

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 629**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 38/37 (2006.01)

B01D 61/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2011** **PCT/US2011/025592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011** **WO11103531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2011** **E 11745404 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2536399**

54 Título: **Procedimiento de activación y conjugación de biomoléculas**

30 Prioridad:

21.02.2010 US 306513 P

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

26.06.2020

73 Titular/es:

BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
555 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

VOGEL, JENS H.;
TO, CHI SHUNG BRIAN y
BIANCO, CAROLINA LUCIA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 769 629 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

Procedimiento de activación y conjugación de biomoléculas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un conjugado de factor de coagulación PEGilado en un sistema de flujo tangencial integrado.

Antecedentes de la invención

Con los avances en biotecnología, se han desarrollado productos biofarmacéuticos para satisfacer las necesidades médicas insatisfechas. Sin embargo, su corta semivida *in vivo* requiere que los pacientes tomen dosis frecuentes y/o considerables de estos productos biofarmacéuticos para conseguir el objetivo terapéutico o profiláctico diana. La terapia intravenosa de larga duración o inyección frecuente podría influir en la calidad de vida de los pacientes. Diversos polímeros, tales como el polietilenglicol (PEG), pueden conjugarse con una biomolécula (por ejemplo, una proteína) para potenciar la semivida y actividad biológica de muchas biomoléculas (Reddy, Ann. Pharmacother. 34: 915-923, 2000). Otros beneficios de la conjugación con polímeros incluyen (a) estabilidad del producto mejorada durante el procedimiento de fabricación; (b) eliminación renal reducida (Fung, y col, Polym. Prepr. 38: 565-566, 1997); reconocimiento tumoral mejorado (Yowell, y col, Cancer Treat. Rev. 28 Suppl. A: 3-6, 2002); antigenicidad e inmunogenicidad reducidas (Muller, y col, Br. J. Haematol. 110: 379-384, 2000; Abshire, y col, Blood 96: 1709-1715, 2000); y mayor tolerabilidad (Safra, y col, Ann. Oncol. 11: 1029-1033, 2000; Judson, y col, Eur. J. Cancer 37: 870-877, 2001). La PEGilación se ha aplicado a factores de crecimiento humanos (Kim, y col., Biomaterials 23: 2311-2317, 2002; Wu, y col, Protein Expr. Purif 48: 24-27, 2006), al factor de liberación de hormonas del crecimiento (Piquet, y col, J. Chromatogr. 944: 141-148, 2002), a vectores de adenovirus (Eto, y col, Int. J. Pharm. 354: 3-8, 2008) y a ADN de plásmido (Hosseinkhani, y col, J. Control Release, 97: 157-171, 2004). Debido a los beneficios de la PEGilación, se ha desarrollado mucha química de reacción de conjugación (Roberts, y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476, 2002) y derivados de polímeros (Patente europea N.º 1578841). A medida que aumenta la aplicación de la conjugación biomolécula-polímero, es necesario desarrollar una operación unitaria, sencilla, reproducible y a escala para satisfacer las necesidades de fabricación.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a un procedimiento para producir un conjugado de factor de coagulación que comprende las etapas de activar el factor de coagulación por contacto con un agente activador; retirar el agente activador; y conjugar el factor de coagulación haciendo reaccionar el factor de coagulación con un polímero activado; en el que las etapas del procedimiento están integradas en un sistema de filtración de flujo tangencial integrado y en el que el polímero es polietilenglicol y en el que el agente activador es un agente reductor. El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de separar el conjugado de factor de coagulación del factor de coagulación no conjugado. En una realización, el conjugado de factor de coagulación se separa del factor de coagulación no conjugado por cromatografía de exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico.

En una realización adicional, el agente reductor es ditiotreitolo o tris 2-carboxietil fosfina.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Perfil de elución por cromatografía de intercambio catiónico la ejecución de control de PEGilación.

Figura 2. SDS-PAGE de picos de elución por cromatografía de intercambio catiónico de la ejecución de control de PEGilación.

Figura 3. Cromatografía de exclusión por tamaño de picos de elución por cromatografía de intercambio catiónico del control de PEGilación.

Figura 4. Perfil de elución por cromatografía de intercambio catiónico de PEGilación realizada en modo TFF.

Figura 5. Perfiles de elución por cromatografía de intercambio catiónico de ejecuciones de TFF a escala de laboratorio.

Figura 6. Perfiles por SEC de rFVIII PEGilado producido por ejecuciones de TFF a escala de laboratorio.

Figura 7. Perfiles de elución por cromatografía de intercambio catiónico de ejecuciones de TFF a escala piloto.

Descripción de la invención

Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente" es una referencia a uno o más agentes. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado

que el comúnmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

La conjugación del factor de coagulación, puede ser una conjugación al azar o una conjugación específica de sitio. En ambos casos, el factor de coagulación normalmente se activa para permitir el acoplamiento eficaz del PEG. En la PEGilación al azar, el PEG puede conjugarse covalentemente a restos de aminoácidos activados al azar. Normalmente esto da como resultado una mezcla de biomoléculas mono-PEGiladas y múltiple-PEGiladas. Para la PEGilación específica de sitio, un factor de coagulación puede modificarse genéticamente de tal manera que la molécula de PEG puede conjugarse en un sitio específico en la superficie del factor de coagulación. Esta estrategia minimiza la formación de productos secundarios y facilita la carga de la etapa de purificación posterior que separa el producto de los productos secundarios.

