

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 427**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61J 1/05 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10725273 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2542203**

54 Título: **Chaperonas inmovilizadas en la superficie**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2016

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON FRANCE (100.0%)
11, Rue Aristide Bergès
38800 Le Pont-de-Claix, FR

72 Inventor/es:

BALLET, THOMAS y
MANGIAGALLI, PAOLO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 585 427 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

Chaperonas inmovilizadas en la superficie.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un contenedor para un compuesto farmacéutico que tiene un componente proteico, tal como es definido por las reivindicaciones.

10 Antecedentes de la invención

Las proteínas se usan ahora habitualmente en campos médicos, y representan más de la mitad de los fármacos desarrollados. La insulina, la albúmina, el interferón o los anticuerpos son algunos ejemplos.

15 Una proteína es una cadena polipeptídica con un plegamiento particular, en la que el plegamiento define ciertas funciones de la proteína. Sin embargo, este plegamiento se puede alterar fácilmente, por ejemplo cuando la proteína pierde el plegamiento o se pliega erróneamente, por calor, pH extremos, fuerzas mecánicas, desnaturalizantes químicos, mediante otras proteínas, o simplemente por contacto con superficies de vidrio o plástico, por ejemplo. Las proteínas almacenadas en contenedores médicos como jeringuillas, cartuchos, viales, ampollas, botellas o tubos de ensayo pueden así ser inactivadas totalmente en varias horas.

Las proteínas desplegadas se pueden agregar y formar bloques insolubles, mientras que las proteínas plegadas erróneamente pueden tener efectos inesperados y peligrosos sobre el cuerpo humano, los cuales son indeseables.

25 Esta es la razón por la cual el control y prevención del desplegamiento o plegamiento erróneo indeseado de proteínas terapéuticas es un obstáculo importante y ubicuo a abordar durante la fabricación, almacenamiento, transporte, y administración de productos farmacéuticos.

30 Para resolver este problema se han propuesto métodos, la mayoría de ellos basados en procesos biológicos. En particular, es conocido cómo usar una clase de proteínas grandes denominadas chaperonas para ayudar al plegamiento/desplegamiento y al ensamblaje/desensamblaje de otras estructuras moleculares.

35 En la mayoría de estos métodos conocidos, las chaperonas están libres en la disolución farmacéutica. De este modo, pueden contribuir al replegamiento de proteínas desplegadas en la disolución. Sin embargo, podría ser interesante beneficiarse de la función de las chaperonas sin liberar las chaperonas libres en la disolución.

40 La publicación de patente internacional WO00/55183 describe unas chaperonas inmovilizadas sobre una superficie sólida. Este documento propone llevar a cabo esta inmovilización mediante una reacción química que genera enlaces covalentes entre la chaperona y la superficie tratada.

Dicha inmovilización de las chaperonas evita su liberación en disolución, mientras que todavía se beneficia de su efecto de replegamiento.

45 Sin embargo, puesto que la reacción química implica tioles, la chaperona se podría unir a una superficie sólida solamente mediante un disulfuro. Los disulfuros de chaperonas (y de proteínas en general) forman restricciones estructurales necesarias para mantenerlas en su conformación nativa. Debido a la formación de enlaces covalentes en la reacción química descrita en la publicación de patente internacional WO00/55183, al menos un puente de disulfuro se destruye y existe el riesgo de que la chaperona no permanezca en su conformación nativa y pierda su actividad tras tal modificación química.

50 Además, si la chaperona no contiene un disulfuro, no se puede unir. YANG YUNHUI ET AL: "Stabilization and re-activation of trapped enzyme by immobilized heat shock protein and molecular chaperones", BIOSENSORS & BIOELECTRONICS MAR 2003, vol. 18, nº 2-3, 1 de marzo de 2003, describen la estabilización y reactivación de luciferasa de luciérnaga en disolución en bruto mediante la chaperona DnaK, que se ha inmovilizado previamente sobre superficies de vidrio silanizado de viales de vidrio.

