

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 028**

51 Int. Cl.:

C07K 14/555 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2015 PCT/US2015/045678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17030563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2015 E 15763443 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3183264**

54 Título: **Método de PEGilación**

30 Prioridad:

19.08.2014 US 201461997000 P

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

11.05.2021

73 Titular/es:

**BIOMGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**GRONKE, ROBERT S. y
JAQUEZ, ORLANDO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 824 028 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

Método de PEGilación

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para PEGilar interferón beta.

5 Antecedentes de la invención

La unión covalente de polímeros hidrófilos, tales como los polímeros de polialquilen glicol, también conocidos como óxidos de polialquileno, a moléculas y superficies biológicamente activas es de interés en biotecnología y medicina. En particular, muchas investigaciones se han centrado en el uso de conjugados de poli(etilen glicol) (PEG), también conocido como poli(óxido de etileno) (PEO), para mejorar la solubilidad y estabilidad y para prolongar la vida media y exposición en la circulación sanguínea de moléculas biológicas, incluyendo, por ejemplo, interferón beta.

En su forma más común, el PEG es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo: HO-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. Este polímero, alfa-, omega-dihidroxilpoli(etilen glicol), también se puede representar como HO-PEG-OH, donde se entiende que el símbolo -PEG- representa la siguiente unidad estructural: CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂- donde n varía típicamente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10.000. El PEG se usa comúnmente como metoxi-PEG-OH o mPEG, en el que un extremo contiene el grupo metoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo que está sujeto a una fácil modificación química. Además, los copolímeros aleatorios o en bloque de diferentes óxidos de alquileno (p. ej., ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno) que están estrechamente relacionados con el PEG en su química pueden sustituir al PEG en muchas de sus aplicaciones.

Para acoplar el PEG a una molécula de interés, a menudo es necesario activar el PEG preparando un derivado del PEG que tenga un grupo funcional reactivo en al menos un extremo. El grupo funcional se elige en función del tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG.

El PEG es un polímero que tiene las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes orgánicos, ausencia de toxicidad y ausencia de inmunogenicidad. Un uso del PEG es unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer soluble el "conjugado" de PEG-molécula resultante. Por ejemplo, se ha mostrado que el fármaco paclitaxel insoluble en agua, cuando se acopla a PEG, se vuelve soluble en agua. Greenwald, et al., 1995, J Org Chem 60:331-336.

Un factor que limita la utilidad de las sustancias proteínicas para aplicaciones de tratamiento médico es que, cuando se administran por vía parenteral, se eliminan del cuerpo en poco tiempo. Esta eliminación puede ocurrir como resultado de la degradación por las proteasas o por el aclaramiento utilizando rutas normales para la eliminación de proteínas, tales como por filtración en los riñones. La administración oral de estas sustancias es aún más problemática porque, además de la proteólisis en el estómago, la alta acidez del estómago destruye estas sustancias antes de que alcancen su tejido diana pretendido. Los problemas asociados con estas rutas de administración de proteínas son bien conocidos en la industria farmacéutica y se están empleando diversas estrategias para intentar solucionarlos. Se ha publicado una gran cantidad de trabajos relacionados con la estabilización de proteínas. Se conocen varias formas de conjugar proteínas con materiales poliméricos, incluyendo el uso de dextranos, polivinil pirrolidonas, glicopéptidos, polietilen glicol y poliaminoácidos. Se informa que los polipéptidos conjugados resultantes retienen sus actividades biológicas y solubilidad en agua para aplicaciones parenterales.

