



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 357 941**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

A61L 2/02 (2006.01)

A61K 38/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02757260 .1**

(96) Fecha de presentación : **20.08.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1419171**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2004**

(54)

Título: **Métodos para la síntesis de una solución de hemoglobina modificada.**

(30)

Prioridad: **21.08.2001 US 934300**

(73)

Titular/es: **APEX BIOSCIENCE, Inc.**
2810 Meridian Parkway, Suite 120
Durham, North Carolina 27713, US

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2011

(72)

Inventor/es: **Talarico, Todd, Lewis y**
Stacey, Cyrus, John

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2011

(74)

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 357 941 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

Métodos para la síntesis de una solución de hemoglobina modificada

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a métodos para la purificación de una solución de polietilenglicol activado y para la síntesis de una solución de hemoglobina modificada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La sangre es el líquido circulante que transporta oxígeno y materiales nutritivos a los tejidos del cuerpo y retira dióxido de carbono y otros productos metabólicos y residuos para la excreción. La sangre consiste en un fluido, el plasma, en el que está suspendida una variedad de componentes incluyendo los glóbulos rojos. Stedman's Medical Dictionary, 26ª edición, página 214 (1995). Un componente particularmente importante de los glóbulos rojos es la proteína hemoglobina, que es específicamente responsable del transporte de oxígeno desde los pulmones a otros tejidos del cuerpo.

15 Debido a la gran demanda de sangre en los Estados Unidos y en todo el mundo, se han dirigido intensos esfuerzos de investigación al desarrollo de sustitutos de sangre basados en hemoglobina. Tales sustitutos se han producido con una variedad de modificaciones de hemoglobina purificada a fin de prevenir la toxicidad o potenciar de otro modo las propiedades de la molécula, usando una clase particularmente importante de modificación efectuada moléculas de la familia del polietilenglicol (PEG) que se han activado (aPEG) de modo que son capaces de modificar químicamente proteínas. Tal PEGilación es importante debido a que altera favorablemente la actividad, la solubilidad, la semivida en circulación in vivo, la toxicidad y la inmunogenicidad de las hemoglobinas. Véanse, generalmente, Delgado et ál. (1992) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 9:249-304; Greenwald et ál. (2000) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 17: 101-161.

25 La bibliografía revela que la hemoglobina se ha PEGilado usando una variedad de compuestos de aPEG. Un compuesto de aPEG usado para modificar la hemoglobina es la molécula de PEG activado polioxietileno (α -carboximetil, ω -carboximetoxipolioxietileno) (POE), que se hace reaccionar con hemoglobina piridoxilada para obtener hemoglobina piridoxilada-polioxietileno (PHP). Talarico et ál. (1999) Biochem. et Biophys. Acta 1476:53-65, incorporado en la presente memoria mediante referencia. Las hemoglobinas modificadas con POE son de particular interés debido a que contienen proteínas celulares que potencian su funcionalidad como eliminadores de óxido nítrico (NO), un compuesto implicado en una variedad de enfermedades. Así, existe un gran uso potencial de tales PHPs como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades ligadas a la presencia de NO en exceso, incluyendo, por ejemplo, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), una dolencia médica crítica que es refractaria a las terapias existentes. Privalle et ál. (2000) Free Radic. Biol. Med. 28:1507-17, incorporado en la presente memoria mediante referencia.

35 Aunque el PHP y otras hemoglobinas PEGiladas son muy prometedoras en estas y otras aplicaciones terapéuticas, existe un número de problemas que afectan a tales usos, notablemente la presencia de compuestos contaminantes que afectan a su seguridad o eficacia. Virus peligrosos tales como el HIV/virus del sida o virus de hepatitis, por ejemplo, a menudo contaminan la sangre entera usada para preparar la fracción de hemoglobina usada en la PEGilación, y deben retirarse en algún punto durante la preparación del producto final PEGilado mediante filtración u otros medios. Adicionalmente, biocarga tal como bacterias puede ser una fuente de contaminación bien de la hemoglobina o bien de materiales de partida tales como un aPEG, como lo pueden ser las endotoxinas, las macromoléculas complejas de lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular de bacterias Gram negativas que pueden provocar fiebre, diarrea, choque hemorrágico y otros daños tisulares. Stedman's Medical Dictionary, 26ª edición, página 572 (1995).

45 La biocarga y las endotoxinas son una fuente particularmente problemática de contaminación debido a la falta de métodos adecuados para retirarlas de la materia prima de aPEG usada en la PEGilación. Según se analizaba previamente, las moléculas de aPEG son moléculas activada de la familia del polietilenglicol. Muchas de tales moléculas activadas son lábiles en agua y, como resultado, típicamente se añaden a la fracción de hemoglobina en una forma en polvo, en vez de en solución. Aunque los aPEGs en esta forma son relativamente estables, como polvos no pueden procesarse para la retirada de contaminantes usando los métodos disponibles para aPEGs disueltos, tales como las técnicas de filtración. Aunque estos contaminantes pueden retirarse después de la PEGilación, tal retirada tiene consecuencias no deseables. Por ejemplo, aunque las endotoxinas pueden retirarse del PHP mediante cromatografía, tal cromatografía da como resultado cambios no deseables en la composición proteínica del PHP.

50 Así, existe desde hace mucho tiempo una necesidad de un método para purificar aPEGs para el uso con moléculas peptídicas y polipéptidos tales como hemoglobina. Por otra parte, existe desde hace mucho tiempo una necesidad

de métodos para usar tales aPEGs disueltos purificados en la PEGilación de péptidos y polipéptidos tales como hemoglobina, en los que el disolvente en el que está disuelto el aPEG no dé como resultado la desnaturalización o la degradación sustancial del péptido o polipéptido tal como hemoglobina.

- 5 La Patente de EE. UU. N° 5.224.903 muestra un método para producir una solución de hemoglobina químicamente modificada usando un aPEG, seguido por filtración y esterilización para retirar contaminantes. El aPEG se añade a la fracción de hemoglobina como un polvo. La Publicación Internacional N° WO 90/15613 muestra la preparación de hemoglobina libre de virus usando un aPEG no purificado.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención proporciona un método para preparar una solución de hemoglobina PEGilada que está sustancialmente libre de contaminantes. El método comprende disolver un aPEG en un disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina y en el que el aPEG es estable, filtrar el aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante, y combinar la solución de aPEG filtrada resultante con una solución de hemoglobina en medios de combinación. Más específicamente, el método comprende:

- 15 (a) disolver un polietilenglicol activado (aPEG) en un disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina y en el que dicho aPEG es estable, en donde el disolvente se selecciona del grupo que consiste en etanol, metanol y acetonitrilo;
- (b) filtrar dicho aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante, en donde los medios de filtración son o incluyen un
20 filtro de membrana de 0,2 µm; y
- (c) combinar asépticamente dicha solución de aPEG filtrada resultante con una solución de hemoglobina en medios de combinación, en donde la hemoglobina es hemoglobina libre de estroma purificada, y preparar dicha solución de hemoglobina PEGilada.