55 Un objetivo general de la invención, que se define mediante las reivindicaciones, es mejorar los métodos conocidos tales como los mencionados anteriormente. En particular, un objetivo de la invención es prevenir la liberación de chaperonas o fragmentos de chaperonas en disoluciones farmacéuticas sin alterar su eficiencia frente al desplegamiento de las proteínas. Además, un objetivo de la presente invención es proporcionar un contenedor mejorado para un compuesto farmacéutico que tiene un componente proteico. El contenedor mejorado según la presente invención es una mejora con respecto a contenedores conocidos con respecto al revestimiento de la superficie interna del contenedor y su efecto mejorado sobre un compuesto farmacéutico que tiene un componente proteico.

60 Otro objetivo de la invención es proporcionar un método que pueda aplicarse a cualquier chaperona.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención aspira a resolver las deficiencias identificadas anteriormente de la técnica anterior proporcionando un contenedor para una proteína terapéutica como se define mediante las reivindicaciones. Una superficie interna del contenedor de la presente invención se reviste con chaperonas acopladas a la superficie interna mediante un enlazador molecular – interponiéndose el enlazador entre la superficie del contenedor y la chaperona.
- 10 La presente descripción también proporciona un método para revestir la superficie interna de un contenedor con chaperonas, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- llenar el contenedor con una disolución que contiene un enlazador molecular;
 - vaciar el contenedor después de un tiempo de preadsorción de dicho enlazador molecular;
 - 15 - lavar las superficies internas del contenedor con un amortiguador;
 - añadir a dichas superficies internas las chaperonas.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Los objetivos anteriores y otros objetivos, características y ventajas de esta invención se pondrán de manifiesto en la siguiente descripción detallada de una forma de realización ilustrativa de la misma que se ha de leer en relación con los dibujos adjuntos, en los que:
- 25 - la figura 1 es una vista esquemática de una sección transversal de la superficie de un contenedor según la presente invención;
 - la figura 2 es una vista esquemática ampliada de un revestimiento según la presente invención, que explica los mecanismos que conducen a la agregación de las proteínas;
 - 30 - la figura 3 representa esquemáticamente tres etapas del procedimiento de revestimiento de un contenedor según la invención;
 - las figuras 4A-C representan esquemáticamente el comportamiento de chaperonas en tres experimentos: sin enlazador preadsorbido, con enlazador plegado, y con enlazador desplegado;
 - 35 - la figura 5 representa gráficamente la evolución de la concentración de insulina soluble en una disolución terapéutica durante un experimento.

Descripción detallada de la invención

- 40 La figura 1 muestra una vista esquemática de una sección transversal de una superficie de un contenedor 1 según la invención. Como se usa en la presente memoria, el término “contenedor” se referirá, a título ilustrativo y no limitativo, a un contenedor apto para contener cualquier disolución farmacéutica. Los ejemplos de un contenedor según la presente invención incluyen una jeringuilla (con o sin una aguja adjunta), un cartucho, un vial, una ampolla, un depósito u otro dispositivo o estructura aptos para almacenar y contener un compuesto farmacéutico, típicamente en forma líquida, pero no necesariamente así. Otros contenedores adecuados para contener una disolución farmacéutica también están dentro del alcance y espíritu de la presente invención. El contenedor 1 es apto para contener una disolución farmacéutica 2 que puede ser un líquido que puede estar en contacto con la superficie 3 del contenedor 1.
- 50 Entre la disolución 2 y la superficie 3, está previsto un revestimiento 10. El revestimiento 10 está formado por dos componentes, y sirve para aislar la superficie 3 de la disolución 2. Un primer componente del revestimiento consiste en chaperonas moleculares 11, que están unidas a la superficie 3 mediante un enlazador molecular 12, un segundo componente del revestimiento 10. Los enlazadores moleculares 12 se pueden formar como una capa sobre la superficie 3. Por ejemplo, el enlazador 12 y la chaperona 11 pueden tener una interfaz definida entre ellos, tal como se representa en la figura 2. Como alternativa, el enlazador 12 y la chaperona 11 pueden tener una interpenetración o una interfaz entre ellos, de manera que puede no haber una delimitación clara entre el enlazador 12 y la chaperona 11.
- 55 Este enlazador molecular 12 está formado por una sola molécula, o de un aglomerado de varias moléculas. De hecho, en la técnica anterior, todos los métodos usados para acoplar polipéptidos a superficies sólidas implican el enlazamiento químico directo tras la modificación de la superficie y/o de la proteína por medio de un agente químico. Nada en estos métodos conocidos se interpone entre la superficie 3 y la chaperona 11, por lo tanto, estos métodos químicos no implican ningún enlazador.
- 60 En la invención, el enlazador 12 es una molécula como se define mediante las reivindicaciones, seleccionado
- 65

preferentemente por su afinidad con la chaperona 11 sin conducir a la modificación de la chaperona 11. Por lo tanto, este acoplamiento no implica ninguna reacción química covalente, no hay contacto entre la superficie del material y la chaperona. El enlazador está interpuesto entre ellas.

