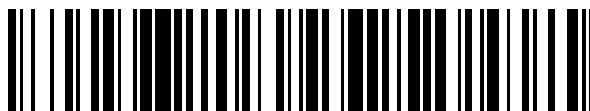


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 454**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

C07D 251/48 (2006.01)

C07D 251/50 (2006.01)

C07D 251/70 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

B01J 20/286 (2006.01)

B01J 20/289 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2006 E 06727055 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 1885486**

54 Título: **Adsorbentes de afinidad para Factor VIII y Factor de von Willebrand**

30 Prioridad:

09.05.2005 GB 0509443

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

08.06.2016

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES LTD (100.0%)
FREEPORT
BALLASALLA, ISLE OF MAN IM9 2AP, GB**

72 Inventor/es:

**BETLEY, JASON RICHARD y
BAINES, BALDEV SINGH**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 573 454 T3

DESCRIPCIÓN

Adsorbentes de afinidad para Factor VIII y Factor de von Willebrand

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y a su uso como ligandos de afinidad.

Antecedentes de la invención

10

El Factor VIII (conocido anteriormente como factor antihemofílico) es una glucoproteína presente en el plasma circulante en niveles de -200 ng/mL. La proteína de cadena única y de ocurrencia natural tiene un peso molecular heterogéneo de entre 265 y 270 kDa dependiendo de la glucosilación, aunque se observan proteínas de peso molecular de 170-280 kDa en plasma dependiendo de la variación alélica, la glucosilación, la modificación y la fragmentación *in vivo*. Existen diversos productos de Factor VIII recombinantes, y también varían considerablemente en la estructura de proteínas y el peso molecular.

15

El Factor VIII en plasma tiene el factor de complicación adicional de que existe en estrecha asociación con el Factor de von Willebrand (vWF), una proteína multimérica compleja implicada también en la coagulación. El vWF en sí es de utilidad terapéutica, ya sea en solitario o en conjunción con el Factor VIII.

20

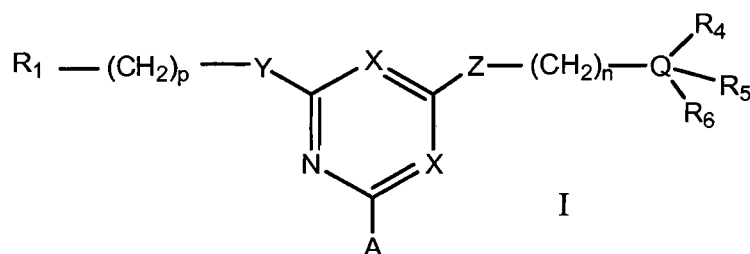
El Factor VI participa en una cascada de coagulación compleja que culmina en la conversión de vWF/FVIII en fibrina, y en la formación de un coágulo de fibrina. Las anomalías genéticas en la producción de Factor VIII producen la enfermedad Hemofilia A, que se manifiesta principalmente en episodios hemorrágicos repetidos debidos a la reducción o ausencia de formación de coágulos. La Hemofilia A y sus síntomas (tales como hemorragia incontrolada) pueden ser tratados con Factor VIII recombinante o derivado de plasma. Con una dosis apropiada, el uso profiláctico de Factor VIII puede reducir acusadamente el número y la gravedad de los episodios hemorrágicos, incluidos los observados durante la cirugía.

25

La purificación de Factor VIII/vWF a partir de plasma o de Factor VIII a partir de fuentes recombinantes es un proceso complejo, que implica generalmente una serie de etapas cromatográficas y/o de precipitación y/o de inactivación vírica. La purificación a partir de plasma implica a menudo adicionalmente etapas de crioprecipitación inicial y reconstitución. Estos procedimientos complejos de purificación, junto con la inestabilidad intrínseca de las proteínas, producen rendimientos bajos de producto purificado. Se ha descrito la cromatografía de inmutofinidad, aunque aparte de su alto coste inherente, los materiales para cromatografía usados adolecen de falta de estabilidad y capacidad de limpieza, lo que da como resultado una reutilización muy limitada. Los medios basados en ligandos con péptidos adolecen de problemas similares que los medios de inmutofinidad, y no han encontrado una aceptación extensa. Sería conveniente obtener un material cromatográfico capaz de aislar el Factor VIII o Factor VIII/Factor de von Willebrand a partir de una serie de fuentes en un rendimiento, una pureza y una eficacia en costes no posibles hasta ahora.