De particular interés es mantener la actividad biológica de los interferones mientras se reduce la toxicidad implicada con el uso de estas proteínas para el tratamiento de pacientes humanos. Los interferones son una familia de pequeñas proteínas y glicoproteínas de origen natural producidas y secretadas por la mayoría de las células nucleadas en respuesta a una infección viral, así como a otros estímulos antigénicos. Los interferones hacen que las células sean resistentes a la infección viral y presentan una amplia variedad de acciones sobre las células. Ejercen sus actividades celulares al unirse a receptores de membrana específicos en la superficie celular. Una vez unidos a la membrana celular, los interferones inician una secuencia compleja de eventos intracelulares. Los estudios in vitro han demostrado que estos incluyen la inducción de ciertas enzimas; supresión de la proliferación celular, actividades de inmunomodulación tales como potenciación de la actividad fagocítica de los macrófagos; aumento de la citotoxicidad específica de los linfocitos para las células diana; e inhibición de la replicación del virus en células infectadas con virus.

Los interferones se han ensayado en el tratamiento de una variedad de estados clínicos de enfermedad. Se ha establecido el uso del interferón beta humano en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Recientemente, se han autorizado dos formas de interferón beta recombinante (IFN β) en Europa y en los EE. UU. para el tratamiento de esta enfermedad: interferón-beta-la (IFN β-1a) (AVONEX®, Biogen, Inc., Cambridge, Mass. y REBIF®, Serono, Ginebra, Suiza) e interferón-beta-lb (IFN β - 1a) (BETASERON®, Berlex, Richmond, CA). AVONEX® y REBIF® se producen en células de mamíferos utilizando la secuencia génica humana natural y están glicosilados, mientras que BETASERON® se produce en bacterias

E. coli utilizando una secuencia génica humana modificada que contiene una sustitución de cisteína a serina preparada por ingeniería genética en el aminoácido de la posición 17 y no está glicosilado.

Se sabe que los interferones no inmunes, que incluyen tanto interferones alfa como beta, suprimen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en las células con infección aguda y crónica. Véase Poli y Fauci, 1992, *AIDS Research and Human Retroviruses* 8(2):191-197. Debido a su actividad antiviral, los interferones, en particular los interferones alfa, han recibido una atención considerable como agentes terapéuticos en el tratamiento de la enfermedad relacionada con el virus de la hepatitis C (VHC). See Hoofnagle et al., en: *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*, 1982, Filadelfia, Franklin Institute Press; Hoofnagle et al., 1986, *New Eng J Med* 315:1575-1578; Thomson, 1987, *Lancet* 1:539-541; Kiyosawa et al., 1983, en: Zuckerman, ed., *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Allen K. Liss, Nueva York p. 895-897; Hoofnagle et al., 1985, *Sem Liv Dis*, 9:259-263.

Los conjugados interferón-polímero, incluyendo conjugados con PEG, se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 4.766.106, Patente de EE. UU. No. 4.917.888, Patente de EE. UU. No. 8.017.733, Patente Europea No. 0 236 987, Patente Europea No. 0 510 356 y Publicación de Solicitud Internacional No. WO 95/13090.

La hepatitis C crónica es una enfermedad insidiosa y de progresión lenta que tiene un impacto significativo en la calidad de vida. A pesar de la mejora en la calidad del grupo de donantes de sangre y la reciente implementación de ensayos de sangre donada para el VHC, la incidencia estimada de infección aguda entre las personas que reciben transfusiones es del 5 al 10 %. Véase Alter et al., en: Zuckerman, ed., *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Allen K. Liss, Nueva York. 1988, p. 537-542. Por lo tanto, de los aproximadamente 3 millones de personas que reciben transfusiones en los Estados Unidos cada año, se desarrollará hepatitis C aguda en alrededor de 150.000. Si bien muchos pacientes que contraen hepatitis C tendrán una enfermedad leve o subclínica, aproximadamente el 50 % progresará a un estado de enfermedad crónica caracterizado por anomalías fluctuantes de las transaminasas séricas y lesiones inflamatorias en la biopsia hepática. Se estima que la cirrosis se desarrollará hasta en aproximadamente el 20 % de este grupo. Véase Koretz et al., 1985, *Gastroenterology* 88:1251-1254.

