyendo la mejora en la condición del paciente (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc. en una realización particular, el tratamiento de AEH resulta en al menos una reducción en la gravedad y/o el número de ataques de AEH.

5 La frase "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de agente terapéutico que se traduce en una mejora en la condición del paciente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto o una composición farmacéutica se refiere a una cantidad eficaz para prevenir, inhibir, tratar o disminuir los síntomas de un trastorno o enfermedad particular.

10 "Farmacéuticamente aceptable" indica la aprobación por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

15 Un "vehículo" se refiere a, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, conservante (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico), anti-oxidante (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), solubilizante (por ejemplo, TWEEN 80, polisorbato 80), emulsionante, tampón (por ejemplo, Tris HCl, acetato, fosfato), agua, soluciones acuosas, aceites, sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol), protectores crio/lyo-, modificador de la tonicidad, excipiente, agente auxiliar o vehículo con el que un agente activo de la presente invención es administrado. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA); Gennaro, A.R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott, Williams y Wilkins); Liberman, et al, eds, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, Nueva York; y Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington.

25 El término "aislado" puede referirse a la proteína, ácido nucleico, un compuesto, o una célula que ha sido separada suficientemente del ambiente con el que estaría naturalmente asociado (por ejemplo, de forma que existen en forma "sustancialmente pura"). "Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta.

30 El término "sustancialmente puro" se refiere a una preparación que comprende al menos 50-60% en peso de un material dado (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). En ciertas realizaciones, la preparación comprende al menos 75% en peso, particularmente 90-95% o más en peso del compuesto dado. La pureza se mide mediante métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos, agarosa o electroforesis en gel de poli(acrilamida), análisis de HPLC, y similares).

Se proporciona el siguiente ejemplo para ilustrar diversas realizaciones de la presente invención. El ejemplo es ilustrativo y no pretende limitar la invención de ninguna manera.

40 EJEMPLO

Estudios de concentración de giro

45 La proteína se cargó en los concentradores de giro y se giró a 10.500 rpm durante 5 a 10 minutos. Cuando las muestras dejaron de rotarse, los volúmenes finales en los concentradores de giro se registraron y una concentración de proteína en bruto se calculó para cada uno. La proteína adicional se añadió a los concentradores de giro y se hicieron girar hasta que se alcanzó la concentración de proteína deseada, momento en el que se hizo una medición de UV. En cada concentración de proteína diana se realizó una medición de UV y de viscosidad. El procedimiento anterior continúa hasta que la viscosidad de la proteína evita que la muestra se concentre más.

Mediciones de viscosidad

55 La viscosidad se determinó midiendo la cantidad de tiempo que tardó la muestra para llevarse a una distancia predeterminada en una punta de pipeta de carga de gel. Para el cálculo de la viscosidad de la muestra, una curva estándar se preparó en primer lugar utilizando un conjunto de estándares con viscosidades conocidas. Soluciones de sacarosa (o Brix) son adecuadas para la preparación de una curva de este tipo, pero cualquier material con viscosidad conocida a una temperatura definida debe ser apropiado.

60 Con el fin de realizar una medición, el émbolo de pipeta está deprimido, la punta de pipeta se inserta en el vial de muestra, el émbolo se libera, y se midió el tiempo para que el fluido se desplace a una distancia predeterminada en la punta de pipeta con un cronómetro. La distancia utilizada para estos experimentos fue de 30 μ L de agua. Es importante notar que una punta de pipeta sólo es fiable para una sola medición, por lo que varias puntas se utilizan para hacer mediciones repetidas de una muestra. También, el volumen que se ha de introducir en la punta de pipeta debe ser mayor que el volumen marcado en la punta para asegurar una tracción uniforme sobre la muestra durante una medición. Para una marca de volumen de 30 μ L en la punta de pipeta, la micropipeta se

estableció para introducir 42 µl.