40

El documento WO-97/10.887 divulga compuestos a base de triacina, útiles como adsorbentes de afinidad, de fórmula I



45

donde R₁ es H, alquilo, hidroxialquilo, ciclohexilo, NH₂, fenilo, naftilo, 1-fenilpirazol, indazol, benzotiazol, benzoxazol o bencimidazol, cualquiera de cuyos grupos aromáticos puede estar sustituido por uno o varios entre alquilo, alcoxi, aciloxi, acilamino, amino, NH₂, OH, CO₂H, sulfonilo, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo y halógeno;

50

un X es N y el otro es N, C-Cl o C-CN;

Y es O, S o NR_2 ;

Z es O, S o NR_3 ;

R_2 y R_3 son cada uno H, alquilo, hidroxialquilo, bencilo o β -feniletilo;

Q es benceno, naftaleno, benzotiazol, benzoxazol, 1-fenilpirazol, indazol o bencimidazol;

5 R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, OH, alquilo, alcoxi, amino, NH_2 , aciloxi, acilamino, CO_2H , ácido sulfónico, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo o halógeno;

n es de 0 a 6;

p es de 0 a 20; y

A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo de triacina por un separador.

10

Se divulgan compuestos de fórmula I que tienen afinidad por las proteínas como, por ejemplo, inmunoglobulinas, insulina, Factor VII u hormona del crecimiento humano.

Se divulgan compuestos de estructura relacionada en los documentos WO-00/67.900 y WO-03/097.112. Tienen
15 afinidad por las endotoxinas.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que algunos compuestos, muchos de los cuales son nuevos, son útiles para
20 el aislamiento basado en la afinidad de vWF/FVIII. Estos compuestos se definen en las reivindicaciones 1 y 3 a 5.

Descripción de la invención

Los documentos WO-97/10.887, WO-00/67.900 y WO-03/097.112 divulgan cómo pueden construirse bibliotecas
25 combinatorias de ligandos en un soporte sólido. Durante el cribado de un conjunto de estas bibliotecas combinatorias con plasma humano en reserva como materia prima, se identificó una serie de ligandos como capaces de unirse selectivamente y eluir vWF/FVIII humano.

Los compuestos de fórmula III, IV y V, para su uso en la invención, pueden prepararse mediante procedimientos
30 conocidos para los expertos en la materia. Dichos procedimientos se describen en las 3 publicaciones PCT identificadas anteriormente; pueden adaptarse fácilmente a la preparación de nuevos compuestos.

El documento WO-97/10.887 ofrece ejemplos de A, incluyendo separadores o agentes de unión L a través de los
35 cuales es posible ligar el anillo de triacina con un soporte sólido M. Tal como se describe en el documento WO-97/10.887, dichos soportes incluyen agarosa, sefarsa, sílice, celulosa, dextrano, almidón, alginato, carragenano, polímeros sintéticos, vidrio y óxidos metálicos. Dichos materiales pueden activarse antes de la reacción para formar un adsorbente de la presente invención.

L puede ser, por ejemplo, $-\text{T}-(\text{V}^1-\text{V}^2)_m-$, donde

40 T es O, S o $-\text{NR}^7-$;

m es 0 ó 1;

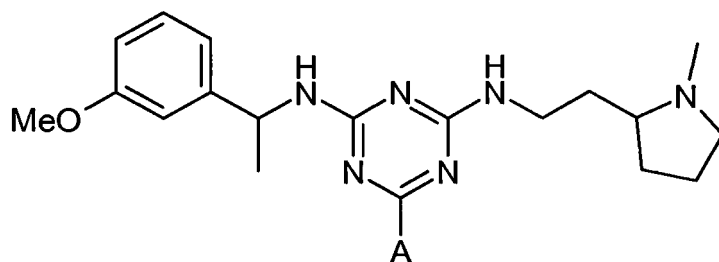
V^1 es un radical de hidrocarburo opcionalmente sustituido de 2 a 20 átomos de C; y

V^2 es O, S, $-\text{COO}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{PO}_3\text{H}-$, $-\text{NH-arileno-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ o $-\text{NR}_8-$; y

R^7 y R^8 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} .