5 No se requieren especificidades para la unión entre la superficie a tratar y el enlazador. El enlazador puede estar unido a la superficie mediante enlaces de hidrógeno (como en el caso de un enlazador hidrófilo/hidrófobo), enlaces covalentes, interacciones de Van der Waals, como unos pocos ejemplos.

10 Como se representa en la figura 2, el proceso de agregación de las proteínas consiste típicamente en dos etapas (que corresponden a las dos flechas A1 y A2). Como se señala, la agregación de las proteínas es indeseable, y puede dar como resultado cambios peligrosos al compuesto farmacéutico. Las proteínas plegadas 20a son proteínas terapéuticas en disolución farmacéutica 2. Como se sabe, la hidrofobia de una superficie 3 de material, tal como vidrio siliconizado plástico, induce el desplegamiento de las proteínas 20a en proteínas desplegadas 20b. Las proteínas desplegadas 20b están desnaturalizadas y son proteínas conformacionalmente alteradas que han perdido su forma primaria.

15 Las proteínas desplegadas 20b se pueden aglomerar entonces y formar bloques sólidos 20c que crecen rápidamente.

20 La presencia de trazas de dichos agregados insolubles 20c en una preparación farmacéutica de proteínas es generalmente inaceptable para la liberación de un producto farmacéutico.

Sin embargo, el solicitante observó que si un contenedor de vidrio médico siliconizado se llena con proteínas plegadas, comenzarán a agregarse sobre la superficie del material solamente después de un "tiempo de demora".

25 Durante este tiempo de demora, que puede tardar varias horas o incluso días, la cantidad de proteína desplegada crece, mientras que la adsorción permanece casi constante con una monocapa delgada de proteínas absorbida sobre las superficies internas del dispositivo. Las imperfecciones de esta capa forman lentamente sitios de nucleación, que entonces inducen la agregación. Los bloques sólidos de proteína agregada desplegada crecerán en estos sitios a partir del final del tiempo de demora.

30 En una forma de realización preferida, las proteínas desplegadas que se preadsorben sobre la superficie hidrófoba del dispositivo se usan como enlazadores moleculares 12.

35 De hecho, una chaperona comprende un dominio de unión a sustrato que contiene una ranura con una afinidad por restos de aminoácidos neutros, hidrófobos, que es el núcleo funcional de la chaperona para la interacción con péptidos. Gracias a esta ranura, una chaperona añadida antes del final del tiempo de demora se unirá a la proteína desplegada adsorbida y estabilizará la capa de proteínas desplegadas adsorbidas.

40 Para romper el enlazador molecular o una de las uniones se requiere una cantidad elevada de energía, de manera que se evita la liberación de la chaperona en la disolución. La agregación posterior también se evita gracias a las chaperonas.

45 Como se representa en la figura 3, la presente invención permite evitar la etapa de nucleación y agregación al añadir moléculas de chaperona antes del final del tiempo de demora a fin de neutralizar los sitios de nucleación de la capa de proteínas desplegadas antes de que la agregación sea imparable. Cuando se adsorben, las proteínas desplegadas se unen fuertemente a la superficie del material mediante enlaces de hidrógeno, de manera que actúan como enlazadores moleculares 12. La monocapa de proteína desplegada forma la capa definida por los enlazadores 12.

50 Por lo tanto, el enlazador molecular 12 se selecciona preferentemente a fin de cubrir toda la superficie con proteínas desplegadas y formar una monocapa adsorbida sobre la superficie tratada.

55 En una realización particularmente preferida, la proteína desplegada es la misma molécula que la proteína terapéutica almacenada en el contenedor. En este caso, puesto que la chaperona se escoge para que tenga una buena afinidad con esta proteína, la chaperona será muy eficaz evitando la agregación. Además, facilita la aplicación de la invención a formulaciones farmacéuticas.