Los restos expuestos al disolvente sobre el factor de coagulación pueden activarse usando agentes reductores tales como ditioneitol (DTT) o tris 2-carboxietil fosfina (TCEP). Después de la reducción, la molécula de PEG puede unirse al resto activado mediante enlace covalente. Puede ser necesario retirar el reductor antes de la reacción de conjugación. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por las siglas del inglés *Size Exclusion Chromatography*) es una técnica habitual para la retirada de reductores a escala de laboratorio.

El estado eficiente de la técnica de conjugación de factores de coagulación generalmente requiere operaciones unitarias múltiples, por ejemplo,

- activación a través de incubación/mezcla controlada con un agente reductor, normalmente realizada en un recipiente de mezcla tal como un tanque de activación agitado;
- retirada del agente activador, típicamente mediante cromatografía de exclusión por tamaño u otro procedimiento cromatográfico;
- conjugación a través de incubación/mezcla controlada con el polímero activado (tal como PEG), normalmente realizada en un tanque de conjugación agitado; y
- separación de la biomolécula conjugada de las moléculas que no han reaccionado y de los productos secundarios por cromatografía, tal como cromatografía por intercambio iónico.

Tal procedimiento requiere sistemas múltiples y a una escala comercial, espacio considerable y una transferencia/manipulación manual entre las operaciones unitarias. Además, la SEC es difícil de implementar en la fabricación a escala comercial y requiere establecerse como una operación unitaria independiente.

El procedimiento de la presente invención integra la activación, la retirada del agente activador y las etapas de conjugación en una sola operación unitaria utilizando filtración de flujo tangencial integrada para la puesta en contacto/mezcla y posterior retirada de reactivos. A la vez que el factor de coagulación diana se retiene utilizando membranas de límite de peso molecular adecuado, condiciones fisicoquímicas tales como concentraciones, pH, conductividad y especies tampón pueden modificarse antes, durante o después de la activación/conjugación. El ajuste de la hidrodinámica en el sistema permite el ajuste de concentraciones óptimas y, opcionalmente, la consecución de poner en contacto mayores concentraciones localizadas en la superficie de la membrana para optimizar adicionalmente el procedimiento de activación y conjugación. Este procedimiento funciona de manera sencilla, es reproducible, puede realizarse a escala y puede usarse para producción farmacéutica a escala comercial.

Los ejemplos de PEG que pueden usarse en el procedimiento de la presente invención incluyen, metoxipolietilenglicol (mPEG), éteres PEG-glicídlicos (Epoxy-PEG), PEG-oxicarboxilimidazol (COI-PEG), polietilenglicoles ramificados, polietilenglicoles lineales, polietilenglicoles bifurcados y polietilenglicoles multiarmados o superramificados (star-PEG).

El polietilenglicol (PEG) incluye cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG comprenden la siguiente estructura “--(OCH₂CH₂)--” en la que (n) es de 2 a 4000. Como se usa en el presente documento, PEG también incluye “--CH₂CH₂--O(CH₂CH₂O)--CH₂CH₂--” y (OCH₂CH₂)O--” dependiendo de si se han desplazado o no los oxígenos terminales.

El polietilenglicol también incluye estructuras que tienen diversos grupos terminales o de protección terminal, tales como, sin limitación, un grupo hidroxilo o un alcoxi C120. Polietilenglicol también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50 %, de subunidades de repetición de --OCH₂CH₂--. Con respecto a formas específicas, el PEG puede adoptar cualquier número de una diversidad de pesos moleculares, así como estructuras o geometrías tales como ramificada, lineal, bifurcada y multifuncional.

EJEMPLOS

Para que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: PEGilación

En el control, se cargó una solución madre de tris 2-carboxietil fosfina (TCEP) en una solución de rFVIII purificada de 7,2 ml (0,4 μM). Después de la reducción, la TCEP en la solución de rFVIII se retiró por SEC usando una columna Superdex-75. El PEG sólido se cargó en la solución de rFVIII a una concentración final de PEG de 30 μM. El rFVIII se incubó con PEG durante 13 horas a 2-8 °C. Al final de la incubación de PEGilación, el lote se diluyó 3 veces y se cargó

sobre una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 4 ml. El rFVIII unido a la columna se separó y se eluyó con un gradiente.

En otra ejecución, la solución de rFVIII purificada de 695 ml (0,49 μ M) se cargó en el recipiente de retenido de una instalación de flujo tangencial equipada con 50 cm² de membrana de filtración de flujo tangencial (TFF, por las siglas en inglés *Tangential Flow Filtration*) de celulosa regenerada de 30 kDa. En primer lugar, la solución de rFVIII se concentró a 1,78 μ M filtrando 500 ml de infiltrado a través de la membrana de TFF. Después de la concentración, la solución madre de TCEP se cargó en la solución de rFVIII concentrada. La incubación de reducción duró 30 minutos. El caudal de cruce del retenido se mantuvo a 4 l/min/m² mientras que el infiltrado se recicló de nuevo al recipiente de retenido a 0,7 l/min/m². Después de la reducción, la TCEP en el retenido se retiró por diafiltración contra 5 volúmenes de tampón de PEGilación. Durante la diafiltración, se tomaron muestras de retenido y de infiltrado después de cada volumen de diafiltro para analizar la concentración de TCEP. Al final de la diafiltración de retirada de TCEP, se cargó PEG sólido en el recipiente de retenido para conseguir una concentración final de PEG de 39 μ M. El rFVIII se incubó con PEG durante aproximadamente 2 horas. Durante la incubación, la mezcla se proporcionó recirculando el retenido a través del sistema TFF a 4 l/min/m². Al final de la incubación de PEGilación, el retenido se recogió y se diluyó 4 veces. Parte del retenido diluido se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 5 ml. El rFVIII unido a la columna se separó y se eluyó por elución en gradiente.