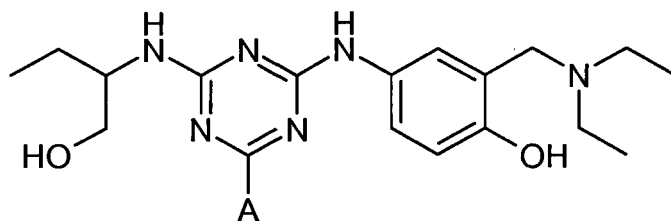
45

El adsorbente de unión a vWF/FVIII está representado por la estructura III



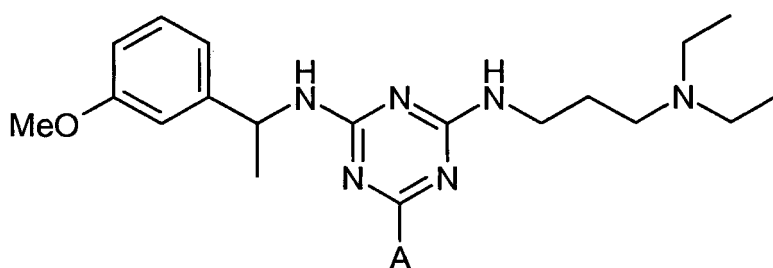
III

50 El adsorbente de unión a vWF/FVIII está representado también por la estructura IV (protonada a pH fisiológico)



IV

El adsorbente de unión a vWF/FVIII está representado también por la estructura V mostrada a continuación:



V

Los ligandos de unión a vWF/FVIII y los adsorbentes descritos en la presente memoria descriptiva son útiles para la purificación de vWF/FVIII a partir de mezclas complejas que incluyen, pero no se limitan a, plasma humano y sobrenadantes de fermentación recombinantes. Esta utilidad se muestra a continuación en el Ejemplo 4, mediante experimentos de cromatografía que usan plasma humano en reserva.

El término "vWF/FVIII" se usa en la presente memoria descriptiva para describir el vWF/FVIII en sí y también análogos que tienen las características funcionales de vWF/FVIII, por ejemplo en términos de afinidad para un compuesto dado descrito en la presente memoria descriptiva. Así, el analito puede ser una proteína que es un fragmento funcional de vWF/FVIII, o un análogo estructural que tiene uno, más de todos los mismos sitios de unión, o una proteína de fusión.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Síntesis de diclorotriacínil-(R)-1-(3-metoxifenil)-etilamina

Se enfrió cloruro cianúrico (5,0 g) disuelto en acetona (35 mL) a 0°C, antes de añadir (R)-1-(3-metoxifenil)etilamina (4,1 g) en disolución en acetona (50 mL) gota a gota durante 30 minutos con enfriamiento, para asegurar que la temperatura no superara 5°C. A continuación se añadió hidróxido de sodio 10 M (2,71 mL) lentamente. Después de 45 minutos, se añadió la mezcla de reacción con agitación en agua helada (20 g). Se extrajo el producto oleoso en diclorometano (150 mL), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó para producir el producto como un aceite amarillo (7,96 g).

Ejemplo 1 - Síntesis de adsorbente V

A amino-Sefarosa CL-4B (475 g de peso sedimentado en agua - 16 µmol/g de sustitución) se añadió dimetilformamida (DMF) (475 mL). Se añadió di-isopropiletilamina (4,37 mL), se agitó la mezcla durante 15 minutos antes de añadir diclorotriacínil-(R)-1-(3-metoxifenil)-etilamina (7,57 g) disuelta en DMF (250 mL) a la mezcla de reacción. Se agitó la mezcla durante 3 horas antes de lavar el gel con DMF acuosa al 70% (4 x 500 mL), DMF acuosa al 50% (2 x 500 mL) y agua (11 x 500 mL). 150 g (sedimentados) de este material se llevaron a suspensión espesa en agua (75 mL) y se añadieron en porciones a una solución de N,N-diethyl-1,3-propanodiamina (3,8 mL) en agua (75 mL) a 60°C. Después de la adición, se calentó de nuevo la mezcla a 60°C, y se agitó a esta temperatura durante 19 horas. A continuación se filtró el gel y se lavó con agua (12 x 150 mL), antes de almacenamiento en conservante de etanol acuoso al 20%.

Ejemplo 2 - Síntesis de adsorbente III

El producto de gel intermedio del Ejemplo 2 (150 g sedimentado) se llevó a suspensión espesa en agua (75 mL) y se añadió en porciones a una solución de 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina (3,5 mL) en agua (75 mL) a 60°C. Después de la adición, se calentó de nuevo la mezcla a 60°C, y se agitó a esta temperatura durante 19 horas. A continuación se filtró el gel y se lavó con agua (12 x 150 mL), antes de su almacenamiento en conservante de etanol acuoso al 20%.