60 La eficiencia de los enlazadores moleculares se ilustra mediante los resultados experimentales expuestos a continuación.

Resultados experimentales

Primer conjunto de experimentos

65 Tres contenedores médicos totalmente de borosilicato y tres contenedores médicos de vidrio siliconizado se llenaron

5 con insulina humana disuelta en un amortiguador TRIS (trishidroximetilaminometano) pH 7,25 (TRIS 25 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 2 mM) a una concentración final de 0,5 mg/ml. Los contenedores se agitaron entonces a 60 rpm y 37°C (hasta t = 2H o t = 16H, dependiendo del experimento, según las columnas 2-3 y 5-6 de la tabla 1, más abajo), lo que conduce a la adsorción de insulina sobre la superficie del contenedor. Al final de esta etapa de preincubación, las disoluciones de insulina se eliminaron y los contenedores se lavaron con amortiguador para eliminar proteínas no absorbidas.

Entonces se añadió una proteína de chaperona molecular a los contenedores lavados, al menos 15 min después.

10 La chaperona escogida es aquí el homólogo de Hsp70 bacteriano DnaK de *Escherichia coli*, pero se han ensayado de forma similar diferentes chaperonas moleculares: DnaJ, ClpB..., y todas ellas se pueden aplicar a la presente invención. Estas familias de proteínas parecen existir en todos los organismos vivos, y pueden ser producidas en *Escherichia coli*, se pueden purificar según un protocolo conocido desarrollado por B. Bukau de la Universidad de Heidelberg, y se pueden almacenar a -80°C.

15 Como “control negativo”, la disolución de DnaK también se añadió directamente a un contenedor de vidrio médico reciente lleno de amortiguador TRIS pH 7,25 (TRIS 25 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 2 mM). Este caso corresponde a las otras columnas 1 y 4 de la tabla 1.

20 Para cada experimento, la cantidad de DnaK unida a las perlas de vidrio se midió entonces mediante SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) después de ser lavadas con amortiguador de TRIS y de eluir las con un amortiguador que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS). La electroforesis es un método usado ampliamente para separar proteínas según su peso.

25 Cada experimento se llevó a cabo de manera idéntica. Los resultados obtenidos se representan gráficamente en la figura 4.

Tabla 1

Pre-incubación (Horas)	Contenedores de vidrio de borosilicato			Contenedores de vidrio siliconizados		
	0	2	16	0	2	16
Cantidad de insulina adsorbida (µg)	1	1	1	1	1	20
DnaK adsorbida (SDS PAGE)	-	-	-	-	+	++
Cantidades crecientes	-			-		
	+			+		
	++			++		

30 Según se esperaba, DnaK no se pudo unir a las superficies no preincubadas (“control negativo”, columnas 1 y 4, tabla 1), debido a que no hay ninguna capa preadsorbida de insulina que actúa como un enlazador (figura 4A).

35 Si el material usado es totalmente borosilicato, las superficies internas son hidrófilas. Y cualquiera que sea la duración de la preadsorción, la insulina adsorbida permanece plegada y la DnaK no se puede unir a la superficie hidrófila preincubada, como se confirma mediante el experimento (columnas 2 y 3, tabla 1). Este resultado corresponde a la figura 4B.

40 Finalmente, se observa una fuerte adsorción de DnaK sobre la superficie hidrófoba preincubada (columnas 5-6, tabla 1). Además, cuanto más tiempo se preincuba la superficie (es decir, cuanta más insulina se adsorbe), más DnaK se une a la capa.

45 Estos experimentos demuestran la capacidad de DnaK, y de otras chaperonas, para unirse eficientemente sobre la superficie de un material por medio de un enlazador molecular que es una proteína preadsorbida y desplegada (figura 4C). El enlace generado entre la chaperona y la superficie es suficientemente fuerte para evitar la liberación de las chaperonas incluso si las superficies se lavan nuevamente con un amortiguador de TRIS.

Segundo conjunto de experimentos

50 Un experimento subsiguiente muestra que la chaperona enlazada mantiene su eficiencia. La concentración de insulina soluble restante (insulina no agregada) se monitorizó a lo largo del tiempo en un contenedor de vidrio médico siliconizado revestido con DnaK en las mismas condiciones como en los experimentos previos, y después se llenó con una disolución reciente de insulina (86 µM). Los resultados se pueden observar en la figura 5.