Las fracciones obtenidas de la elución en gradiente se analizaron por SDS-PAGE y HPLC- SEC analítica mientras que las muestras de retenido e infiltrado se analizaron para TCEP por ensayo HPLC analítico.

El perfil de elución por cromatografía de intercambio catiónico del experimento control se muestra en la Figura 1. Este consiste en tres picos de elución en el que los picos 1, 2 y 3 se eluyen al 49,5 %, 58 % y 63,7 % de Tampón B, respectivamente.

Para caracterizar los picos de elución se usó SDS-PAGE. Dado que la tinción con yoduro de bario forma de un complejo con polietilenglicol, el gel de SDS-PAGE se tiñó primero con yoduro de bario para confirmar la conjugación del polietilenglicol con rFVIII. Después de tomar la imagen, el gel se decoloró y se volvió a teñir con Azul de Coomassie. El SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie mostrado en la Figura 2 indica que antes de la PEGilación el rFVIII contiene una cadena pesada (HC, *Heavy Chain*) y una cadena ligera (LC, *Light Chain*) con masas moleculares de entre 82 kDa y 116 kDa. Después de la PEGilación, la cadena ligera en el rFVIII en el Pico 1 aumenta a más de 182 kDa. El aumento en la masa molecular se debe a la conjugación de polietilenglicol con la cadena ligera durante la PEGilación, lo que se confirma por tinción con yoduro de bario. El Pico 2 contiene diversas especies de proteínas que no están PEGiladas. Las especies recogidas en el Pico 3 contienen la cadena pesada y la cadena ligera no PEGilada.

También se analizó por SEC una muestra de cada pico de elución. La Figura 3 muestra que los tiempos de retención por SEC analítica del Pico 1 (rFVIII PEGilado), Pico 2 y Pico 3 (rFVIII no PEGilado) son de 16,6 minutos, 17,8 minutos y 19,4 minutos, respectivamente. Dado que el tiempo de retención del rFVIII no PEGilado tiene una duración de 2,8 minutos más que el del rFVIII PEGilado, puede usarse SEC analítica como un procedimiento ortogonal para confirmar la conjugación de PEG con la molécula rFVIII.

Una etapa adicional en el procedimiento de PEGilación es la retirada del reductor antes de la etapa de conjugación. La Tabla 1 muestra que el retenido e infiltrado recogidos en la PEGilación en modo TFF tienen concentraciones de TCEP similares al final de cada volumen de diafiltro. La TCEP tanto en el retenido como en el infiltrado se reduce por debajo del límite de detección del ensayo después de 4 volúmenes de diafiltro. Esto indica que la diafiltración es eficaz retirando el reductor.

TABLA 1

Volumen de diafiltro	Retenido de TCEP (μ M)	Infiltrado de TCEP (μ M)
1	241,3	326,0
2	147,0	181,6
3	54,0	69,2
4	0	0
5	0	0

En la Figura 4 se muestra el perfil de elución por cromatografía de intercambio catiónico del material recuperado de la PEGilación en modo TFF. De manera similar a la Figura 1, esto también consiste en tres picos de elución en los que los Picos 1, 2 y 3 se eluyen a 48,3 %, 56,1 % y 62,8 % de Tampón B, respectivamente. El tiempo de retención por HPLC-SEC analítica de los Picos 1 es 15,6 minutos en comparación con los 18,5 minutos para el Pico 3. La diferencia en cuanto al tiempo de retención (2,9 minutos) entre estos dos picos de elución por cromatografía de intercambio catiónico está en consonancia con la del grupo de control. Esto demuestra que el procedimiento de PEGilación en modo TFF puede integrar las etapas implicadas en la conjugación biomolécula-polímero en una sola etapa de TFF.

Ejemplo 2. Estudio de Consistencia

Se realizaron ejecuciones múltiples a escala de laboratorio para evaluar la consistencia del procedimiento de PEGilación en modo TFF. Volúmenes de 700-900 ml de solución de rFVIII purificado se cargaron en un sistema TFF Uniflux™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipado con una membrana de celulosa regenerada de 30 kDa de 50-100 cm² (Millipore Corporation, Billerica, MA). Las soluciones de rFVIII se concentraron a la concentración diana. La TCEP se cargó en el recipiente de retenido para conseguir una concentración eficaz de 250-450 µM y se incubó durante 30 minutos. Después de la reducción, la TCEP en el sistema se retiró por diafiltración. Se cargó PEG al rFVIII reducido para conseguir una concentración eficaz de 13-26 µM y se incubó durante 10-15 horas. El caudal de cruce del retenido y el caudal del infiltrado empleadas durante la concentración y la diafiltración fueron de 6-15 l/min/m² y 0,5-2 l/min/m², respectivamente. Después de la PEGilación, los retenidos se recuperaron del sistema TFF, se diluyeron y se cargaron en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 56 ml. El rFVIII unido a la columna se separó y se eluyó por un gradiente. La concentración de proteína se determinó mediante SEC-HPLC analítica. La fuerza de las muestras se determinó mediante ensayo cromogénico.