Se sabe que los interferones afectan a una variedad de funciones celulares, incluyendo la replicación del ADN y la síntesis de ARN y proteínas, tanto en células normales como anormales. Por tanto, los efectos citotóxicos del interferón no están restringidos a las células tumorales o infectadas con virus, sino que también se manifiestan en células sanas normales. Como resultado, pueden surgir efectos secundarios indeseables durante la terapia con interferón, particularmente cuando se requieren dosis altas. La administración de interferón puede provocar mielosupresión, lo que resulta en una reducción del recuento de glóbulos rojos y una reducción de los niveles de glóbulos blancos y plaquetas. Los interferones suelen dar lugar a síntomas similares a los de la gripe (p. ej., fiebre, fatiga, dolores de cabeza y escalofríos), trastornos gastrointestinales (p. ej., anorexia, náuseas y diarrea), mareos y tos. A menudo, la respuesta sostenida de los pacientes con VHC al tratamiento con interferón no PEGilado es baja y el tratamiento puede inducir efectos secundarios graves, que incluyen, pero no están limitados a, retinopatía, tiroiditis, pancreatitis aguda y depresión.

La Patente de EE. UU. No. 8.017.733 describe la síntesis de polialquilen glicoles activados, incluyendo mPEG-O-2metilpropionaldehído de 20 kDa, y su uso en la preparación de conjugados con interferón, incluyendo IFN β -1a PEGilado. En un ejemplo, se PEGiló el IFN β -1a humano en su extremo N con mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa. El material de partida en este proceso fue AVONEX® no formulado, es decir, el intermedio a granel IFN β -1a que era un lote clínico de fármaco a granel que había pasado todos los ensayos para su uso en seres humanos. El producto de la química de alquilación reductora usado para incorporar el PEG en la cadena principal de IFN β -1a dio como resultado la formación de un enlace amina que es extremadamente estable frente a la degradación. Se ha mostrado que este producto tiene parámetros farmacocinéticos mejorados y eficacia *in vivo* en un modelo de angiogénesis de melanoma. Véase Baker et al., 2006, *Bioconjug Chem* 17(1): 179-188.

La esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) se caracteriza por ataques claramente definidos de empeoramiento de la función neurológica. Estos ataques - a menudo llamados recaídas, brotes o exacerbaciones - van seguidos de períodos de recuperación parcial o completa (remisiones), durante los cuales los síntomas mejoran parcial o completamente y no hay una progresión aparente de la enfermedad. La EMRR es el curso de la enfermedad más común en el momento del diagnóstico. Aproximadamente el 85 por ciento de las personas son diagnosticadas inicialmente con EMRR, en comparación con el 10-15 por ciento con formas progresivas de la enfermedad. El interferón β -1a PEGilado (PLEGRIDY™) ha sido aprobado en los Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente-remitente.

Se desea desarrollar y utilizar una reacción de PEGilación (también denominada en la presente memoria reacción de acoplamiento de PEG) que se pueda integrar en un proceso biofarmacéutico o en un proceso por lotes para facilitar la fabricación, mejorar el rendimiento y mejorar la manipulación de los reactivos y productos de la reacción.

Resumen de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método para PEGilar interferón beta (IFN β). En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b.

- 5 Por tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un proceso para acoplar PEG a IFN. En una realización, un proceso para acoplar PEG a IFN β comprende las siguientes etapas:

(a) añadir PEG activado a una disolución de IFN β purificado en un recipiente de reacción para formar una mezcla de PEG activado e IFN β , en donde la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de 1,75 mg/ml a 3,3 mg/ml y una temperatura de 2 °C a 30 °C, en donde la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG activado a IFN β en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 1:1 a 20:1 y en donde el pH de la mezcla es de 4,0 a 6,0;

(b) opcionalmente añadir un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla, en donde la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 0,1 mM a 2,2 mM;

15 (c) añadir NaCNBH₃ a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de 5 minutos a 600 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH₃ añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH₃ en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 15 mM a 25 mM; y

(d) incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG durante 10 minutos a 24 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β , después de la etapa (c).