En una realización de la presente invención, el aPEG usado es POE.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una visión de conjunto esquemática de la síntesis de PHP.

La Figura 2 muestra el perfil de elución de una formulación final de PHP preparada con POE en polvo, según se determinaba mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

- 30 La Figura 3 muestra el perfil de elución de una formulación final de PHP preparada con solución de POE/etanol filtrada, según se determinaba mediante SEC.

La Figura 4 muestra una superposición de los perfiles de las Figuras 2 y 3 con una sensibilidad de aproximadamente dos veces la mostrada en las Figuras 2 y 3.

La Figura 5 muestra los datos de la Figura 4, confinados a la vecindad de la fracción de alto peso molecular del perfil de elución de SEC y con una sensibilidad de aproximadamente 100 veces la de la Figura 4.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- El método de la presente invención abarca la preparación de una solución de aPEG que está sustancialmente libre de contaminantes y métodos para usar estos aPEGs purificados en la preparación de una solución de hemoglobina PEGilada. Más específicamente, el método de la presente invención proporciona la preparación de una solución de aPEG filtrada que es estable y está sustancialmente libre de contaminantes. Los métodos implican disolver un aPEG
40 en un disolvente en el que el aPEG es estable y a continuación filtrar el aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante.

- “aPEG” y el plural “aPEGs” se refieren a polietilenglicol (PEG) y moléculas relacionadas con PEG que se han activado a fin de que sean capaces de modificar químicamente proteínas, péptidos u otras moléculas. Generalmente, un aPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3 kD a aproximadamente 50 kD. Se
45 contempla que “aPEG” abarque una variedad de tales compuestos, incluyendo, pero no limitados a, polietilenglicol activado, polipropilenglicol activado y modificaciones y derivados de los mismos, tales como POE, amino-PEGs, maleimido-PEGs, succinimidil-PEGs, (succinato de succinimidilo)-PEGs y base-PEGs. Otros ejemplos de aPEGs

se proporcionan en Greenwald et ál. (2000) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 17: 101-161 y Delgado et ál. (1992) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 9:249-304, ambos de los cuales se incorporan en la presente memoria mediante referencia.

Los aPEGs purificados de la invención pueden usarse para PEGilar cualquier proteína o péptido de interés. Según se usan en la presente memoria, "PEGilar" o "PEGilación" se refieren a la modificación química de un péptido, polipéptido u otra molécula por un aPEG. En una realización preferida, la proteína de interés es hemoglobina. Sin embargo, la invención pretende aplicarse generalmente a cualquier proteína, péptido u otra molécula que vaya a PEGilarse. Tales proteínas y péptidos incluyen, por ejemplo, hormona del crecimiento, factores de crecimiento tales como FGF, IGF, IL-2, VEGF, etc. Ejemplos adicionales de tales proteínas y péptidos se proporcionan, por ejemplo, en Greenwald et ál. (2000) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 17: 101-161 y Delgado et ál. (1992) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 9:249-304. En una realización preferida, la PEGilación es de hemoglobina con POE.

En el método de purificación, un aPEG de interés se disuelve en un disolvente en el que es estable. Según se usa en la presente memoria, el término "estable" pretende significar que un alto porcentaje de un aPEG permanece en su forma activa a lo largo del transcurso de la PEGilación. Por "alto porcentaje" se pretende un valor de más de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más.

La estabilidad puede medirse en una variedad de modos conocidos por un experto en la técnica, incluyendo métodos para ensayar la pérdida del grupo activador del aPEG a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la estabilidad de POE en solución puede controlarse al determinar la cantidad de pérdida de N-hidroxisuccinimida (NHS) del POE que se produce a lo largo del tiempo. La cantidad de pérdida de NHS puede determinarse mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La especie de POE puede separarse y cuantificarse usando este método y puede determinarse una velocidad de pérdida de NHS. Esta puede indicarse como el porcentaje de actividad que permanece a lo largo del transcurso de la exposición a un disolvente. Alternativamente, el aPEG puede derivarse y las diferentes formas pueden separarse mediante HPLC directamente. Un ejemplo de tal método para determinar la estabilidad de POE en solución se da en el Ejemplo 3 de la sección experimental. Aunque este es un método preferido para tal determinación, otros métodos son conocidos por los expertos.

Disolventes que se usan en la práctica de la invención son etanol, metanol y acetonitrilo. El disolvente se elige para mantener la estabilidad del aPEG. Se considerará un número de factores al elegir un disolvente, incluyendo la solubilidad del aPEG en el disolvente, la estabilidad del aPEG en el disolvente, la compatibilidad del disolvente con la proteína de interés si el aPEG se va a usar con una proteína particular, la toxicidad del disolvente, la miscibilidad del disolvente con agua y la capacidad del procedimiento de producción para retirar el disolvente.

Una vez que un aPEG se ha disuelto en el disolvente en el que es estable, se purifica a través de medios de filtración que son o incluyen un filtro de membrana de 0,2 μm . Según se define en la presente memoria, "medios de filtración" se refiere a medios para reducir sustancialmente los niveles de contaminantes en el aPEG disuelto mediante filtración. La presente invención contempla una variedad de medios de filtración diferentemente formulados dirigidos a diferentes contaminantes que deben reducirse hasta diferentes grados, variando el carácter particular de la filtración dependiendo del contaminante que vaya a reducirse. Según se define en la presente memoria, "contaminantes" se refiere a compuestos que incluyen, pero no se limitan a, biocarga, endotoxina y materiales en partículas.

En una realización de la presente invención, los medios de filtración se dirigen a la reducción sustancial de contaminantes incluyendo biocarga y endotoxina. "Biocarga," según se define en la presente memoria, se refiere a organismos tales como bacterias que pueden estar presentes en el aPEG disuelto. Existe una variedad de medios de filtración conocidos por un experto normal que pueden usarse para retirar biocarga, incluyendo membranas de filtración con un tamaño de poro suficientemente pequeño a fin de retener la biocarga mientras que permiten que el aPEG disuelto pase al filtrado. Tales membranas incluyen, por ejemplo, filtros de esterilización de 0,2 μm . La elección de un filtro de esterilización particular depende de una variedad de factores incluyendo el disolvente en el que se ha disuelto el aPEG. Específicamente, los disolventes extremadamente no polares pueden dañar o degradar filtros particulares. Así, un aPEG disuelto en un disolvente polar puede filtrarse usando un filtro compuesto por polietersulfona o acetato de celulosa, tal como un filtro Sartobran® (Sartorius), mientras que un aPEG disuelto en un disolvente extremadamente no polar puede filtrarse apropiadamente usando un filtro compuesto de politetrafluoroetileno (PTFE) o nailon. Por ejemplo, para disolventes moderadamente polares tales como metanol, etanol e isopropanol, se contemplan los filtros N₆₆® Posidyne® (Pall corporation) o Durapore® (Millipore), mientras que los filtros Sartoflour® (Sartorius) o Emflon PFR® (Pall corporation) se contemplan para disolventes muy no polares.