El área de membrana usada para los procedimientos a escala de laboratorio se representa en la Tabla. Las concentraciones iniciales de las soluciones de rFVIII usadas para los procedimientos TFF varían de 35 µg/ml a 55 µg/ml. Las soluciones se concentraron posteriormente hasta 10 veces antes de la reducción y PEGilación.

TABLA 2

	Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3	Ejecución 4
Área de membrana TFF (cm ²)	50	50	100	100
Concentración de rFVIII inicial (µg/ml)	53,6	35,1	56,0	54,5
Concentración de reducción de rFVIII (µg/ml)	152	353	183	140
rFVIII PEGilado (%)	59 %	72 %	64 %	48 %

En la Figura 5 se presentan los perfiles de elución por cromatografía de intercambio catiónico de los procedimientos TFF a escala de laboratorio. Estos perfiles son similares a los mostrados en la Figura 4 que contienen rFVIII PEGilado, rFVIII no PEGilado y otras especies relacionadas con rFVIII.

Los perfiles de elución por HPLC-SEC analítica mostrados en la Figura 6 indican que el rFVIII PEGilado está monoPEGilado. El tiempo de retención por HPLC-SEC resumido en la Tabla 3 muestra que el rFVIII PEGilado se eluye de 2,5-2,6 minutos antes que el rFVIII no PEGilado. Esto coincide con lo observado en el Ejemplo 1.

TABLA 3

Lote a escala de laboratorio N.º	Tiempo de retención del rFVIII (min.)	Tiempo de retención del rFVIII PEGilado (min.)
1	16,6	14,1
2	16,7	14,1
3	16,6	14,1
4	16,6	14,1

La eficiencia de la PEGilación de los procedimientos TFF se calculó usando la fuerza de los productos intermedios del procedimiento. Esto varía del 48-72 % (TABLA) que es comparable con la PEGilación de otras proteínas (Brocchini, y col, Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 3-12, 2008; Schiavon, y col, Farmaco 55: 264-269, 2000; Lee, y col, Bioconjug. Chem. 18: 1728-1734; 2007). Este ejemplo demuestra que la PEGilación en el modo TFF es reproducible con una eficacia de PEGilación comparable a la indicada en las referencias.

Ejemplo 3. PEGilación en Modo TFF a Escala Piloto

Se realizaron ejecuciones de PEGilación en modo TFF a escala piloto para demostrar la escalabilidad del procedimiento. En estas ejecuciones, se transfirió aproximadamente una solución de rFVIII de 25 l en un rodillo de TFF equipado con membrana de celulosa regenerada de 30 kDa de 0,5 m². La solución de rFVIII se concentró y redujo por TCEP con una concentración eficaz de 600 µM. Después de la reducción, la TCEP se retiró por diafiltración contra el tampón de PEGilación. Se cargó PEG en el rFVIII reducido para conseguir una concentración eficaz de 40 µM. El caudal de cruce y el caudal del infiltrado empleadas durante la concentración y diafiltración fueron de 7 l/min/m² y 1 l/min/m², respectivamente. Al final de la incubación de PEGilación, se recogió el retenido, se diluyó y se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de 4 l. Las proteínas unidas a la columna se separaron y se eluyeron por un gradiente.

El rFVIII PEGilado se analizó por HPLC-SEC analítica mientras que la eficacia de PEGilación se calculó basándose en la fuerza determinada por el ensayo cromogénico.

El perfil de elución por cromatografía de intercambio catiónico de la PEGilación en modo TFF a escala piloto se muestra en la Figura 7. Similar a las mostradas en los ejemplos previos, los perfiles de elución contienen un pico de rFVIII

PEGilado y otras especies relacionadas con rFVIII. El rFVIII PEGilado puede separarse de otras especies por cromatografía de intercambio catiónico con el gradiente apropiado.

5 En la Tabla 4 se resumen los tiempos de retención de rFVIII PEGilado y no PEGilado. La diferencia en cuanto al tiempo de retención entre estas 2 especies de rFVIII es de 3 minutos. La eficacia de PEGilación varió del 40-55 %. Esto también coincide con la mostrada en los ejemplos previos. Este ejemplo demuestra que la PEGilación en modo TFF es escalable y consistente.

TABLA 4

Lote a escala de laboratorio N.º	Tiempo de retención del rFVIII (min.)	Tiempo de retención del rFVIII PEGilado (min.)
1	18,0	15,0
2	18,0	15,0
3	18,0	15,0

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un conjugado de factor de coagulación que comprende las etapas de activar el factor de coagulación por contacto con un agente activador; retirar el agente activador; y
5 conjuguar el factor de coagulación haciendo reaccionar el factor de coagulación con un polímero activado;
en el que las etapas del procedimiento están integradas en un sistema de filtración de flujo tangencial integrado y,
en el que el polímero es polietilenglicol y
en el que el agente activador es un agente reductor.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de separar el conjugado de factor de
coagulación del factor de coagulación no conjugado.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el conjugado de factor de coagulación se separa del factor de
coagulación no conjugado por cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico.
4. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el factor de coagulación es rFVIII.
5. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente reductor es ditiotreitól o tris 2-
carboxietil fosfina.