Resultados

El ejemplo instantáneo determinó la capacidad de desarrollar una formulación líquida de mayor concentración de C1 INH como monoformulación. Los estudios iniciales se centraron en la concentración de la solución madre de C1 INH usando un método de concentración de centrifugado. Las soluciones se ajustaron inicialmente para pH pero no se añadió ningún otro excipiente. Tres valores de pH fueron investigados (pH 5,9, 6,9, y 7,9). Tras la concentración por rotación, todas las soluciones se mantuvieron claras hasta concentraciones de hasta ~ 500 U/ml (aproximadamente 100 mg/ml) para todos los valores de pH ensayados (Tabla 1). Mientras que el límite de solubilidad no se alcanzó en estos estudios, hubo aumentos medibles en la viscosidad cuando las concentraciones superaron 300 U/ml (Figura 2). En todos los valores de pH, la viscosidad comienza a aumentarse marcadamente cuando la concentración de C1 INH sube por encima de 400 U/ml.

Tabla 1: Concentraciones finales (en U/ml) y viscosidades de las muestras preparadas durante los experimentos de concentración de centrifugado. Estos valores se basan en la concentración inicial de 160 U/ml del fármaco a granel inicial.

7,9 U/ml	viscosidad	6,9 U/ml	viscosidad	5,9 U/ml	viscosidad
93,12	0,99	182,4	4,23	187,2	2,36
415,18	3,95	289,4	4,90	296,9	7,71
454,81	13,74	378,6	12,08	396,7	5,46
501,17	30,43	479,0	14,67	478,8	24,09

Un estudio de viabilidad más grande se llevó a cabo mediante el examen de diferentes tampones (20 mM de fosfato, 20 mM de citrato, y 20 mM de Tris) a cada uno de los tres valores de pH diana. Las muestras de tanto 400 U/ml como 500 U/ml se prepararon y evaluaron para la estabilidad después de una semana a 40°C y después de dos semanas a 25°C. Los niveles iniciales de viscosidad estaban bien por encima de los valores para el agua pura (~ 1 mPa-s), pero dentro de los límites establecidos por lo general para su uso como un producto inyectable (Tabla 2). Los valores de viscosidad para los 400 U/ml de muestras fueron menos que a 500 U/ml, por lo general por 7 a 10 mPa-s. Tras el almacenamiento a 40°C durante una semana, se aumentó la viscosidad de todas las muestras. A pH 5,9, se gelificaron, probablemente debido a agregación inducida térmicamente. Para las formulaciones restantes, la viscosidad se aumenta en algún grado. En algunos casos estos valores superan el 30 mPa-s. El aumento de la viscosidad fue inferior en el almacenamiento a 25°C que a 40°C. Hubo poco o ningún cambio, para las muestras a pH 6,9, indicando que pH 6,9 puede ser más favorable para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

Tabla 2: Viscosidad a t0 y después de una semana de almacenamiento a 40°C (T1). La viscosidad se informó en mPa-s.

pH	[C1 INH]	Tampón	t0	t1	t2
5,9	400	fosfato	13,3 ± 0,6	gel	17,4 ± 2,1
	500		24,6 ± 1,5	gel	36,9 ± 7,3
	400	histidina	14,7 ± 0,8	gel	19,1 ± 2,5
	500		27,7 ± 3,8	gel	27,7 ± 3,8
6.9	400	fosfato	12,2 ± 1,5	16,1 ± 0,6	11,9 ± 3,0
	500		20,8 ± 2,0	35,3 ± 2,1	32,1 ± 7,7
	400	citrato	7,4 ± 0,8	9,2 ± 0,7	7,1 ± 0,6
	500		14,4 ± 3,2	19,8 ± 1,1	12,6 ± 0,5
7.9	400	fosfato	8,2 ± 1,2	12,8 ± 0,7	22,0 ± 3,5
	500		16,2 ± 1,4	23,1 ± 2,1	25,5 ± 7,5
	400	tris	14,1 ± 0,7	18,7 ± 0,7	30,0 ± 3,8
	500		20,5 ± 0,9	33,3 ± 6,2	31,0 ± 1,8

En particular, a pH 6,9, las formulaciones de citrato tenían valores de viscosidad más bajos que para el fosfato, mientras que a pH 7,9, el tampón de fosfato produce viscosidades más bajas que el tampón de tris. Viscosidades más altas significarán que se requerirá una mayor fuerza para suministrar un volumen especificado de la droga dentro de un cierto marco de tiempo.