20 En una realización, se añade un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla de reacción. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización adicional, el proceso comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción. En una realización, la reacción de acoplamiento de PEG se para añadiendo arginina. En otra realización, la cantidad de arginina en la mezcla de reacción parada es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM.

25 En una realización, la disolución de IFN β purificado se lleva a la temperatura deseada antes de añadirla a un recipiente de reacción. En otra realización, la disolución de IFN β purificado se añade al recipiente de reacción y se lleva a la temperatura deseada antes de añadir el PEG activado. En una realización adicional, las diversas mezclas en el recipiente de reacción se recubren con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

El PEG IFN β se purifica utilizando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con el proceso de esta realización.

- 35 En otra realización, un proceso para acoplar PEG a IFN β comprende las siguientes etapas:

(a) añadir un PEG activado a una disolución de IFN β purificado en un recipiente de reacción para formar una mezcla de PEG activado e IFN β , en donde la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de aproximadamente 1,75 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml y una temperatura de aproximadamente 19 °C a aproximadamente 27 °C, en donde la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG a IFN β de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1 y en donde el pH es de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2;

(b) opcionalmente añadir un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla, en donde la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM;

45 (c) añadir NaCNBH₃ a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 240 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH₃ añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH₃ en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM; y

(d) incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 9 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β .

En una realización, el proceso comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción. En otra realización, la reacción de acoplamiento de PEG se para añadiendo arginina. En una realización, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En otra realización, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM. En una realización adicional, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 100 mM. En una realización adicional, las diversas mezclas en el recipiente de reacción se recubren con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno.

En una realización, la disolución de IFN β purificado se lleva a la temperatura deseada antes de añadirla a un recipiente de reacción. En otra realización, la disolución de IFN β purificado se añade al recipiente de reacción y se lleva a la temperatura deseada antes de añadir el PEG activado.

En una realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 1,75 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En otra realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En una realización adicional, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,4 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En una realización adicional, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,9 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En otra realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es aproximadamente 3,3 mg/ml. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b.

En una realización, la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 5:1. En otra realización, la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1. En una realización adicional, la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es aproximadamente 1,5:1. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

En una realización, el catalizador de ácido de Lewis se añade a la mezcla de reacción. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización, la concentración del catalizador de ácido de Lewis o el catión de cinc en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM. En otra realización, la concentración del catalizador de ácido de Lewis o el catión de cinc en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,1 mM. En una realización adicional, la concentración del catalizador de ácido de Lewis o el catión de cinc en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 0,95 mM a aproximadamente 1,05 mM. En una realización adicional, la concentración del catalizador de ácido de Lewis o el catión de cinc en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es aproximadamente 1,0 mM.

En una realización, la concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM. En otra realización, la concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 22 mM. En una realización adicional, la concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es aproximadamente 20 mM.

Aunque no es un parámetro crítico o clave (como se describe en la presente memoria) para el reactivo de acoplamiento de PEG, el tiempo de retención de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada es crítico para maximizar la cantidad de mono-PEG IFN β purificado recuperado de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada se puede retener durante hasta 48 horas a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 25 °C antes de iniciar la purificación del mono-PEG IFN β . En una realización, la temperatura de retención es de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 23 °C. En otra realización, la temperatura de retención es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En una realización adicional, la temperatura de retención es de aproximadamente 8 °C a aproximadamente 18 °C. El PEG IFN β se purifica usando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con el proceso de esta realización.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende los siguientes elementos:

(a) IFN β a una concentración de 1,5 mg/ml a 2,8 mg/ml;

(b) PEG activado en una relación molar de PEG activado a IFN β de 1:1 a 20:1; y

(c) NaCNBH₃ a una concentración de 15 mM a 25 mM, en donde el pH de la mezcla de reacción de PEG es de 4,0 a 6,0.