15

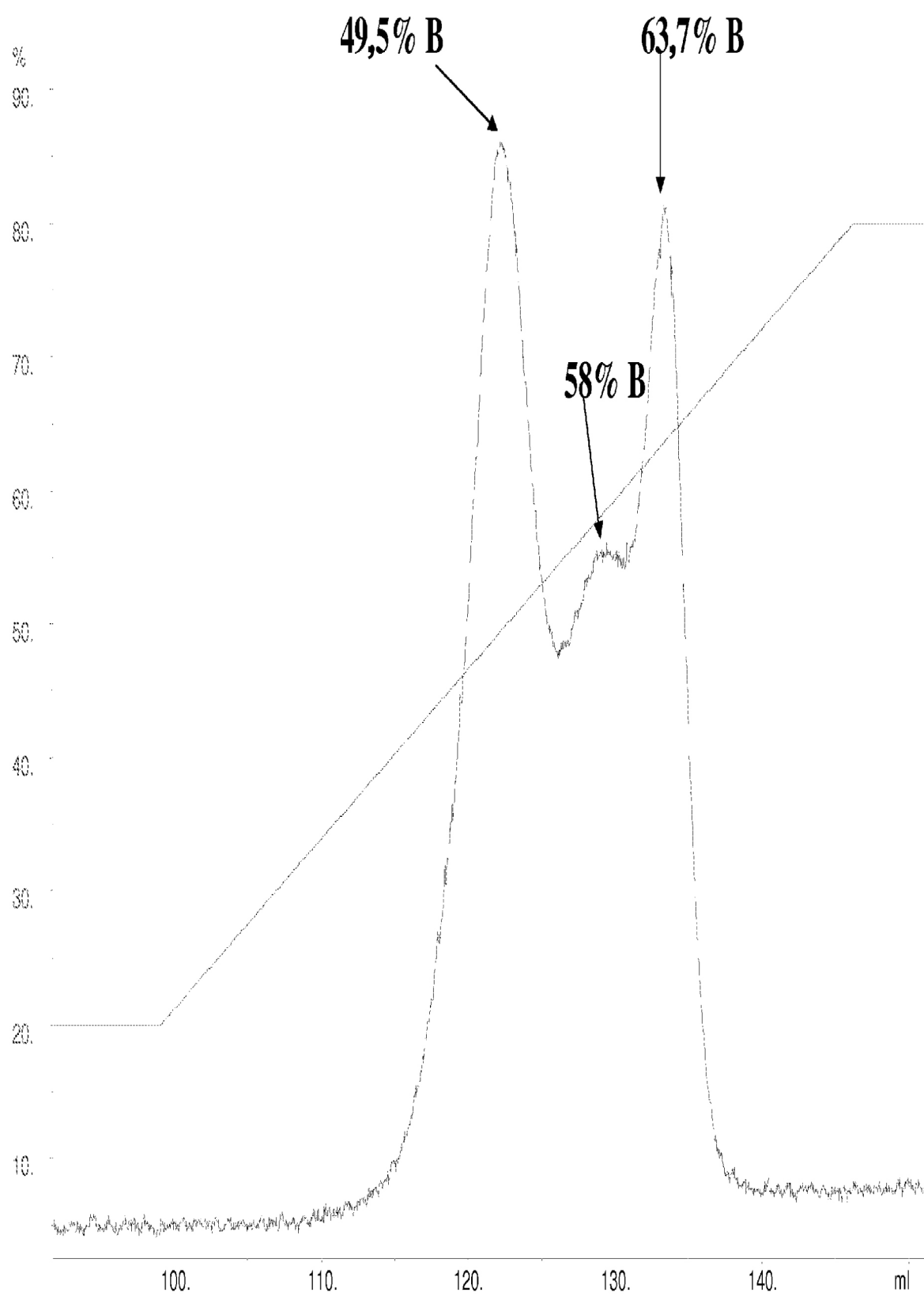


FIGURA 1

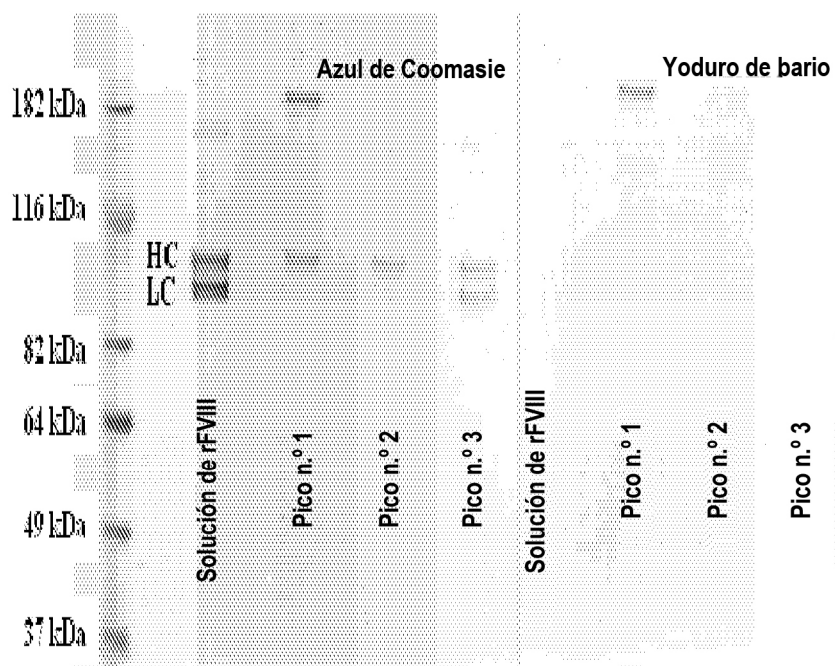