"Endotoxina", según se define en la presente memoria, se refiere a los lipopolisacáridos complejos de la pared celular de bacterias Gram negativas. Las endotoxinas son capaces de producir un número de afecciones médicas graves incluyendo, por ejemplo, el choque séptico, en el que los síntomas varían de efectos menores, tales como escalofríos, fiebre y náuseas, hasta afecciones graves tales como fallo cardíaco, coma y, en la mayoría de los casos extremos, muerte, y son una de las formas más importantes de pirógenos, esto es, compuestos inductores de fiebre,

exógenos. Stedman's Medical Dictionary, 26ª edición, página 1475 (1995). Los niveles de endotoxinas pueden reducirse sustancialmente a través de una variedad de medios de filtración, incluyendo medios de filtración en los que endotoxinas cargadas negativamente son retenidas por medios de filtración cargados positivamente. Un ejemplo de medios de filtración cargados positivamente capaces de retirar endotoxina es la membrana de filtración N₆₆® Posidyne® (Pall corporation). También pueden usarse otras membranas tales como la serie Zeta Plus® (Cuno) y los absorbentes de membrana Sartobind™ (Sartorius), así como adsorbentes cargados positivamente, incluyendo, por ejemplo, resinas y columnas de relleno cargadas positivamente. La elección de un disolvente, un tampón, una condición salina, etc. particular para cada uno de estos medios de filtración será bien conocida para el experto.

La filtración a través de los medios de filtración dará como resultado una solución de aPEG que está sustancialmente reducida en biocarga o endotoxina. Por "sustancialmente reducida" se entiende que los contaminantes se reducen en al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, dependiendo el valor pretendido del contaminante particular que se está reduciendo sustancialmente. La reducción sustancial de contaminantes de biocarga, por ejemplo, se refiere a reducciones de biocarga bacteriana hasta no más de 1 unidad formadora de colonias por ml (CFU/ml), y se dirige preferentemente a 0 CFU/ml. La determinación de la biocarga bacteriana pueden ensayarse mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos normales, incluyendo, pero no limitados a, capturar organismos sobre filtros, colocar los filtros sobre placas de agar R2A a 30-35°C durante 4 días y a continuación contar el número de colonias resultantes. Véase, por ejemplo, Official Methods of Analysis of AOAC International (1995) 17ª ed., 17.2.05 Official Method 986.32 o 17.3.08 Official Method 983.25. Alternativamente, la biocarga puede ensayarse mediante técnicas tales como cultivo en placa directo o mediante cultivo en placa con vertido, ambos de los cuales son conocidos para el experto. La reducción sustancial de contaminantes de endotoxina se refiere a reducciones de los niveles de endotoxina en 500 o más preferentemente >5000 EU/cm² de área del filtro. La determinación de los niveles de endotoxina puede ensayarse mediante una variedad de métodos bien conocidos por los expertos normales, incluyendo, pero no limitados a, el ensayo del lisado amebocítico de Limulus (LAL). USP 24, NF19 <85> Bacterial Endotoxins Test, 1829-1831.

Por otra parte, una solución de aPEG que se ha reducido sustancialmente en contaminantes se caracteriza por no inducir efectos patofisiológicos característicos de la presencia de contaminantes al administrar in vivo a un sujeto (es decir, un mamífero, preferiblemente un conejo, ratón, bóvido, cerdo, mono, ser humano, etc.). Pongamos por caso, síntomas fisiológicos incluyen fiebre, coagulación intravascular diseminada, hipotensión y choque cardiovascular. Roth y Levin (1994) Meth. Enzymol. 231:75-91. De ahí que, según se usa en la presente memoria, una solución de aPEG "sustancialmente reducida" en contaminantes sea una que no es infecciosa, de modo que la solución pueda manipularse sin dañar o infectar a alguien expuesto a la misma.

"Medios de filtración" puede usarse para referirse a medios de filtración simples, esto es, a una sola membrana u otro medio de filtración. Sin embargo, la presente invención no se limita a uno solo de tales medios de filtración, y en cambio abarca medios de filtración tanto simples como múltiples. Así, "medios de filtración" se usa para abarcar métodos de filtración múltiples. Los medios de filtración múltiples pueden encontrar particular utilidad en situaciones en las que, por ejemplo, sea ventajoso retirar biocarga sobre una membrana y endotoxina sobre una membrana, columna de relleno, medio impregnado, etc. separado. Un experto normal en la técnica será capaz de determinar situaciones en las que son preferibles tales medios de filtración múltiples. Tales situaciones pueden incluir casos en los que los medios de filtración sucesivos actúan para reducir los niveles de biocarga o endotoxina por debajo de los alcanzados por medios de filtración simples, y casos en los que los medios de filtración simples no exhiben todas las propiedades ventajosas que exhiben dos medios de filtración usados conjuntamente. Un ejemplo de tales medios de filtración múltiples incluye una combinación de un filtro esterilizante para retirar la biocarga y un filtro grueso impregnado cargado positivamente para retirar endotoxinas.

Usando los métodos presentados anteriormente para la preparación de una solución de aPEG filtrada que sea estable y esté sustancialmente libre de contaminantes, la presente invención proporciona un método para usar estos aPEGs purificados en la preparación de una solución de péptido o polipéptido PEGilado. Específicamente, la presente invención proporciona un método para disolver un aPEG en un disolvente adecuado para la adición a una solución de péptido o polipéptido y en el que el aPEG sea estable, filtrar el aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante, y combinar asepticamente la solución de aPEG filtrada resultante con una solución de péptido o polipéptido en medios de combinación.

En una realización preferida, la presente invención se dirige a un método para usar un aPEG purificado en la preparación de una solución de hemoglobina PEGilada. Específicamente, la presente invención proporciona un método para disolver un aPEG en un disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina y en el que el aPEG sea estable, filtrar el aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante, y combinar la solución de aPEG filtrada resultante con una solución hemoglobina en medios de combinación.

Según se define en la presente memoria, "solución de hemoglobina" se refiere a cualquiera de las diversas formas

de soluciones de hemoglobina obtenidas de sangre entera o medios recombinantes que pueden usarse para PEGilación. Tales soluciones pueden contener otras macromoléculas además de hemoglobina. A menudo es deseable, por ejemplo, que las soluciones de hemoglobina que se PEGilan para producir PHP también contengan importantes moléculas antioxidantes endógenas tales como catalasa y SOD. Privalle et ál. (2000) Free Radic. Biol. Med. 28:1507-17. La sangre preferida usada en la invención es sangre humana caducada. Sin embargo, todos los métodos de la presente invención pueden usarse con sangre bovina, porcina, ovina y de otros mamíferos solo con pequeñas modificaciones que son conocidas por un experto en la técnica. Aunque la presente invención contempla específicamente el uso de soluciones de hemoglobina preparadas para la modificación con POE, se contemplan otros modificadores de aPEG.