5 En una realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,2 mM. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además arginina a una concentración en la mezcla de reacción de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En una realización, se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG que comprende además arginina. En una
10 realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG en el recipiente de reacción se recubre con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

15 El PEG IFN β se purifica utilizando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con esta realización.

En otra realización, una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende los siguientes elementos:

20 (a) IFN β a una concentración de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 2,8 mg/ml;

(b) PEG activado en una relación molar de PEG activado a IFN β de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 5:1, más preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1, aún más preferiblemente aproximadamente 1,5:1; y

25 (c) NaCNBH₃ a una concentración de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, preferiblemente de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 22 mM, más preferiblemente aproximadamente 20 mM, en donde el pH de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2, preferiblemente de aproximadamente 4,9 a aproximadamente 5,1, más preferiblemente aproximadamente 5,0.

30 En una realización, la reacción de acoplamiento de PEG comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,1 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,95 mM a aproximadamente 1,05 mM, aún más preferiblemente aproximadamente 1,0 mM. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc.

35 En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además arginina en una concentración en la mezcla de reacción de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, preferiblemente de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM, más preferiblemente aproximadamente 100 mM. En una realización, se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG que comprende además arginina. En otra realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG está en un recipiente de reacción. En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG en el recipiente de reacción se recubre con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG
40 tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

45 El PEG IFN β se purifica utilizando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con esta realización.

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque

se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados.

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

- 5 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de la figura

La Figura ilustra una realización de una reacción de acoplamiento de PEG descrita en la presente memoria.

Descripción detallada de la invención

- 10 La presente invención se refiere a un método para PEGilar interferón beta. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b.

El término "interferón" o "IFN", tal y como se usa en la presente memoria, significa la familia de proteínas específicas de especies altamente homólogas que inhiben la replicación viral y la proliferación celular y modulan la respuesta inmune. Los interferones humanos se agrupan en dos clases; Tipo I, que incluye interferón α y β , y Tipo II, que está representado únicamente por interferón γ . Se han desarrollado formas recombinantes de cada grupo y están disponibles comercialmente. Los subtipos de cada grupo se basan en características antigénicas/estructurales.

- 15 Los términos "interferón beta", "interferón-beta", "IFN beta", "IFN-beta", "interferón β ", "interferón- β ", "IFN β ", "IFN", "interferón beta", "interferón-beta", "interferón β ", "interferón- β ", "IFN beta", "IFN-beta", "IFN β ", "IFN β " e "interferón de fibroblastos humanos" se usan indistintamente en la presente memoria para describir miembros del grupo de interferón beta que tienen distintas secuencias de aminoácidos que se han identificado mediante el aislamiento y secuenciación del ADN que codifica los péptidos.

- 20 Además, los términos "interferón beta 1a", "interferón beta-1a", "interferón-beta 1a", "interferón-beta-1a", "IFN beta 1a", "IFN beta-1a", "IFN-beta 1a", "IFN-beta-1a", "interferón β 1a", "interferón- β 1a", "interferón β -1a", "interferón- β -1a", "IFN β 1a", "IFN β -1a", "IFN- β 1a", "IFN- β -1a", "interferón beta 1a", "interferón beta-1a", "interferón-beta 1a", "interferón-beta-1a", "interferón β 1a", "interferón β -1a", "interferón- β 1a", "interferón- β -1a", "IFN beta 1a", "IFN beta-1a", "IFN-beta 1a", "IFN-beta-1a", "IFN β 1a", "IFN β -1a", "IFN- β 1a" e "IFN- β -1a" se usan indistintamente en la presente memoria para describir el interferón beta producido de forma recombinante o sintética que tiene las secuencias de aminoácidos naturales (de tipo salvaje).