55 En el caso de insulina sola, su concentración cae después de 2 h (el tiempo de demora), mientras que se evita la agregación de la insulina mediante la DnaK unida con un enlazador molecular. De este modo, la chaperona no es

alterada por el enlazador molecular.

Otros datos experimentales muestran que la capa de insulina preadsorbida consiste preferentemente en aproximadamente $1 \mu\text{g}$ de insulina sobre una superficie total de 5 cm^2 .

5 Puesto que la cobertura superficial de insulina humana es aproximadamente $1,5 \text{ mg/m}^2$, que quiere decir $0,75 \mu\text{g}$ por 5 cm^2 , la capa preadsorbida de insulina corresponde a una monocapa mixta (monómero/dímero/hexámero) de insulina sobre la superficie. Su grosor es alrededor de unos pocos nanómetros (una mezcla de monómero/dímero/hexámero tiene alrededor de 3-5 nm, el monómero solo tiene menos de 1 nm).

10 La presente invención puede ser útil para cualquier contenedor para contener una disolución farmacéutica, en particular una disolución que contenga proteína. Por ejemplo, el contenedor puede ser una jeringuilla, un cartucho, un vial, una ampolla, un depósito u otro dispositivo o estructura adecuada para contener y mantener un compuesto farmacéutico. La agregación de proteínas es particularmente problemática para jeringuillas, ya que a menudo son tratadas para facilitar el deslizamiento del émbolo de la jeringuilla, para inhibir la unión de proteínas o para evitar lixivitaciones. El aceite de silicona, usado como un lubricante para revestir los componentes deslizantes de la jeringuilla (el interior del barril de la jeringuilla y el tapón del émbolo), es una molécula apolar que genera interacciones predominantemente hidrófobas que catalizan enormemente la agregación.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para revestir la superficie interna de un contenedor con moléculas de chaperonas. El método de la invención permite las etapas de la experiencia previamente explicada. Consiste en llenar el contenedor con una disolución que contiene un enlazador molecular, vaciar entonces y lavarlo con un amortiguador después de una primera fase de preadsorción durante la cual el enlazador comienza a desplegarse, antes de añadir finalmente las moléculas de chaperonas a las superficies internas del contenedor, las cuales se unen a los enlazadores moleculares preadsorbidos. Se bloquean los sitios de nucleación, y se evita la agregación.

25

REIVINDICACIONES

1. Contenedor que contiene una disolución farmacéutica (2) que contiene unas proteínas terapéuticas, presentando dicho contenedor una superficie hidrófoba (3) y un revestimiento (10) para aislar dicha disolución farmacéutica (2) de dicha superficie (3), estando dicho revestimiento formado por:
- unas proteínas desplegadas (12), usadas como un enlazador molecular, preadsorbidas sobre dicha superficie (3),
 - unas chaperonas moleculares (11) unidas a dichas proteínas desplegadas,
- en el que dichas chaperonas moleculares (11) estabilizan dichas proteínas desplegadas.
2. Contenedor según la reivindicación 1, en el que el contenedor es una jeringuilla, y la superficie hidrófoba está realizada a partir de aceite de silicona.
3. Contenedor según la reivindicación 1, en el que la superficie hidrófoba es de plástico.
4. Contenedor según la reivindicación 1 a 3, en el que los enlazadores moleculares están formados a modo de una capa, y dicha capa definida por los enlazadores está formada por una monocapa de dichas proteínas desplegadas.
5. Contenedor según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína desplegada es la misma molécula que la proteína terapéutica almacenada en el contenedor.
6. Contenedor según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha proteína terapéutica es insulina terapéutica.
7. Contenedor según las reivindicaciones 1 a 6, en el que las proteínas desplegadas cubren toda la superficie y forman una monocapa adsorbida sobre la superficie tratada.
8. Utilización de moléculas de chaperonas para estabilizar una capa de proteínas desplegadas adsorbidas sobre una superficie hidrófoba.
9. Contenedor según la reivindicación 1, en el que la superficie hidrófoba es de vidrio siliconizado.