FIGURA 2

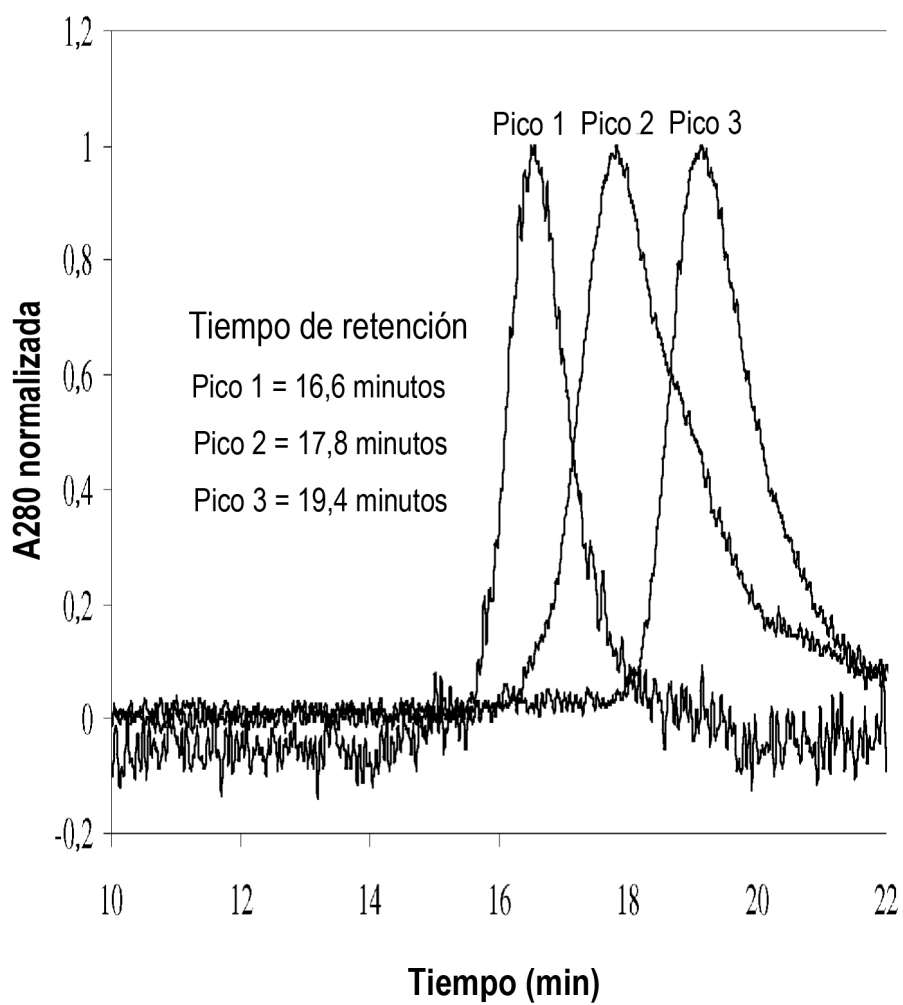


FIGURA 3

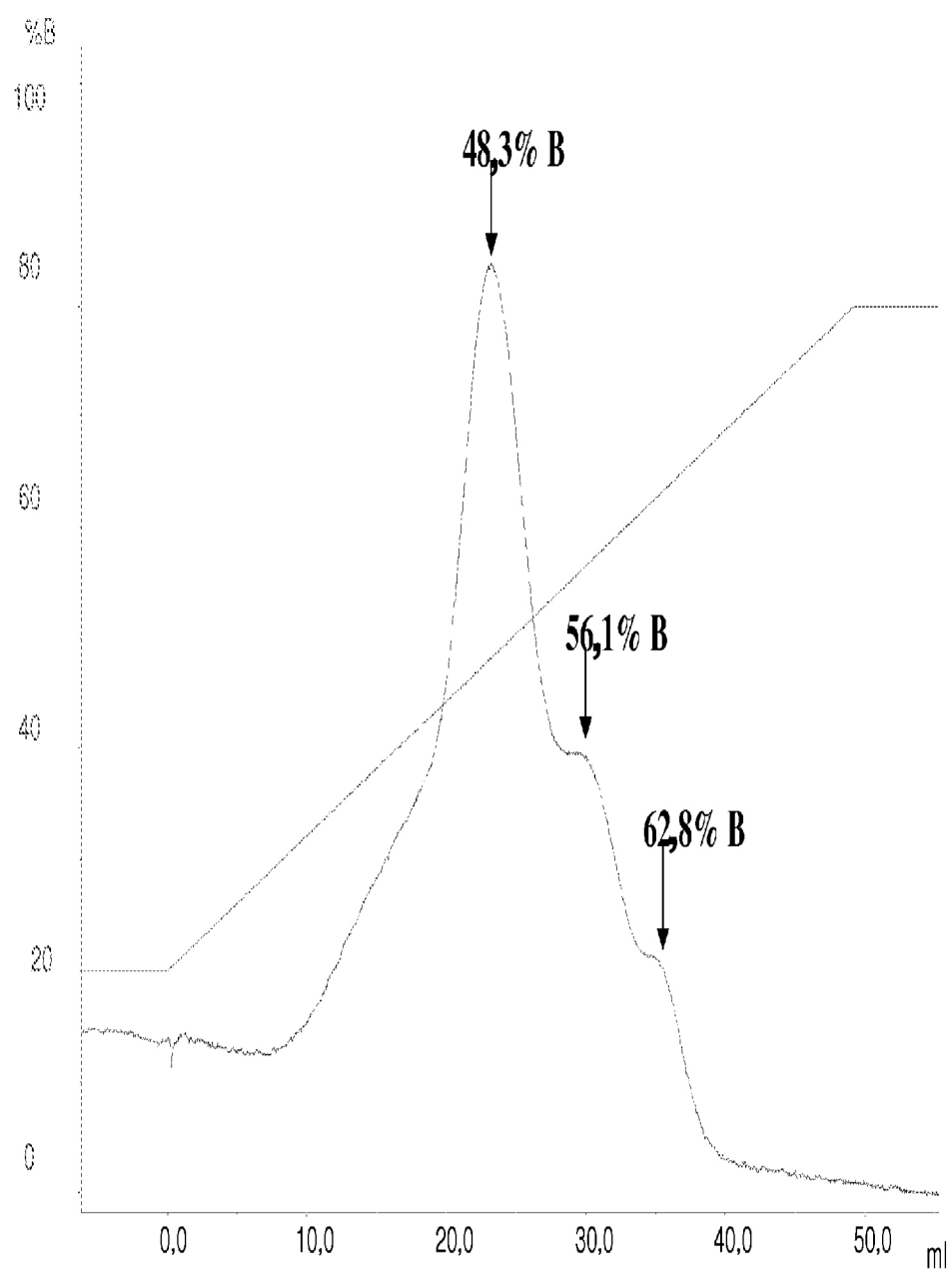