- 25 Además, los términos "interferón beta 1b", "interferón-beta 1b", "interferón beta-1b", "interferón-beta-1b", "IFN beta 1b", "IFN-beta 1b", "IFN beta-1b", "IFN-beta-1b", "interferón β 1b", "interferón- β 1b", "interferón β -1b", "interferón- β -1b", "IFN β 1b", "IFN β -1b", "IFN- β 1b", "IFN- β -1b", "interferón beta 1b", "interferón beta-1b", "interferón-beta 1b", "interferón-beta-1b", "interferón β 1b", "interferón- β 1b", "interferón β -1b", "interferón- β -1b", "IFN beta 1b", "IFN-beta 1b", "IFN beta-1b", "IFN-beta-1b", "IFN β 1b", "IFN β -1b", "IFN β 1b" e "IFN β -1a" se usan indistintamente en la presente memoria para describir el interferón beta producido de forma recombinante o sintética que tiene las secuencias de aminoácidos naturales (de tipo salvaje).

- 30 Los términos "IFN beta PEGilado", "IFN-beta PEGilado", "IFN β PEGilado", "IFN β PEGilado", "interferón beta PEGilado", "interferón-beta PEGilado", "interferón β PEGilado", "interferón- β PEGilado", "PEG IFN beta", "PEG IFN-beta", "PEG IFN β ", "PEG IFN β ", "PEG interferón beta", "PEG interferón beta", "PEG interferón beta", "PEG interferón β " y "PEG interferón- β " se usan indistintamente en la presente memoria para describir un IFN beta que contiene un resto de PEG o mPEG unido al extremo amino del interferón.

El término "preferentemente mono-PEG IFN β " se usa en la presente memoria para significar que más del 50 % de este producto está presente en la mezcla de reacción parada. En algunas realizaciones, el rendimiento de mono-PEG IFN β es de aproximadamente el 62 % a aproximadamente el 68 % del producto PEGilado.

- 35 El término "PEG activado" se refiere a un PEG que se ha activado preparando un derivado de PEG que tiene un grupo funcional reactivo en al menos un extremo. El grupo funcional reactivo se elige en función del tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. Los ejemplos de PEG activado son muy conocidos en la técnica, tal como se describe en la Patente de EE. UU. No. 8.017.733.

- 40 El advenimiento de la tecnología de ADN recombinante aplicada a la producción de interferón ha permitido sintetizar con éxito varios interferones humanos, permitiendo de esta manera la fermentación, producción, aislamiento y purificación a gran escala de varios interferones hasta la homogeneidad. El interferón producido de forma recombinante conserva

algunas - o la mayor parte - de sus actividades antivirales e inmunomoduladoras *in vitro* e *in vivo*. También se entiende que las técnicas recombinantes también podrían incluir un sitio de glicosilación para la adición de un resto de carbohidrato en el polipéptido derivado de forma recombinante.

También se contempla la construcción de plásmidos de ADN recombinante que contienen secuencias que codifican al menos parte del interferón de fibroblastos humanos y la expresión de un polipéptido que tiene actividad inmunológica o biológica del interferón de fibroblastos humanos. La construcción de genes híbridos de interferón beta que contienen combinaciones de diferentes subtipos de secuencias se puede conseguir mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Como se describe en la Patente de EE. UU. No. 8.017.733, el IFN β puede PEGilarse haciendo reaccionar una disolución de IFN β -1a, que se ha obtenido aplicando un lote de IFN β a una columna de SF-Sefarosa FF y recuperando el IFN β de la columna, con un mPEG-O-2-metilpropionaldehído a pH 6,0 en presencia de cianoborohidruro de sodio a temperatura ambiente durante 16 hr en la oscuridad. El IFN β PEGilado se purificó entonces usando una columna de SF-Sefarosa FF seguido de una columna de FPLC de exclusión por tamaño Superosa 6HR 10/20.