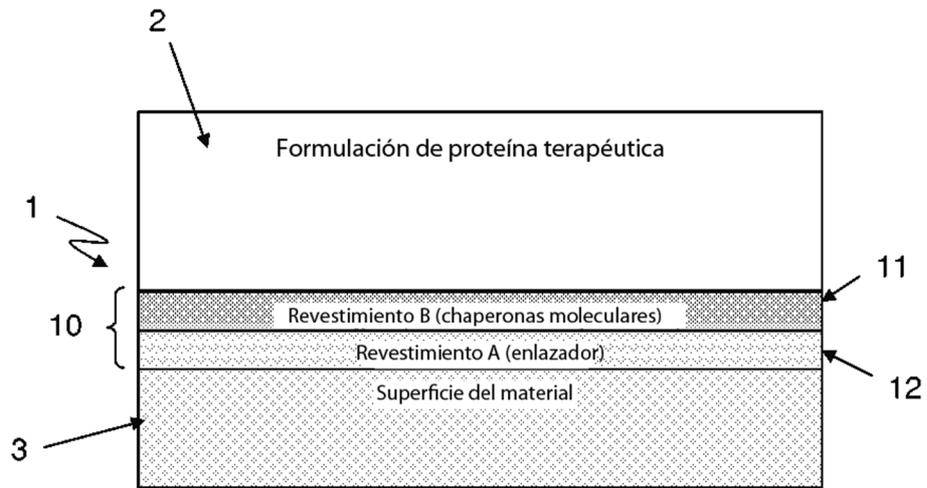


FIG. 1

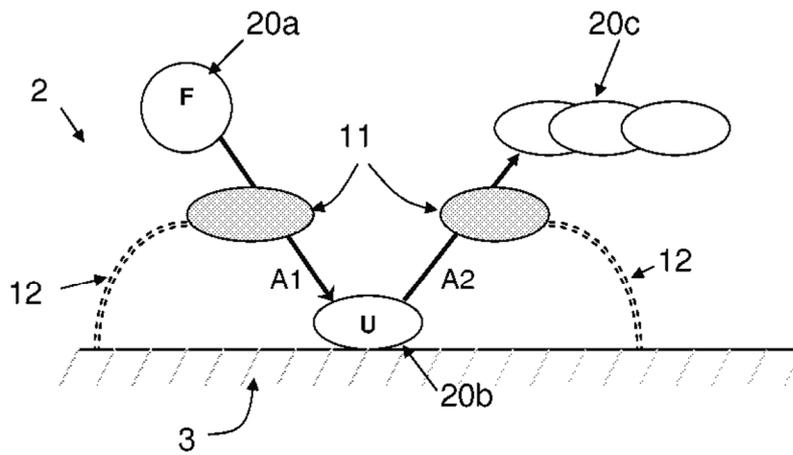


FIG. 2