- 5 El término “disolvente adecuado para la adición a una solución de péptido o polipéptido,” según se define en la presente memoria, se refiere a un disolvente que, cuando se añade a la solución de péptido o polipéptido en la proporción requerida, no desnatura o degrada significativamente el péptido o polipéptido en la solución a lo largo del transcurso de la reacción de PEGilación. Según se usa en la presente memoria, los péptidos o polipéptidos no se desnaturizan o degradan significativamente si los niveles de estos compuestos permanecen más de aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más sin degradar o desnaturizar después de la adición del disolvente a lo largo de la duración de la PEGilación.

- 10 Según se usa en la presente memoria, “disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina” se usa para referirse a una realización específica de la presente invención en la que el polipéptido es hemoglobina. La definición de este término es idéntica a la definida anteriormente para disolventes adecuados para la adición a una solución de péptido o polipéptido. Esto es, “un disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina” es uno que no degrada significativamente la hemoglobina durante el transcurso de la reacción. La hemoglobina no se desnatura o degrada significativamente si los niveles de hemoglobina permanecen más de aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más sin degradarse o desnaturizarse después de la adición del disolvente a lo largo del transcurso de la PEGilación.

- 25 Existe una variedad de ensayos conocidos por los expertos para medir la degradación de un péptido o polipéptido. La degradación para polipéptidos y péptidos en general puede ensayarse mediante técnicas que incluyen, por ejemplo, proteína soluble total, espectros UV-VIS, actividad enzimática, etc. La degradación para el polipéptido hemoglobina puede evaluarse mediante estos métodos, y también mediante métodos específicos para hemoglobina, tales como la concentración de hemoglobina o un ensayo de methemoglobina.

- 30 La elección de un disolvente adecuado para la adición a una solución de péptido o polipéptido dependerá de una variedad de factores. Por ejemplo, la elección del disolvente requiere un equilibrio de la solubilidad y la estabilidad del aPEG disuelto con los efectos negativos que tenga el disolvente sobre la solución de péptido o polipéptido. Puede ser necesario determinar la fracción del volumen de la reacción de PEGilación que puede ser ocupada por el disolvente sin desnaturizar o degradar la solución de péptido o polipéptido. Así, por ejemplo, un disolvente particular puede ser apropiado para el uso cuando se añade a concentraciones inferiores, hasta, por ejemplo, 15% del volumen de reacción final, mientras que proporciones superiores del mismo disolvente pueden dar como resultado la desnaturización o degradación de la solución de péptido o polipéptido. Así, necesita considerarse una gama de factores cuando se determina la elección de un disolvente particular, incluyendo, pero no limitados a, la solubilidad del aPEG en el disolvente, la estabilidad del aPEG en el disolvente, los efectos del disolvente sobre la solución de péptido o polipéptido y la proporción máxima del volumen de la reacción de PEGilación que puede ocupar el disolvente sin efectos perjudiciales.

- La adición de disolventes orgánicos a soluciones acuosas de proteínas puede dar como resultado una desnaturización sustancial de proteínas según se evidencia por una pérdida de una actividad de proteína o por agregación y precipitación de proteínas. Así, el uso de disolventes específicos, su concentración y tiempo de contacto variarán para cada péptido o polipéptido que ha de modificarse mediante PEGilación.

- 45 Para la adición a una solución de hemoglobina, pueden usarse metanol, etanol y acetonitrilo. Para el uso con POE en la modificación de hemoglobina, puede preferirse el etanol. Con etanol, incluso al 20% del volumen final no se exhibía una desnaturización o degradación sustancial de la solución de hemoglobina.

- Según se define en la presente memoria, “medios de combinación” se refiere a un aparato para mezclar aPEG disuelto y una solución de péptido o polipéptido e incluyen cualquier dispositivo para mezclar dos soluciones, incluyendo, pero no limitado a, dispositivos para mezclar pequeñas cantidades de dos soluciones así como dispositivos para llevar a cabo tales mezclas a escalas de procedimiento. Debido a que es deseable excluir tanta contaminación introducida externamente como sea posible de las fracciones de aPEG y péptido o polipéptido de la reacción de PEGilación, medios de combinación particularmente deseables son un aparato que permita la introducción aséptica de las fracciones de aPEG y péptido o polipéptido. En una realización particular, este aparato puede tener varias compuertas de entrada a través de las cuales estas fracciones pueden introducirse asépticamente. Se contempla que tal introducción aséptica se produce mediante una variedad de mecanismos, incluyendo al acoplar asépticamente los medios de filtración para filtrar un aPEG a una compuerta de entrada del

aparato a través de una longitud de tubo de un tipo conocido por un experto en la técnica.

Como un ejemplo, el acoplamiento aséptico puede efectuarse al realizar las operaciones en un área de clasificación apropiada. Alternativamente, el recipiente puede acoplarse a un filtro preesterilizado que contiene una válvula y un filtro sanitario. La válvula puede cerrarse y el recipiente y el conector pueden esterilizarse a través de introducción de vapor de agua. En el momento del procesamiento, la válvula se abre y la longitud de recorrido desde la salida del filtro hasta el recipiente es estéril.

El método de la presente invención para la preparación de una solución de hemoglobina PEGilada usando aPEG disuelto ofrece un número de ventajas sobre métodos convencionales que utilizan un aPEG en forma de polvo. Una ventaja particularmente importante es la mayor esterilidad resultante cuando se usan conexiones de aporte de fluidos cerradas. Tal introducción puede efectuarse, por ejemplo, al acoplar asépticamente los medios de filtración de aPEG a los medios de combinación. Esto está en contraste con la situación para la adición de aPEG en polvo, cuando la introducción de biocarga debe controlarse, por ejemplo, al añadir material en polvo a una compuerta abierta de los medios de combinación bajo una campana de flujo laminar, o cuando el personal usa guantes y está entrenado en los métodos apropiados para realizar tales conexiones pero no se usa un ambiente especial.

Adicionalmente, resultan ventajas del uso de aPEGs disueltos en comparación con aPEGs en forma de polvo. Una de tales ventajas es la disminución en la formación de productos de alto peso molecular en reacciones de PEGilación a escala de procedimiento usando aPEGs disueltos en oposición a polvos de aPEGs. Aunque tales productos no se forman en una extensión sustancialmente diferente en reacciones a pequeña escala usando aPEG disuelto que en reacciones similares que usan un aPEG en forma de polvo, se forman cantidades sustancialmente menores de tales productos de reacción en reacciones a escala de procedimiento que usan solamente aPEG disuelto. Según se define en la presente memoria, reacciones a "pequeña escala" se refiere a reacciones de 1-5 litros, mientras que la reacciones de 10 litros o más se denominan "escala de procedimiento". Se contempla que "cantidades sustancialmente menores", según se define en el contexto de estos productos de alto peso molecular, significa reducidas en al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. Métodos para la determinación de niveles de tales materiales incluyen el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), según se describe en Talarico et ál., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1476:53-65, u otros métodos tales como dispersión de luz láser de ángulo bajo, medidas de los materiales en partículas y conteo directo.