Ejemplo 3 - Síntesis de adsorbente IV

10 Se suspendió amino-Sefarosa CL-4B (100 g de peso sedimentado en agua - 16 µmol/g de sustitución) en fosfato de potasio 1 M a pH 7,0 (100 mL), y después se dejó drenar. A este gel se le añadió después fosfato de potasio 1 M pH 7,0 (25 mL) y agua de ósmosis inversa (250 mL). Se agitó vigorosamente la suspensión espesa mientras se añadía acetona (50 mL). Después del enfriamiento en un baño de hielo/sal durante 30 minutos, se añadió cloruro cianúrico (2,5 g) en acetona fría (25 mL) en una porción. Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 hora, antes de lavar con acetona
15 acuosa al 50% (5 x 100 mL), agua de ósmosis inversa (5 x 100 mL), acetona acuosa al 50% (5 x 100 mL) y agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL). A continuación se llevó a suspensión espesa este gel sedimentado con DMF acuosa al 50% (100 mL) que contenía 2-aminobutanol (1 g), a temperatura ambiente durante 4 horas. Se filtró la suspensión espesa, a continuación se lavó con DMF acuosa al 50% (5 x 100 mL) y agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL). A continuación se llevó a suspensión espesa este gel sedimentado con DMF acuosa al 50% (100 mL) que contenía
20 diclorhidrato de 4-amino-a-dietilamino-o-cresol (4,2 g), y se ajustó a pH 9 con hidróxido de sodio (10 M), y se agitó a 60°C durante toda la noche. Se filtró la suspensión espesa, a continuación se lavó con DMF acuosa al 50% (5 x 100 mL) y agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL). Se incubó el gel en una concentración final de NaOH 0,5 M/etanol al 25% durante 3 días a 40°C, a continuación se lavó NaOH 0,5 M/etanol al 25% (5 x 100 mL), y a continuación agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 1,0 M
25 (100 mL) y se incubó la mezcla a 40°C durante 3 días. A continuación se lavó el gel con NaOH 0,5 M (5 x 100 mL), después agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL). Después de lavar con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 100 mL), se lavó el gel una vez más con agua de ósmosis inversa (10 x 100 mL), antes de su almacenamiento en la sala fría a 4°C en etanol acuoso al 20% v/v.

30 Ejemplo 4 - Ejemplo de cromatografía en plasma humano con adsorbente V

Se realizaron experimentos de cromatografía usando una columna XK16/20 de 1,6 cm de diámetro con un volumen de columna de 20 mL usando un sistema de cromatografía de baja presión (registrador de gráficos de lecho plano Kipp & Zonen, bomba peristáltica minipuls 3 Gilson y detector UV Gilson). Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de Tris.HCl 20 mM, citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 140 mM a pH 7,5 a 80 cm/h. Se trató
35 plasma humano fuente con Tris.HCl 20 mM y cloruro de sodio 100 mM (concentración final). Se filtraron 200 mL de plasma tratado 10 µm y después se cargó a 80 cm/h. El lavado de poscarga fue con Tris HCl 20 mM, citrato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 140 mM a pH 7,5 a absorbancia de referencia. A continuación se eluyó la columna con Tris.HCl 20 mM, citrato de sodio 20 mM, CaCl₂ 3 mM, etilenglicol al 30% y cloruro de sodio 500 mM y Tween 80 al
40 0,01% a pH 7,5. Se limpió la elución posterior de la columna con urea 8 M a pH 7,0. Posteriormente se limpió la columna con hidróxido de sodio 0,5 M. Se analizaron las fracciones de carga, no ligadas y de elución por nefelometría, vWF ELISA y ensayo de actividad cromógena del Factor VIII para determinar las recuperaciones. Se llevó a cabo también SDS PAGE para investigar la pureza.

45 La recuperación se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1

Recuperación de vWF/FVIII mediante cromatografía con adsorbente V			
Carga	vWF	1632 µg	
	F VIII	147 IU	
			(% Recuperación)
No ligado	vWF	512 µg	32
	F VIII	29,2 IU	20
			(% Recuperación)
Elución	vWF	879 µg	54
	F VIII	79 IU	54

El resultado del Factor VIII se determinó por ensayo de actividad cromógena (COATEST VIII: C/4 suministrado por