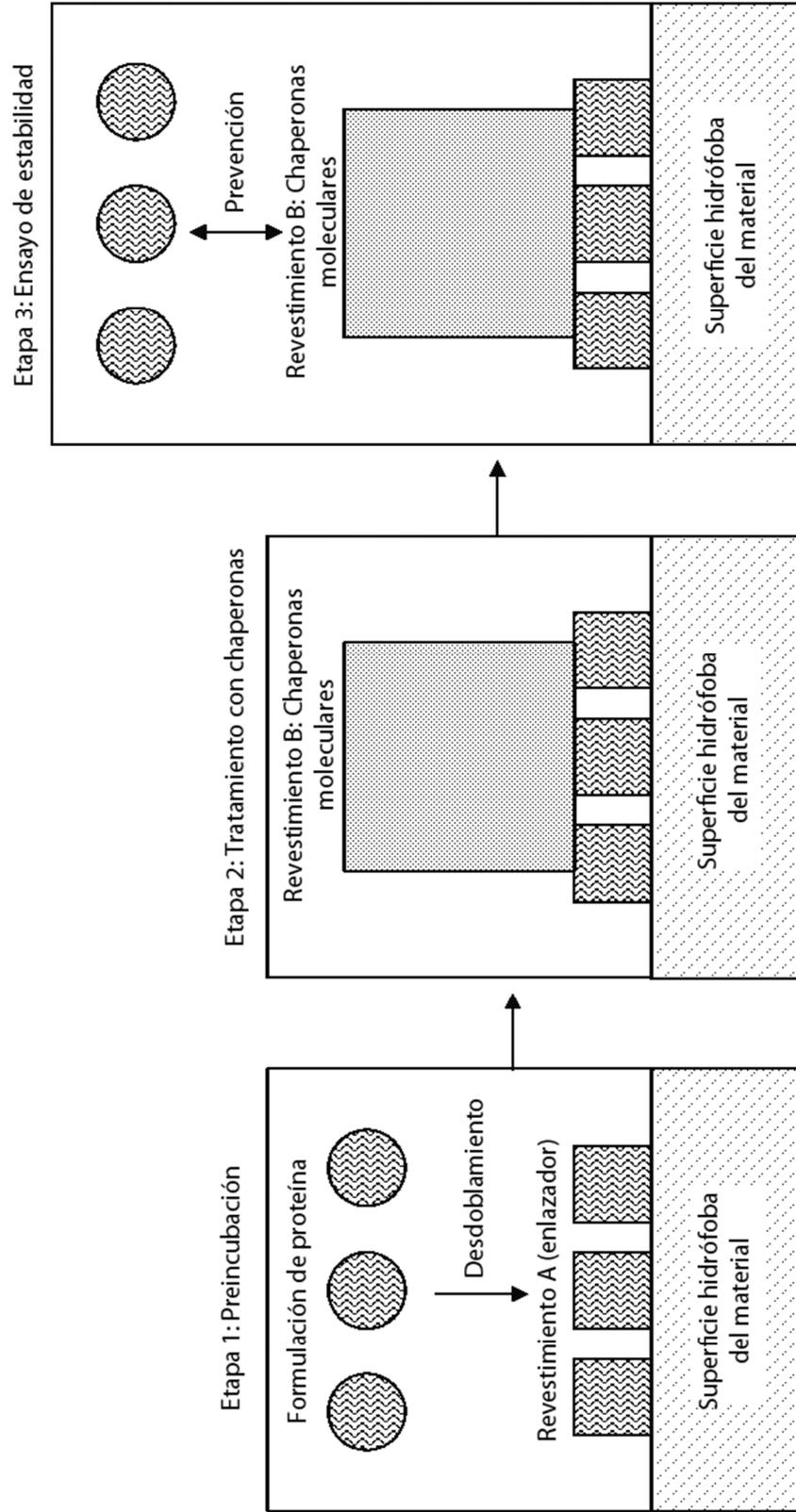


FIG. 3

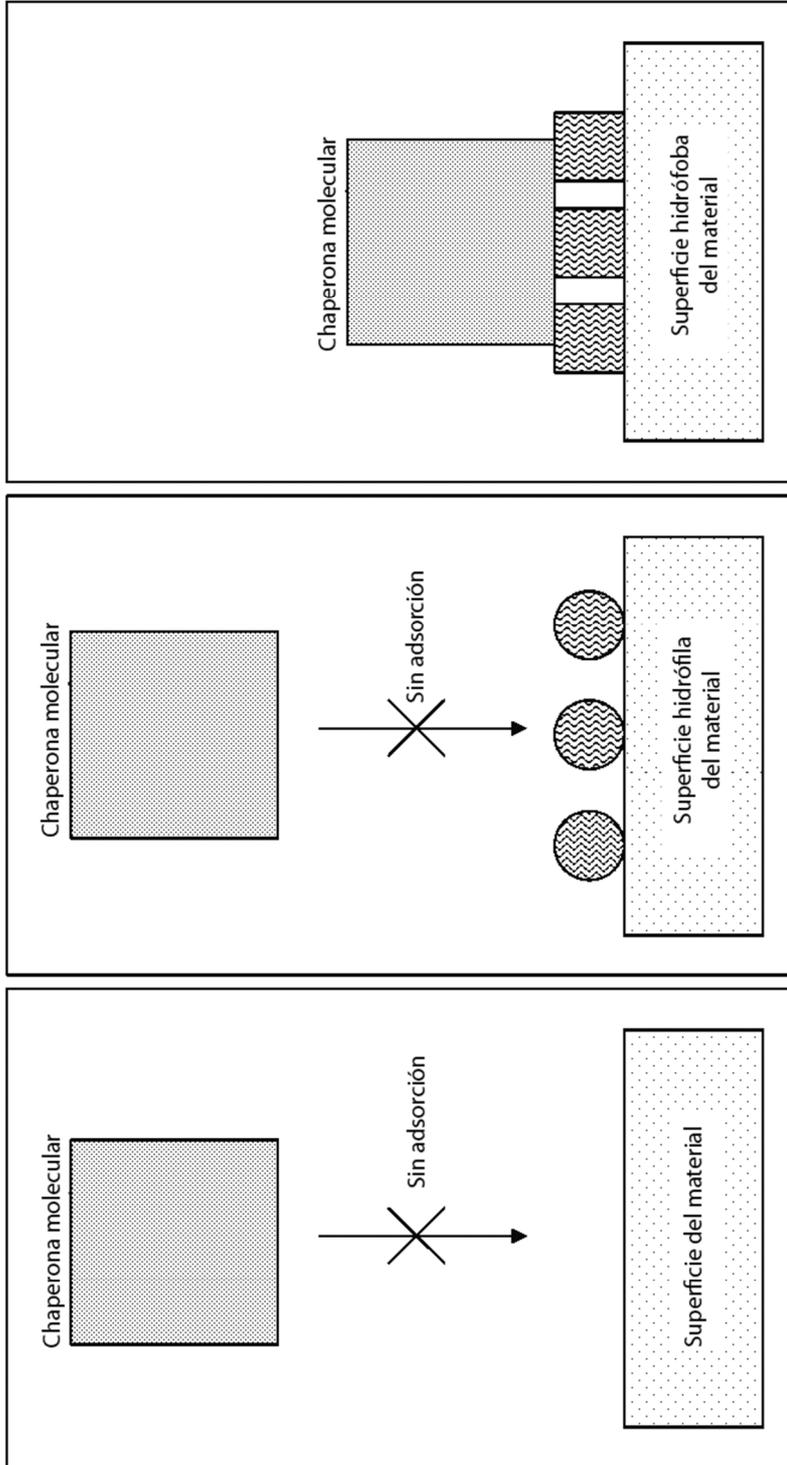


Fig 4C. Superficie hidrófoba