En particular, el uso de aPEG disuelto en la PEGilación a escala de procedimiento da como resultado la reducción en productos de alto peso molecular en la producción a escala de procedimiento de PHP usando POE. Los análisis por SEC de PHP obtenido usando POE en polvo muestran la presencia de un pico de masa alta de aproximadamente 15.548.068. En completo contraste, el análisis por SEC de reacciones a escala de procedimiento realizadas con POE disuelto muestra cantidades sustancialmente menores de este pico de alto peso molecular. Como un ejemplo específico de este efecto, el PHP producido a partir de POE disuelto en etanol al 95% no muestra esencialmente tal material de alto peso molecular, al menos en el intervalo de sensibilidad del análisis realizado.

Además, la introducción de POE como una solución da como resultado una reducción de materiales en partículas macroscópicos. Por ejemplo, POE añadido como un polvo a grandes recipientes de reacción da como resultado una condición en la que una cantidad significativa del polvo descansa sobre la superficie del líquido hasta que puede disolverse. Si están presentes grandes partículas o granos de POE, la proteína en solución (hemoglobina) se hace reaccionar sobre la superficie de los gránulos. Puesto que el POE es bifuncional, resulta la reticulación de la proteína. La reticulación es intensiva en la superficie de los gránulos y resulta un "gel" de proteína. Este gel, o masa de proteína reticulada, tiene 1 o más micras de diámetro. La formación de estas macropartículas da como resultado la obturación de filtros usados en operaciones de purificación aguas abajo y una pérdida de producto. Al eliminar cualesquiera "gránulos" de POE presentes en la adición en polvo, se elimina la formación de estas partículas de proteína reticulada. El resultado es una reacción de modificación química y un procedimiento de purificación más eficaces y reproducibles.

En la siguiente sección, se presentarán ejemplos ilustrativos. Estos ejemplos se presentan para ilustrar el mejor modo y realizaciones preferidas de la presente invención, y no pretenden limitar la invención reivindicada a no ser que se especifique otra cosa.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Ensayo de Reducción de Biocarga en una Solución de POE Filtrada

100,7 gramos de POE de PM 3000 se disolvieron en 300 ml de etanol al 95% y 240 ml de la solución resultante se filtraron a través de un filtro Posidyne de 0,2 µm de 47 mm de diámetro bajo presión positiva. El filtrado se recogió en una botella de vidrio estéril y las muestras se retiraron, se diluyeron y se filtraron a través de una unidad filtrante Milliflex para la enumeración de la biocarga. Las muestras se pusieron sobre agar R2A estéril y se incubaron durante

4 días a 30-35 °C. Véase, por ejemplo, Official Methods of Analysis of AOAC International (1995) 17^a, 17.2.05 Official Method 986.32 o 17.3.08 Official Method 983.25. La solución de POE contenía 151 CFU/ml antes de la filtración y 0 CFU/ml después de la filtración.

Ejemplo 2: Ensayos de Reducción de Endotoxinas en Soluciones de POE Filtradas

A. Ensayo de Reducción de Endotoxinas en una Solución de POE/Etanol Filtrada

1 ml de endotoxina de LPS de E. coli purificada (Charles Rivers Endosafe®) se añadió a 435 ml de una solución de POE de PM 3000/etanol (1:3 p/v), la solución se muestreó y a continuación se hizo pasar a través de un filtro Posidyne de 0,2 µm de 47 mm de diámetro bajo presión positiva y se recogió en una botella de vidrio libre de pirógenos. El filtrado se muestreó y las muestras tanto de la fracción reunida de partida como de la fracción reunida de filtrado se diluyeron en agua libre de endotoxinas. El contenido de endotoxinas de cada dilución se determinó mediante un ensayo de LAL turbidimétrico cinético. La fracción reunida de partida descartada contenía 1.009.200 EU y el filtrado contenía 346.375 EU. Así, 662.825 EU eran retiradas por el filtro.

B. Ensayo de Reducción de Endotoxinas en una solución de POE/Metanol Filtrada

Aproximadamente 2 millones de unidades de endotoxina de LPS de E. coli purificada se añadieron a 12 ml de una solución de POE de PM 3000/metanol (1:3 p/v), la solución se muestreó y 10 ml se hicieron pasar a través de un filtro Posidyne de 0,2 µm de 47 mm de diámetro bajo presión positiva y se recogieron en una vasija de vidrio libre de pirógenos. El filtrado se muestreó y las muestras tanto de la fracción reunida de partida como de la fracción reunida de filtrado se diluyeron en agua libre de endotoxinas. La fracción reunida de partida contenía 1.197.490 EU y el filtrado contenía 5290 EU. Así, 1.192.200 EU eran retiradas por el filtro.

C. Ensayo de Reducción de Endotoxinas en una solución de POE/Acetonitrilo Filtrada

Aproximadamente 2 millones de unidades de endotoxina de LPS de E. coli purificada se añadieron a 12 ml de una solución de POE de PM 3000/acetonitrilo (1:3 p/v), la solución se muestreó y 10 ml se hicieron pasar a través de un filtro Posidyne de 0,2 µm de 47 mm de diámetro bajo presión positiva y se recogieron en una botella de vidrio libre de pirógenos. El filtrado se muestreó y las muestras tanto de la fracción reunida de partida como de la fracción reunida de filtrado se diluyeron en agua libre de endotoxinas. La fracción reunida de partida contenía 1.095.580 EU y el filtrado contenía 273 EU. Así, una reducción de 1.095.307 EU era alcanzada por el filtro.

Ejemplo 3: Estabilidad de POE en Etanol

Se disolvió POE en etanol (1:3 p/v) y se añadió en partes alícuotas a un vial de vidrio. En diversos puntos temporales se retiró una parte alícuota del vial y el POE se hizo reaccionar con hidróxido amónico. Muestras de cada punto temporal se diluyeron hasta 1 mg/ml y se analizaron mediante HPLC para determinar el porcentaje de actividad del POE en solución. Los resultados se muestran posteriormente en la Tabla 1.

Tabla 1

Estabilidad de POE en Etanol	
Tiempo (h)	Actividad (%)
0	97,6
0,5	97,6
1	97,3
2	96,8
3	96,0
4	95,8
24	85,9

Ejemplo 4: Reducción de Endotoxinas y Productos de Alto Peso Molecular en Preparaciones a Escala de Procedimiento de PHP con POE en Polvo frente a una Solución de POE/Etanol Filtrada

A. Preparación de PHP con POE en Polvo

- 5 Se preparó PHP a partir de hemoglobina purificada libre de estroma. La hemoglobina se modificó químicamente con 5-fosfato de piridoxal bajo condiciones predeterminadas. La unión de POE se realizó como sigue. En primer lugar, el POE se añadió a la solución de hemoglobina en un exceso molar de aproximadamente 10 veces. Por ejemplo, 1953 g de POE se añadieron a 70 litros de hemoglobina piridoxilada contenida en un reactor agitado de acero inoxidable de 100 litros al verter el POE a través de un embudo de 10,2 cm (4 pulgadas) unido a una compuerta sanitaria de 3,8 cm (1,5 pulgadas) en la parte superior del reactor. La solución se agitó para permitir la disolución y la mezcladura a fondo del POE. La reacción se deja avanzar durante 40 minutos y a continuación la hemoglobina modificada se retiró para el procesamiento adicional.