La pureza por RP HPLC fue inicialmente de aproximadamente 86 al 87% para las formulaciones a pH 6,9 y más (Tabla 3). Los niveles iniciales fueron inferiores a pH 5,9, lo que sugiere que alguna degradación ya había ocurrido sólo en el proceso de preparación de las muestras. Tras el almacenamiento durante una semana a 40°C, las muestras de pH 5,9 se gelificaron, haciendo imposible el análisis por RP HPLC. Para todas las otras muestras, el porcentaje de pureza era esencialmente sin cambios, lo que indica que poca, o ninguna degradación química se produce para el almacenamiento en estas condiciones.

Tabla 3: Porcentaje de pureza por RP HPLC tras el almacenamiento a 25°C (T2) o 40°C (T1).

pH	[C1 INH]	Tampón t0		t1	t2
5,9	400	fosfato 82,87 ± 0,75		gel	81,10 ± 2,11
	500		84,74 ± 1,24	gel	83,61 ± 1,02
	400	histidina	84,11 ± 1,53	gel	85,34 ± 1,55
	500		86,36 ± 0,76	gel	82,99 ± 0,64
6,9	400	fosfato	87,14 ± 0,67	88,59 ± 0,29	85,19 ± 2,00
	500		86,44 ± 1,49	85,65 ± 1,32	84,07 ± 1,24
	400	citrato	86,67 ± 1,36	82,92 ± 1,48	86,03 ± 0,87
	500		86,89 ± 1,24	86,74 ± 0,88	84,42 ± 1,19
7,9	400	fosfato	86,09 ± 1,14	85,29 ± 0,84	85,98 ± 0,90
	500		86,47 ± 1,15	83,57 ± 1,33	84,00 ± 0,97
	400	tris	87,14 ± 0,98	81,74 ± 7,89	86,14 ± 0,81
	500		88,74 ± 0,82	87,24 ± 1,47	87,30 ± 0,95

Para las muestras almacenadas durante dos semanas a 25°C, había pequeñas pérdidas, comparables a lo que se vio en t1. Juntos, los datos de RP HPLC indican que hay pequeñas pérdidas debido a la degradación química. pH más alto parece disminuir la velocidad de degradación y puede haber cierta sensibilidad a composición de tampón.

Mientras que la estabilidad química de C1 INH parece estar sin cambios durante el almacenamiento, hay cierta inestabilidad física observada como se indica por SEC (Tabla 4). Hay otras proteínas presentes en la mezcla de C1 INH, conduciendo a un 'pureza' general de aproximadamente ~ 67% en t0. Tras el almacenamiento a 40°C durante una semana (t1), el contenido total de monómeros de las muestras se redujo a 54-56% para las muestras con pH 6,9 y superior. Hubo poca diferencia entre las dos condiciones de pH diferentes, los diferentes tampones y las dos concentraciones de proteína. Cuando se almacenan durante dos semanas a 25°C (t2), las muestras de pH 5,9 no se gelificaron, como lo hicieron en la temperatura de almacenamiento superior. Sin embargo, hubo apreciablemente mayor degradación, especialmente con tampón de histidina. A pH 6,9 o 7,9, la pérdida medida por SEC fue de aproximadamente 2% o menos, en comparación con la pérdida de 10-12% en la temperatura más alta durante la mitad del tiempo.

Tabla 4: Contenido de monómero por SEC tras el almacenamiento a 25°C (t2) o 40°C (t1).