Fig 4B. Superficie hidrófila

Fig 4A. Control negativo

FIG. 4

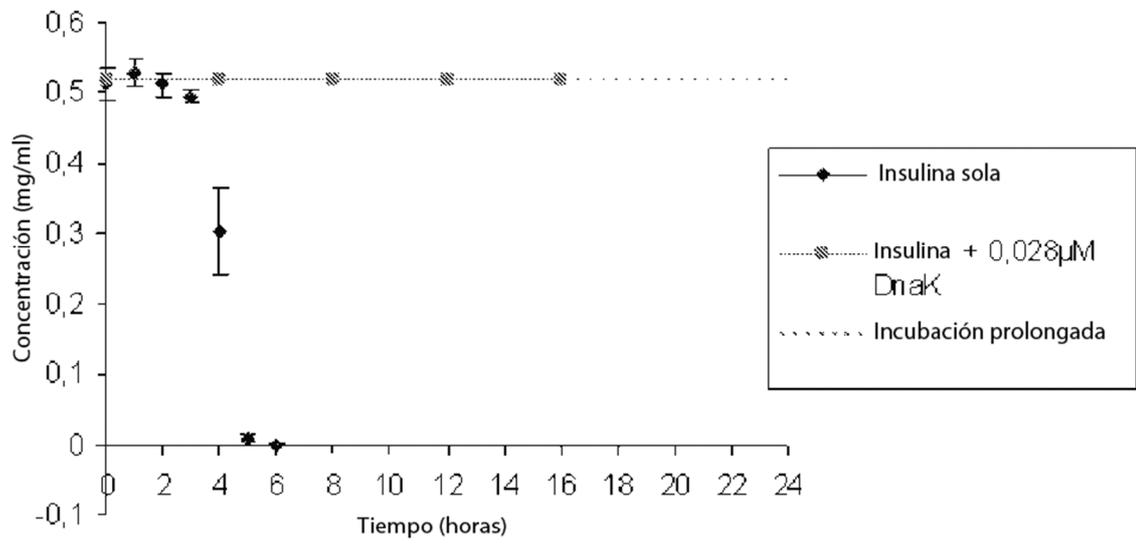


FIG. 5