B. Preparación de PHP con solución de POE/Etanol Filtrada

- 15 PHP preparado a partir de una solución de POE/EtOH filtrada se fabrica como se describe anteriormente con las siguientes modificaciones. 1953 g de POE se disolvieron en 6 litros de etanol al 95%, se calentaron hasta 40°C en un recipiente de acero inoxidable de presión graduada con agitación durante 20 minutos. A continuación, la solución se filtró bajo presión (2,07 bares, 30 PSIG) a través de un filtro de cápsula Posidyne de 0,2 µm unido, hacia un recipiente de modificación química de 100 litros que contenía hemoglobina piridoxilada. La solución en el reactor se agitó durante la adición del POE filtrado.

20 *C. Reducción de Endotoxinas en PHP Preparado con POE en Polvo frente a Solución de POE/Etanol Filtrada*

- 25 Las endotoxinas se ensayaron en PHP preparado bien con POE en polvo o bien con una solución de POE/etanol filtrada mediante el método de coagulación de gel mediante LAL. Véase USP 24, NF19 <85> Bacterial Endotoxins Test, 1829-1831. Según se muestra en las Tablas 2 y 3 posteriormente, los niveles de endotoxinas se reducían sustancialmente cuando la solución de POE/etanol filtrada se usaba como el material de alimentación para la modificación química.

Tabla 2

Contenido de Endotoxinas de PHP – Adición de POE en Polvo	
Lote	Contenido de Endotoxinas (EU/ml)
A	0,50
B	0,26
C	0,24
D	0,26

Tabla 3

Contenido de Endotoxinas de PHP – Adición de POE Líquido	
Lote	Contenido de Endotoxinas (EU/ml)
E	$\leq 0,03$
F	$\leq 0,03$
G	$\leq 0,03$
H	$\leq 0,06$

D. Reducción de Productos de Alto Peso Molecular en PHP Preparado con POE en Polvo frente a Solución de POE/Etanol Filtrada

- 5 Los productos de alto peso molecular se ensayaron en PHP preparado con POE en polvo o con una solución de POE/etanol filtrada. Se realizaron análisis usando SEC según se describe en Talarico et ál., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1476:53-65, y se muestran en las Figuras 2-5. Las Figuras 2 y 3 muestran los perfiles de elución de PHP preparado con POE en polvo o con solución de POE/etanol filtrada, respectivamente. La Figura 4 muestra una superposición de los dos perfiles de las Figuras 2 y 3 a una escala de sensibilidad vertical ampliada de aproximadamente dos veces la mostrada para los perfiles no superpuestos. La Figura 5 muestra la misma superposición que la Figura 4, pero con una sensibilidad vertical aproximadamente 100 veces la de la Figura 4.

- 10 Según se muestra más claramente en la Figura 5, el perfil de PHP obtenido usando POE en polvo muestra material de producto de alto peso molecular que se eluye aproximadamente a los 10,3 minutos, con una masa de 15.548.068. En contraste, el perfil de PHP obtenido de POE/etanol filtrados no muestra ningún pico en esta región, incluso a la escala de alta sensibilidad del perfil, indicando la presencia reducida sustancial de estos materiales de alto peso molecular en PHP obtenido con materiales de partida de aPEG disueltos.

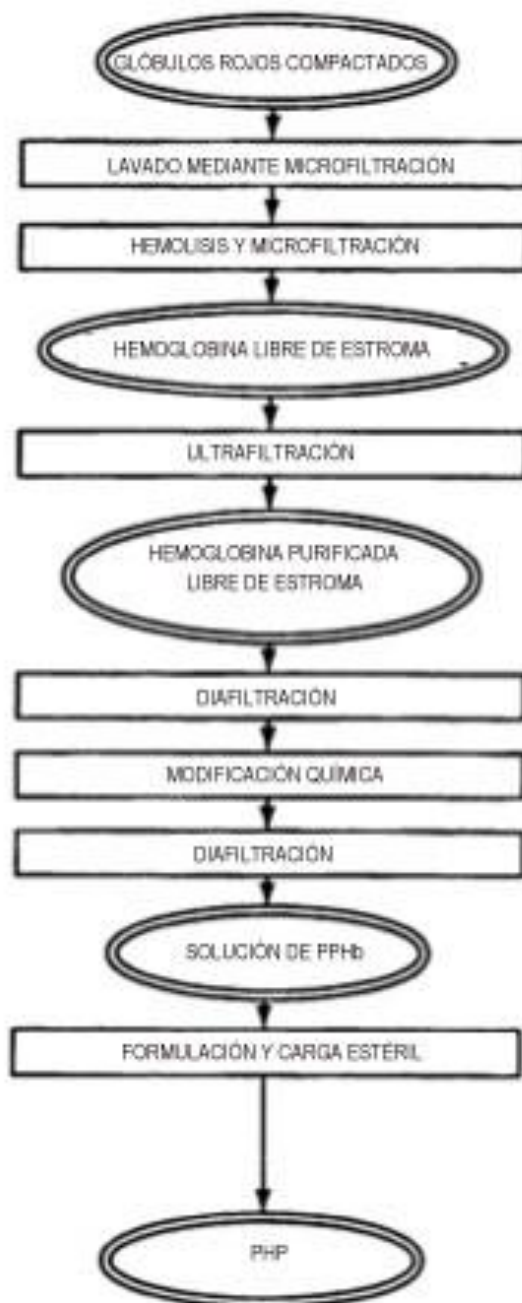
Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica que trata esta invención.

- 20 Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, será obvio que pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una solución de hemoglobina PEGilada que está sustancialmente libre de contaminantes, que comprende:
 - 5 (a) disolver un polietilenglicol activado (aPEG) en un disolvente adecuado para la adición a una solución de hemoglobina y en el que dicho aPEG es estable, en donde el disolvente se selecciona del grupo que consiste en etanol, metanol y acetonitrilo;
 - (b) filtrar dicho aPEG disuelto a través de medios de filtración que reducen sustancialmente los niveles de contaminantes en la solución de aPEG filtrada resultante, en donde los medios de filtración son o incluyen un filtro de membrana de 0,2 μm ; y
 - 10 (c) combinar asépticamente dicha solución de aPEG filtrada resultante con una solución de hemoglobina en medios de combinación, en donde la hemoglobina es hemoglobina libre de estroma purificada, y preparar dicha solución de hemoglobina PEGilada.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aPEG es polioxietileno (POE) activado.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los medios de filtración reducen sustancialmente los niveles de contaminantes de endotoxinas en la solución de aPEG filtrada.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los medios de filtración reducen los niveles de contaminantes de endotoxinas en la solución de aPEG filtrada en al menos 500 EU/cm² de área del filtro.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los medios de filtración comprenden un filtro de nailon de 0,2 μm .
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de hemoglobina comprende hemoglobina piridoxilada libre de estroma.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los medios de filtración y los medios de combinación están unidos asépticamente.

PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACIÓN DE PHP
FASES DEL PROCEDIMIENTO



PPHb = POLIOXIETILENO PIRIDOXILADO-HEMOGLOBINA

PHP = HEMOGLOBINA PIRIDOXILADA-POLIOXIETILENO (PRODUCTO FINAL)

FIG. 1

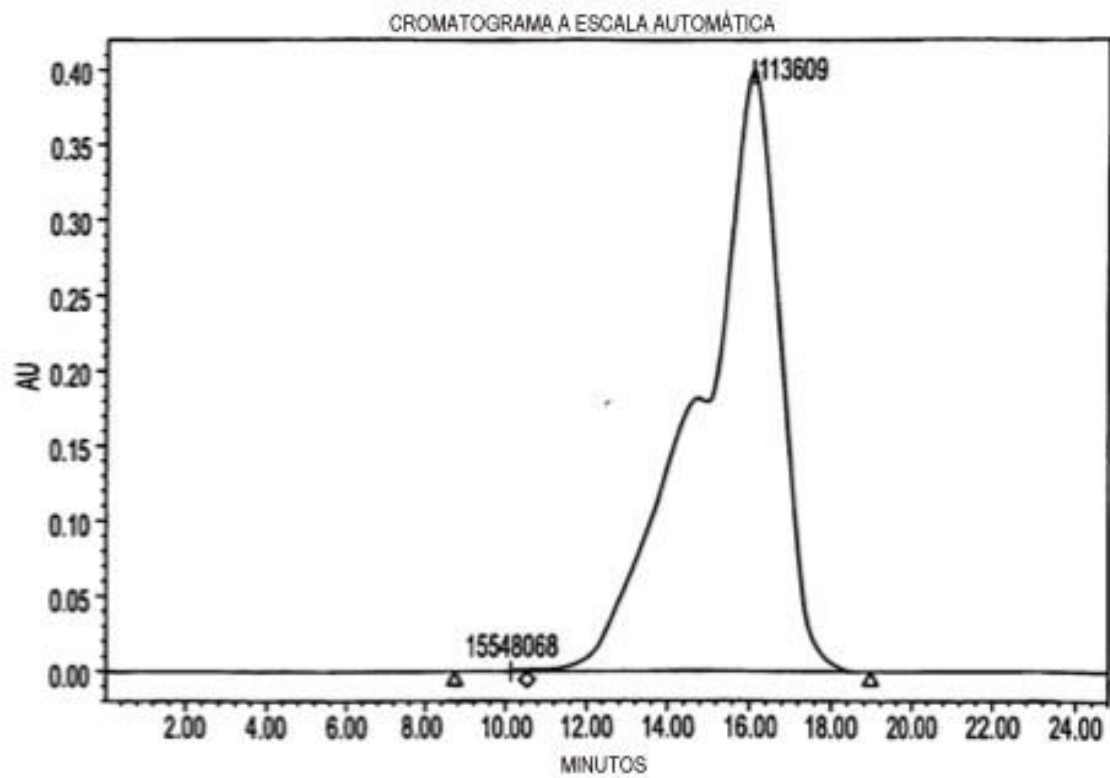


FIG. 2

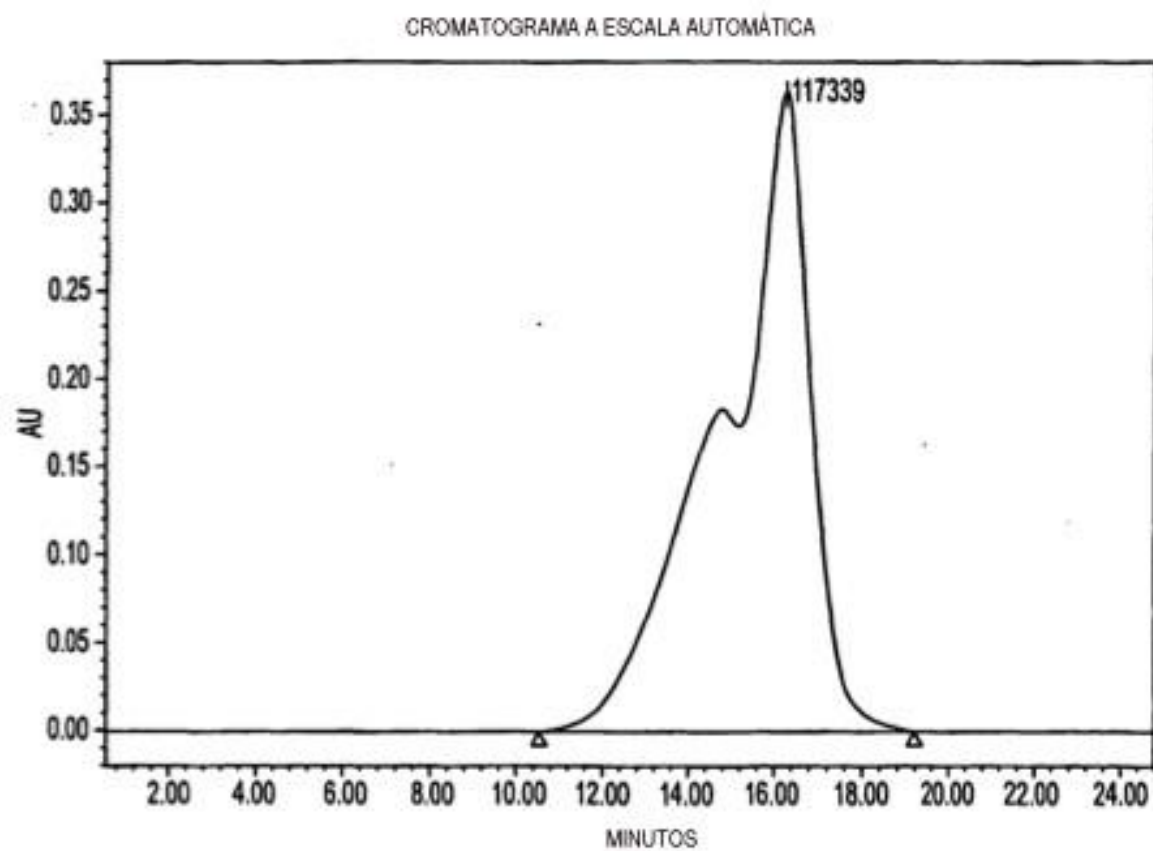


FIG. 3

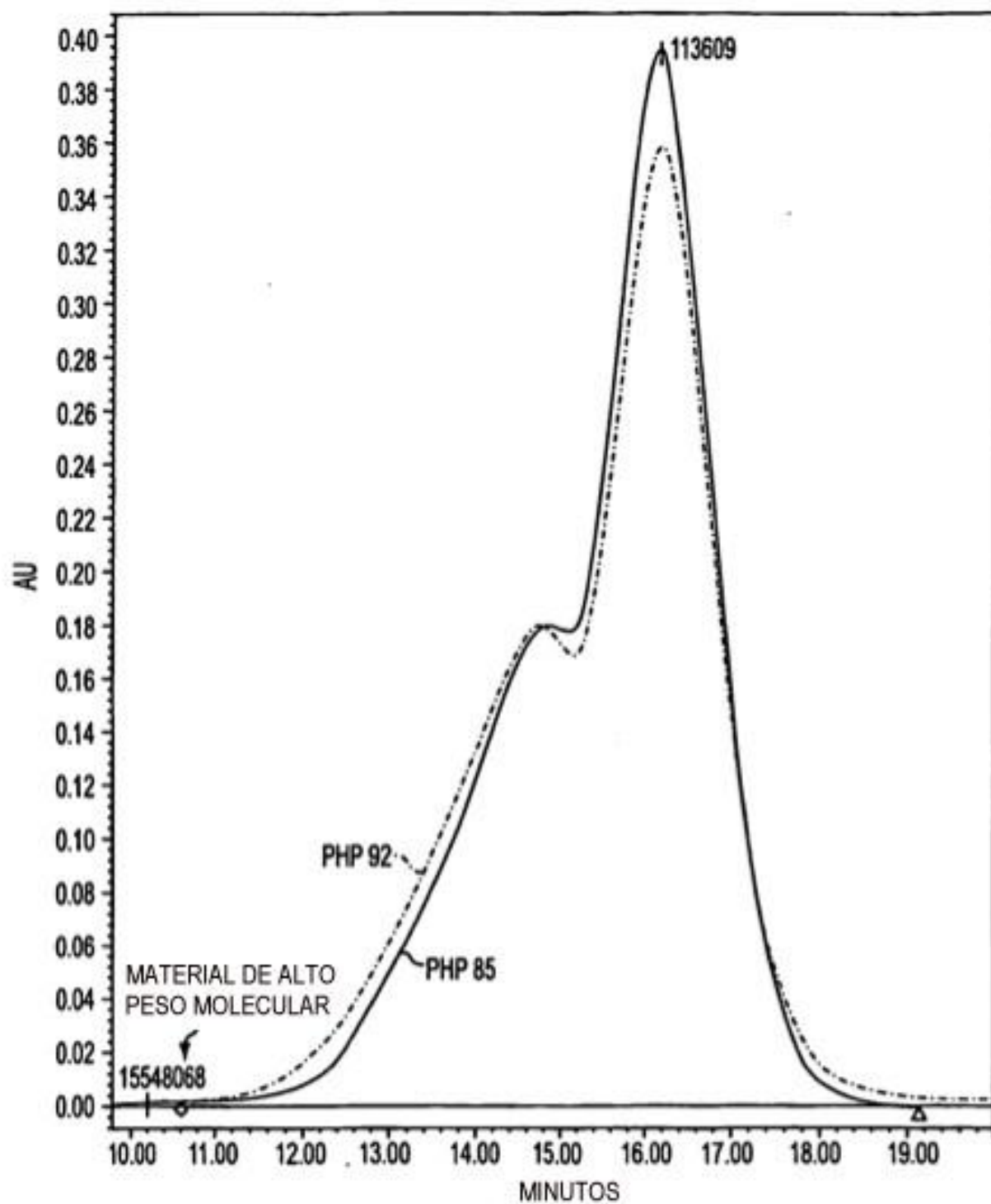


FIG. 4

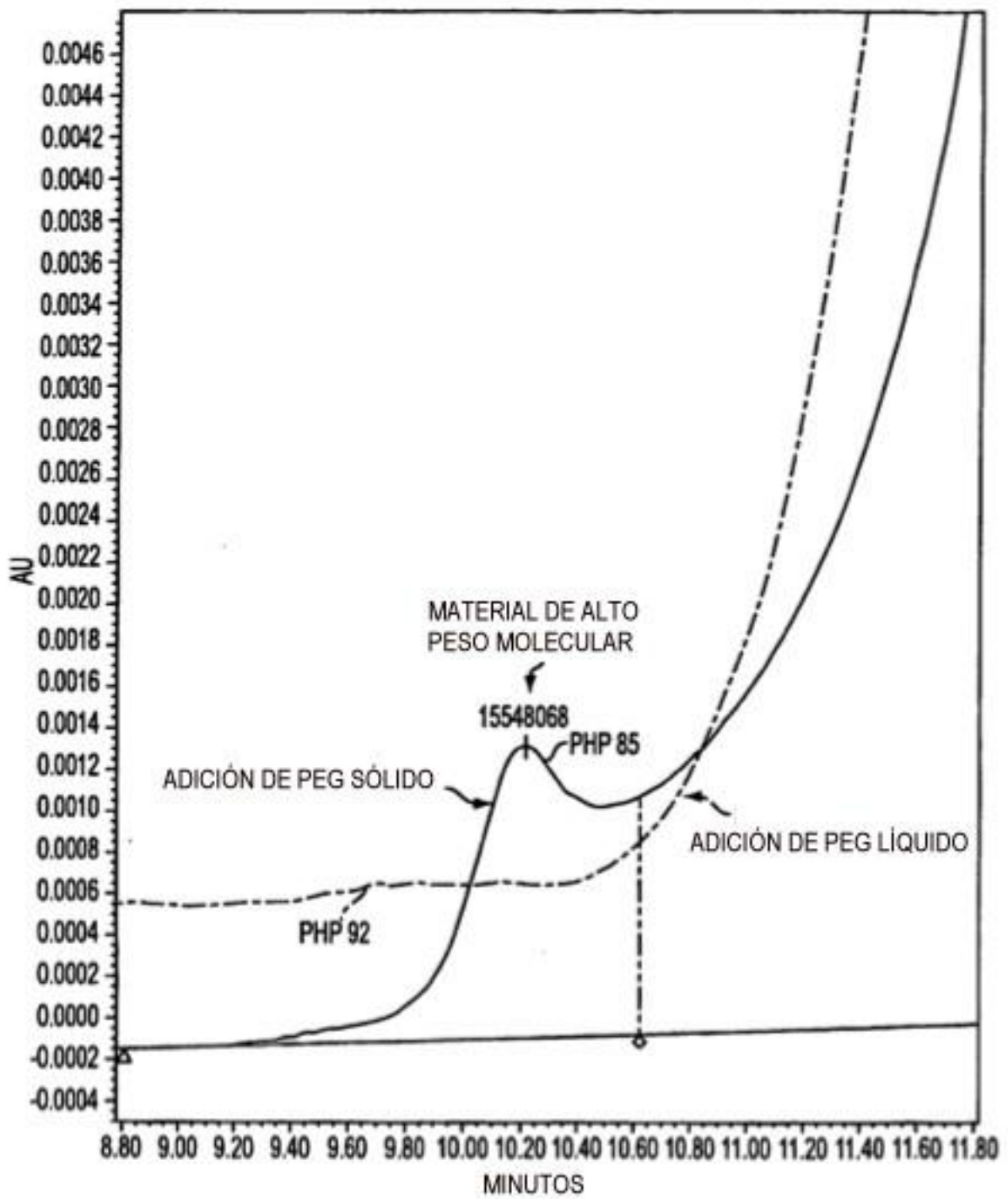


FIG. 5