pH	[C1 INH]	Tampón	t0	t1	t2
5,9	400	fosfato	68,32 ± 1,04	gel	62,56 ± 0,94
	500		67,19 ± 0,14	gel	61,46 ± 0,14
	400	histidina	64,68 ± 0,42	gel	46,58 ± 1,09
	500		66,60 ± 0,08	gel	44,48 ± 1,04
6.9	400	fosfato	67,85 ± 0,22	55,29 ± 0,36	
	500		67,41 ± 0,36	54,79 ± 0,14	65,45 ± 0,23
	400	citrato	67,82 ± 0,07	56,14 ± 0,41	65,49 ± 0,16
	500		67,43 ± 0,30	56,59 ± 0,33	65,03 ± 0,36
7.9	400	fosfato	67,85 ± 0,09	54,96 ± 0,52	61,31 ± 0,25
	500		67,58 ± 0,40	55,57 ± 0,56	64,98 ± 0,50
	400	tris	67,63 ± 0,27	55,40 ± 0,30	65,70 ± 0,56
	500		67,67 ± 0,47	56,18 ± 0,64	66,19 ± 0,84

Los datos indican que la tasa de degradación será de aproximadamente 13 veces a 35 veces más lento a 4°C que a 25°C. La estimación superior proviene del uso de un gráfico de Arrhenius. La estimación más baja proviene de la determinación de la pérdida media a medida que la temperatura se reduce en 5°C y extrapolando a una temperatura de almacenamiento de 4°C. Utilizando los datos actuales como un indicador, esto predice una pérdida de aproximadamente 3 a 10% después de dos años a temperaturas de refrigeración. En otras palabras, una formulación líquida parece ser bastante estable en base a estos datos. Además, las tasas de degradación son aproximadamente comparables entre las muestras de 400 U/ml y 500 U/ml, lo que sugiere que el desarrollo de la formulación de mayor concentración es igual de viable.

La velocidad de degradación es mucho más rápida a pH 5,9, lo que conduce a la gelificación a 40°C y mayores pérdidas a 25°C. Por lo tanto, el examen adicional de pH/tampón se centrará en el intervalo de pH 6,5 a 8,0. Hay un efecto de tampón claro en la viscosidad y posiblemente también sobre la estabilidad.

Los estudios demostraron que no hay un límite de solubilidad para la preparación de C1 INH en concentraciones de hasta 500 U/ml. Hay un aumento en la viscosidad una vez que las concentraciones alcanzan el intervalo de 400-500 U/ml (que es dependiente de tampón siendo el citrato mejor que el fosfato que es mejor que Tris), pero son manejables y todavía permiten la administración fácil por inyección para sistemas de jeringa estándar. En general, C1 INH es relativamente estable a la degradación química, como se determina por RP HPLC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gallagher, Cynthia Ruddy, Stephen Manning, Mark

<120> Composiciones de C1-Inh y Métodos para la prevención y el tratamiento de trastornos asociados con la deficiencia del inhibidor de C1 esterasa

<130> P070762EP

<140>

<141> 2014-03-17

<150> EP 14762343.3

<151> 2014-03-17

<150> PCT/US2014/030309

<151> 2014-03-17

<150> 61/791,399
<151> 2013-03-15

<160> 1

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 500

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

15	Met	Ala	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala
	1				5				10					15	
	Gly	Asp	Arg	Ala	Ser	Ser	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln
				20					25					30	
	Asp	Pro	Glu	Ser	Leu	Gln	Asp	Arg	Gly	Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Thr
			35				40						45		
20	Val	Ile	Ser	Lys	Met	Leu	Phe	Val	Glu	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Ser
		50					55					60			
	Leu	Pro	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Ala	Thr	Lys	Ile	Thr
	65				70						75				80
25	Asn	Thr	Thr	Asp	Glu	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Glu	Pro	Thr
				85						90					95
	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Pro	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Leu	Pro	Thr
				100					105					110	
	Ser	Pro	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gly	Ser	Phe	Cys	Pro	Gly	Pro	Val
30			115					120					125		
	Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Glu	Ser	His	Ser	Thr	Glu	Ala	Val	Leu	Gly
		130					135					140			
	Ala	Leu	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Tyr	His	Ala	Phe	Ser	Ala
	145					150					155				160
35	Lys	Lys	Val	Glu	Thr	Asn	Met	Ala	Phe	Ser	Pro	Phe	Ser	Ile	Ala
				165						170					175
	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr
				180					185					190	
40	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Tyr	Pro	Lys	Asp	Phe	Thr	Cys	Val	His
			195					200					205		
	Ala	Leu	Lys	Gly	Phe	Thr	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Ser	Val	Ser	Gln
		210					215					220			
	Phe	His	Ser	Pro	Asp	Leu	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Phe	Val	Asn	Ala
45															Ser