Con el fin de desarrollar una reacción de PEGilación que pudiera integrarse en un proceso biofarmacéutico o en un proceso por lotes para facilitar la fabricación, mejorar el rendimiento y mejorar la manipulación de los reactivos y productos de la reacción, se examinaron los parámetros de las reacciones de PEGilación para identificar aquellos parámetros que son importantes para la calidad del producto IFN β PEGilado, a saber, un IFN β unido a una única molécula de PEG en el extremo N. En una realización, la molécula de PEG es preferiblemente una molécula de PEG que tiene un peso molecular de 20 kDa. En otra realización, el PEG es mPEG. Los parámetros que son importantes para la calidad del producto a veces se denominan en la presente memoria parámetros críticos. Los parámetros que son importantes para el rendimiento o la consistencia del producto a veces se denominan en la presente memoria parámetros clave. Un parámetro puede ser tanto un parámetro crítico como un parámetro clave.

Es bien sabido que el IFN β , incluyendo el IFN β -1a y el IFN β -1b, es una proteína algo lábil con mecanismos de degradación bien conocidos. Los principales mecanismos de degradación después de la recogida de cultivos celulares son la formación y desamidación de agregados solubles, especialmente a temperaturas elevadas (es decir, $> 20^\circ\text{C}$) y pH $\geq 7,5$. Por consiguiente, el proceso de purificación del IFN β producido de forma recombinante se lleva a cabo típicamente para minimizar la degradación del IFN β mediante el uso de una temperatura baja, tal como aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C .

También se sabe que el PEG IFN β tiene mecanismos de degradación similares a los del IFN β con dos mecanismos adicionales de degradación. Se ha mostrado el potencial para que ocurra la escisión del enlazador O-2-metilpropionilo (el resto de 3 carbonos que, en algunas realizaciones, une el mPEG de 20 kDa al extremo N del IFN β) a temperatura elevada (es decir, 40°C), que da como resultado la generación de IFN β libre. Además, el resto de mPEG de 20 kDa puede sufrir degradación oxidativa en presencia de peróxidos, lo que conduce a una cadena acortada que da como resultado una polidispersidad aumentada (es decir, un peso molecular más bajo). Por consiguiente, el proceso de purificación del PEG IFN β se lleva a cabo típicamente para minimizar la degradación del PEG IFN β usando una temperatura ambiental, p. ej., temperatura ambiente.

Se realizó un análisis y estudio minucioso de los parámetros de las reacciones de PEGilación en el que se utilizó mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa como molécula de PEG activada e IFN β -1a como IFN β , únicamente a los efectos de este análisis. Sin embargo, se entiende que el IFN β -1b y otras moléculas de PEG activadas podrían haberse utilizado para este análisis y estudio. Por ejemplo, se estudió la temperatura de reacción y se encontró que la reacción de acoplamiento dependía de la temperatura. Los datos de desarrollo demostraron que se podía utilizar una temperatura entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 30°C . A 2°C , la reacción avanza lentamente. A 30°C , el producto se agrega más rápido. En una realización preferida, se encontró que, si la temperatura disminuye por debajo de un límite de acción de 19°C , la cinética de la reacción disminuirá y la conversión del mono-PEG IFN β será menor de lo esperado. En esta realización preferida, se encontró que, si la temperatura excede un límite de acción de 27°C , se esperarán perfiles de producto incorrectos (multi-PEG IFN β más alto de lo normal, IFN β sin reaccionar más bajo de lo normal) y el producto puede agregarse potencialmente. En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que la temperatura de la reacción de acoplamiento es un parámetro crítico/clave.

También se estudió la cantidad de PEG activado en la reacción de acoplamiento de PEG. En este estudio, el volumen de adición diana inicial para una disolución madre de PEG se estableció en 1 L (o 1.007 gramos $\pm$ 50 gramos) basado en el volumen de disolución de IFN β utilizado para el estudio. La disolución madre se preparó para lograr una relación molar de PEG a IFN β de 1:1 a 20:1 en la mezcla de reacción final (es decir, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG después de la adición del NaCNBH_3), en base a la actividad reportada del lote de mPEG del proveedor. El estudio mostró que existe una flexibilidad en la cantidad total de mPEG activado requerida para conseguir una conversión máxima de mono-PEG, lo que permite una cantidad más amplia de mPEG activado para una relación molar de mPEG:IFN β entre 1:1

y 20:1. En una realización preferida, se encontró que podría usarse un rango de concentración de mPEG activado de 4,0 - 5,5 mg/ml en la mezcla de reacción final sin afectar el rendimiento global de mono-PEG IFN β . En esta realización preferida, se encontró que, si la cantidad de mPEG activado está por debajo de 4,0 mg/ml o por encima de 5,5 mg/ml, se reduce el rendimiento de mono-PEG. En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que la cantidad de mPEG activado en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave.