FIGURA 4

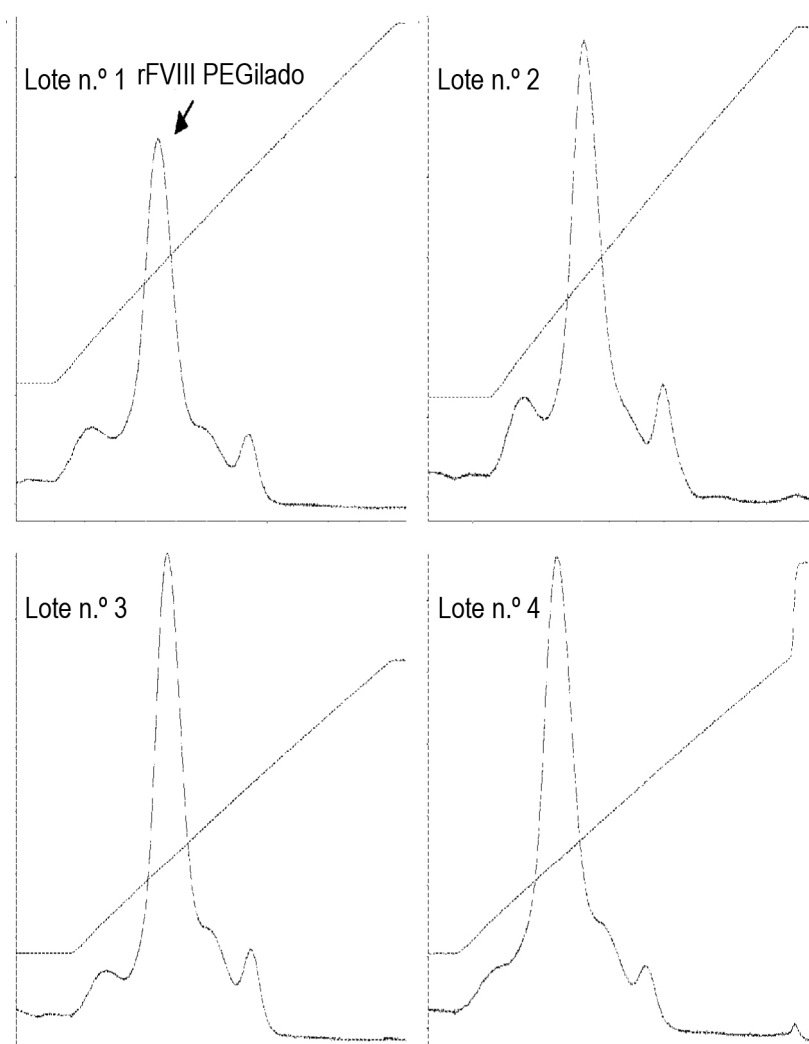


FIGURA 5