45

50

55

60

65

	225				230				235				240
	Arg	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Leu	Ser	Asn
					245					250			255
5	Ala	Asn	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Trp	Val	Ala	Lys	Asn
				260					265				270
	Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Thr
			275				280					285	
	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Tyr	Leu	Ser	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
10		290					295					300	
	Pro	Lys	Lys	Thr	Arg	Met	Glu	Pro	Phe	His	Phe	Lys	Asn
	305					310					315		320
	Lys	Val	Pro	Met	Met	Asn	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Val	Ala
				325						330			335
15	Asp	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Lys	Val	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu
			340						345				350
	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Pro	Gln	Asn	Leu	Lys	His
		355					360					365	
20	Asp	Met	Glu	Gln	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Val	Phe	Lys	Ala
	370						375					380	
	Lys	Leu	Glu	Met	Ser	Lys	Phe	Gln	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr
	385					390				395			400
	Ile	Lys	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Asp	Met	Leu	Ser	Ile	Met
				405						410			415
25	Glu	Phe	Phe	Asp	Phe	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Leu	Cys	Gly
			420					425					430
	Asp	Pro	Asp	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Met	Gln	His	Gln	Thr
		435					440					445	
30	Leu	Thr	Glu	Thr	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala
	450					455						460	
	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Phe
	465					470				475			480
	Leu	Trp	Asp	Gln	Gln	His	Lys	Phe	Pro	Val	Phe	Met	Gly
35				485						490			495
	Asp	Pro	Arg	Ala									
				500									

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición que comprende por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa en donde el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa está presente a 400U/ml o más para su uso en el tratamiento, inhibición, o prevención del angioedema hereditario (HAE) y en donde dicha composición se administra por vía subcutánea, en donde la composición contiene fosfato.
- 10 **2.** La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende tampón de fosfato de sodio, opcionalmente en donde la composición comprende fosfato de sodio de 5 mM a 50 mM, fosfato de sodio de 10 mM a 30 mM, o fosfato de sodio 20 mM.
- 15 **3.** La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa está presente a hasta 500 U/ml.
- 20 **4.** La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa se administra a una dosis que varía de 500 Unidades a 5.000 Unidades, 1.000 Unidades a 3.500 Unidades, o 1.500 Unidades a 2.500 Unidades.
- 25 **5.** La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa se administra diariamente, cada dos días, cada 3 días, una vez a la semana, dos veces a la semana o tres veces a la semana.
- 30 **6.** La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al sujeto se le administra una dosis inicial alta de por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa, seguida de dosis de mantenimiento más bajas, opcionalmente en donde la dosis inicial alta es de por lo menos 1,5, 2, 3, 4, o 5 veces las dosis posteriores, y/o la dosis inicial alta se administra por vía intravenosa y el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa se administra posteriormente por vía subcutánea.
- 35 **7.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la administración del por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa lleva a niveles aumentados del inhibidor de la C1 esterasa en la sangre del sujeto, en donde los niveles en sangre del inhibidor de la C1 esterasa aumentan a por lo menos 0,3 U/ml, 0,4 U/ml o hasta 1 U/ml.
- 40 **8.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que los niveles en sangre del inhibidor de la C1 esterasa se mantienen en o por encima de 0,4 U/mL durante al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 90% o al menos el 95% del tiempo.
- 45 **9.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde:
 - (i) el angioedema hereditario es HAE Tipo I o Tipo II,
 - (ii) la administración de por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa da como resultado un tratamiento profiláctico de HAE,
 - (iii) el tratamiento de HAE da como resultado al menos una reducción en la gravedad y/o el número de ataques de HAE, o
 - (iv) la administración del por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa da como resultado el tratamiento de un ataque de HAE.
- 50 **10.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el por lo menos un inhibidor de la C1 esterasa se aísla o se purifica a partir de plasma humano o se produce de manera recombinante, y/o en la que el inhibidor de la C1 esterasa tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos el 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos del inhibidor de la C1 esterasa humana de la Figura 1.
- 55 **11.** La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende un tampón en donde el tampón no contiene citrato o ácido cítrico.
- 60 **12.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición:
 - (i) comprende por lo menos un aminoácido o sal del mismo; y/o
 - (ii) tiene un pH de entre 6.5 y 8.0.
- 65 **13.** La composición para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición se forma a partir de una forma liofilizada por reconstitución en un tampón antes de la administración.

```

1 MASRLTLLTL LLLLLAGDRA SSNP NATSSS SQDPESLQDR GEGKVATTVI SKMLFVEPIL
61 EVSSLPTTNS TTNSATKITA NTTDEPTTQP TTEPTTQPTI QPTQPTTQLP TDSPTQPTTG
121 SFCPGPVTLC SDLESHSTEA VLGDALVDFS LKLYHAFSAM KKVETNMAFS PFSIASLLTQ
181 VILGAGENTK TNLESILSYP KDFTCVHQAL KGFTTKGVTS VSQIFHSPDL AIRDTFVNAS
241 RTLYSSSPRV LSNNSDANLE LINTWVAKNT NNKISRLLDS LPSDTRLVLL NAIYLSAKWK
301 TTFDPKKTRM EPFHFKNSVI KVPMMNSKKY PVAHFIDQTL KAKVGQLQLS HNLSLVILVP
361 QNLKHRLEDM EQALSPSVFK AIMEKLEMSK FQPTLLTLPR IKVTTSQDML SIMEKLEFFD
421 PSYDLNLCGL TEDPDLQVSA MQHQTVLELT ETGVEAAAAS AISVARTLLV FEVQQPFLFV
481 LWDQQHKFPV FMGRVYDPRA