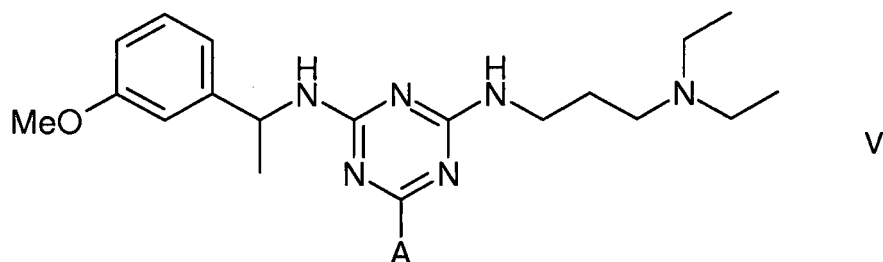
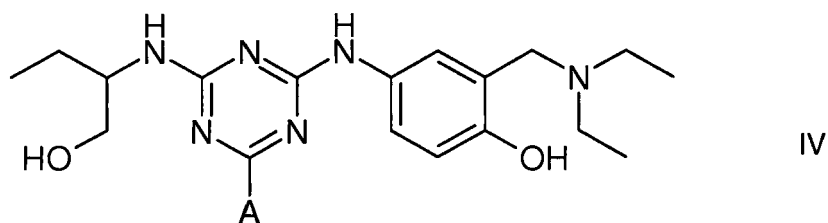
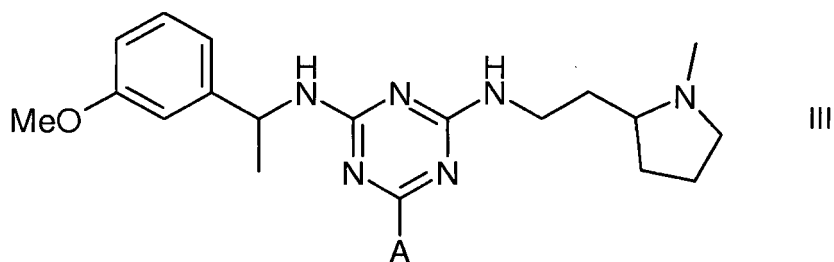
Chromogenix). Los resultados están en unidades internacionales (UI) donde el plasma humano normal contiene 1 unidad internacional de actividad de factor VIII por mL.

El resultado de vWF se determinó mediante ELISA.

5

REIVINDICACIONES

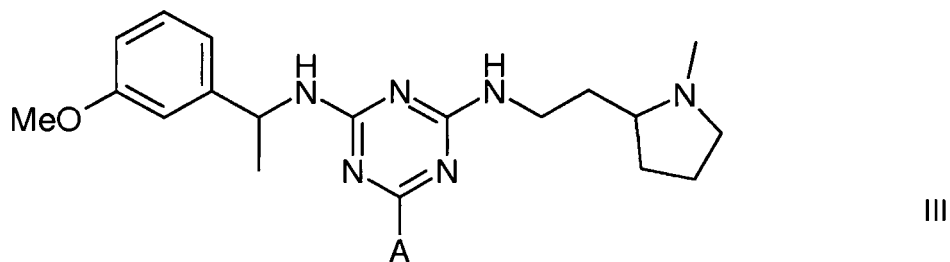
1. Uso de un adsorbente de afinidad para la separación, eliminación, aislamiento, purificación, caracterización, identificación o cuantificación de Factor VIII, Factor de von Willebrand o una proteína que es un análogo de uno de los dos, donde el adsorbente de afinidad es un compuesto de fórmula III, IV o V



10 donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo de triacina por un separador.

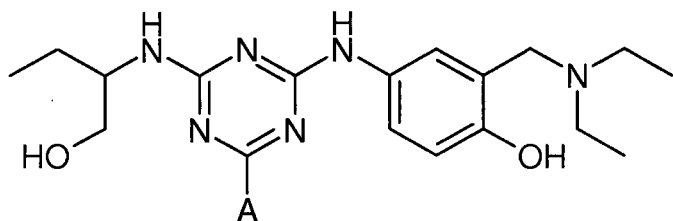
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el adsorbente se pone en contacto con una muestra de plasma.

- 15 3. Un compuesto de fórmula III



donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo de triacina por un separador.

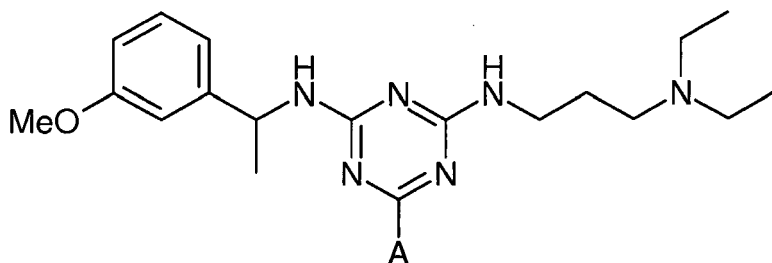
4. Un compuesto de fórmula IV



IV

5 donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo de triacina por un separador.

5. Un compuesto de fórmula V



V

10

donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo de triacina por un separador.

6. Un compuesto que es un precursor de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde A es sustituido por un grupo funcional, unido directa o indirectamente al anillo de triacina, que permite la inmovilización del precursor sobre un soporte sólido.