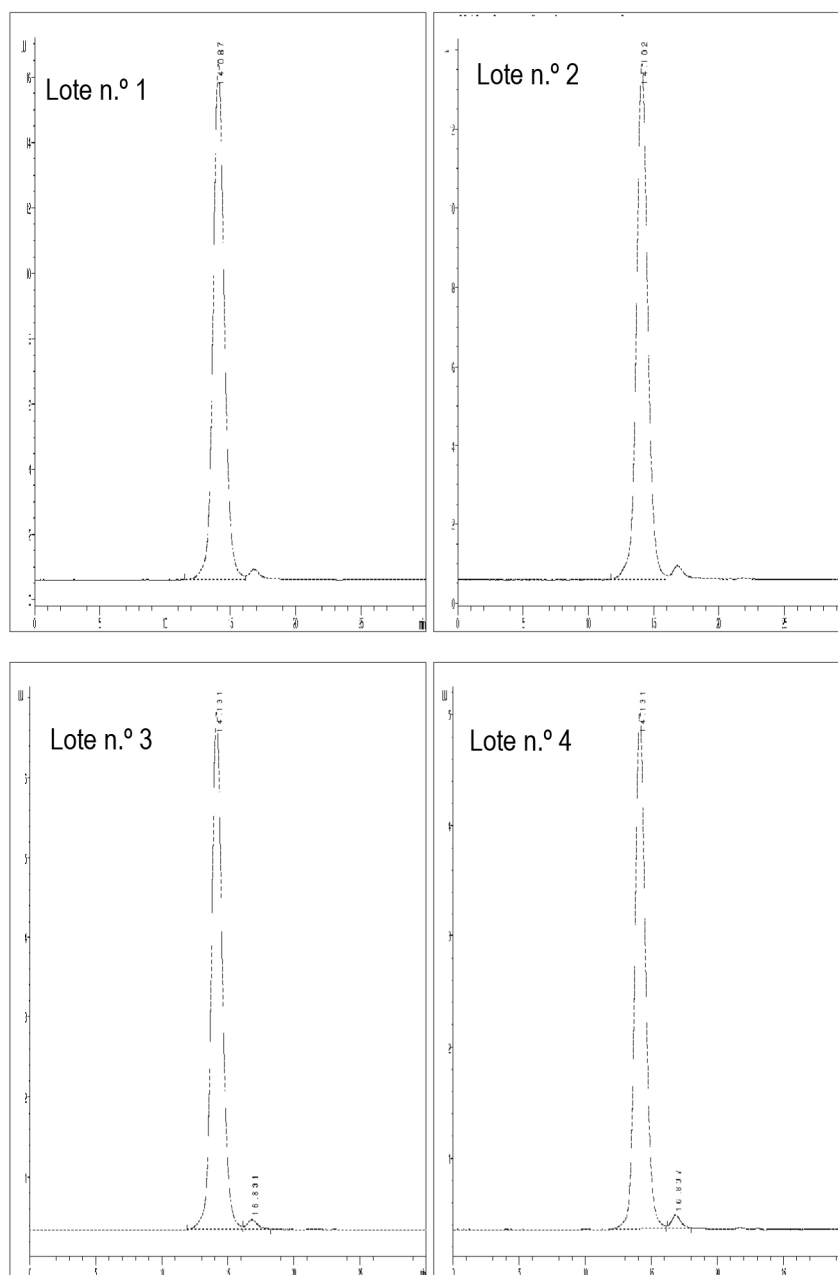


FIGURA 6

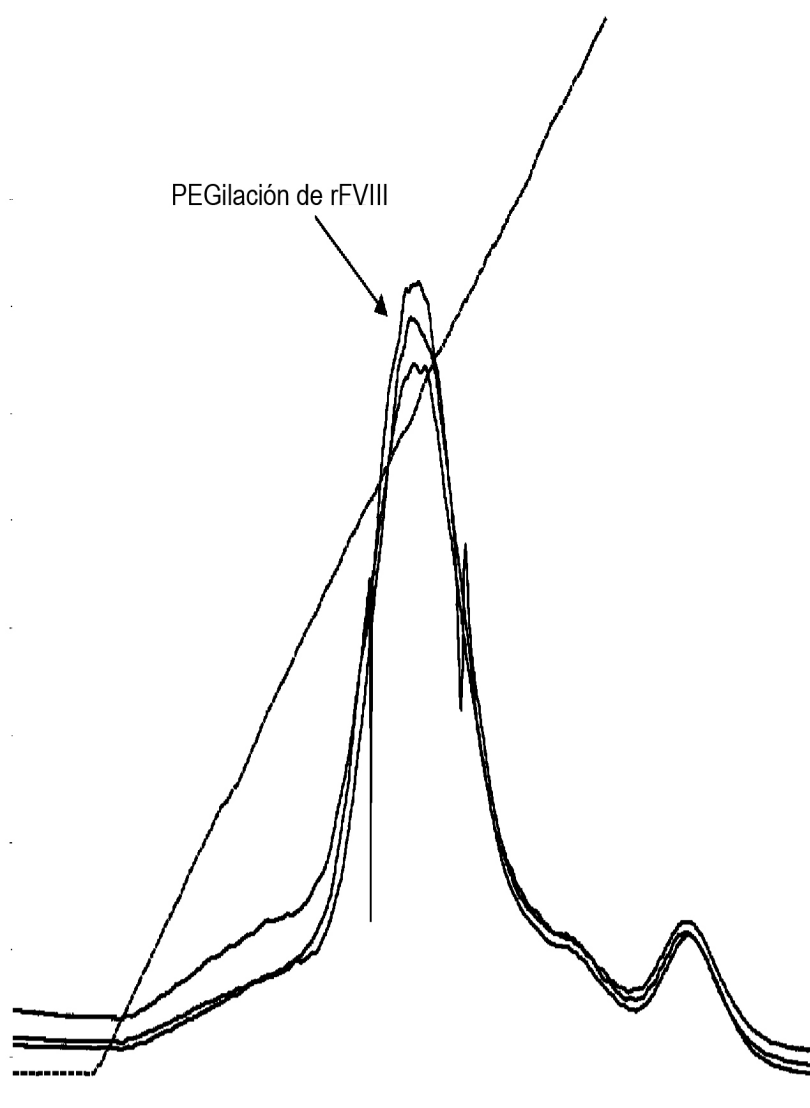


FIGURA 7