```

Figura 1

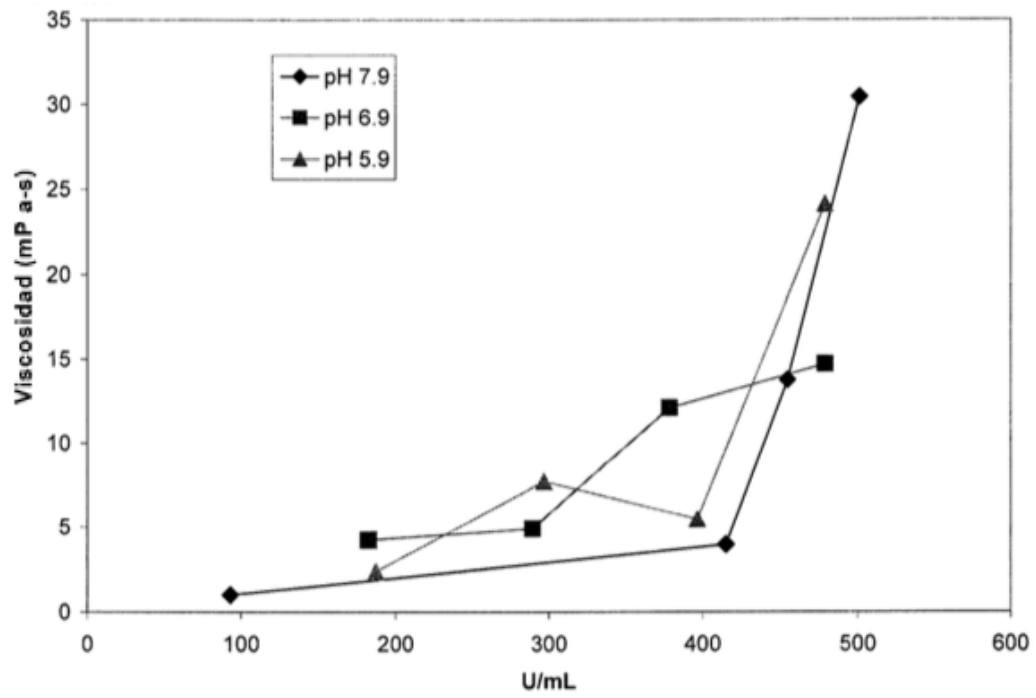


Figura 2