Se ha mostrado que la adición de ZnCl_2 a la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG era beneficiosa para mejorar la conversión de mono-PEG debido a su función conocida como catalizador de ácido de Lewis en varias reacciones redox (Kim, S et al., 1985, J Org Chem 50(11):1927-1931). Aunque no es necesario para que prosiga la reacción de PEGilación (p. ej., la reacción prosigue, pero con un rendimiento ligeramente menor) y, por tanto, es un reactivo opcional en la reacción de acoplamiento de PEG, se estudió el uso de un catalizador de ácido de Lewis, tal como ZnCl_2 , en la reacción de acoplamiento de PEG. Los experimentos confirmaron que ZnCl_2 1 mM en la mezcla de acoplamiento daba lugar a niveles mejorados de mono-PEG IFN en un 10 % y a una reacción estable (velocidad lenta de aumento de multi-PEG). En una realización preferida de la presente invención, se encontró que la adición de un catalizador de ácido de Lewis eliminaba la necesidad de la adición lenta de NaCNBH_3 (previamente utilizado para mejorar la conversión de mono-PEG y reducir la cantidad requerida de NaCNBH_3) porque el aldehído activado (potencialmente ayudado por un NaCNBH_3 modificado con cinc) se convirtió de manera más eficiente en mono-PEG IFN. En algunas realizaciones, se pueden utilizar otros catalizadores de ácido de Lewis bien conocidos en lugar de ZnCl_2 en aquellas realizaciones para las que se desea un catalizador de ácido de Lewis.

En una realización preferida, se estudió adicionalmente la cantidad de ZnCl_2 en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. El estudio mostró que existe flexibilidad en la cantidad total de un catalizador de ácido de Lewis, tales como los cationes de cinc, que se puede utilizar en la reacción. Si se usa el catalizador de ácido de Lewis opcional, se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a 2,2 mM. En una realización preferida, se encontró que una concentración 1 mM de un catalizador de ácido de Lewis, tal como cloruro de cinc, era óptima para lograr la máxima conversión de mono-PEG IFN. En este estudio, el volumen de adición diana (1 L o 988 gramos $\pm$ 50 gramos), basado en el volumen de disolución de IFN β usado para el estudio, del stock de ZnCl_2 20 mM se diseñó para llevar la mezcla de reacción final (es decir, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG después de la adición de NaCNBH_3) a ZnCl_2 1mM en la mezcla de reacción final. Aunque ZnCl_2 1 mM fue óptimo en esta realización preferida, se encontró que las concentraciones entre 0,78 mM y 1,2 mM en la mezcla de reacción final rendían niveles aceptables de mono-PEG IFN. En esta realización preferida, se encontró que, si la cantidad de ZnCl_2 está por debajo de 0,78 mg/ml o por encima de 1,2 mg/ml, se reducía el rendimiento de mono-PEG. En vista de este estudio y particularmente con respecto a esta realización preferida de la presente invención, se determinó que la cantidad de un catalizador de ácido de Lewis, tal como catión de cinc, por ejemplo, ZnCl_2 , en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave.

Inicialmente, el pH de la operación se ajustó entre 4,0 y 6,0. Aunque la reacción de PEGilación ocurre a lo largo de este rango, se encontró que, a un pH de 4,0, se emite gas cianuro y la reacción es inestable. También se encontró que, a un pH de 6,0, la reacción es más lenta y ocurren más reacciones secundarias. Se encontró además que a un pH de trabajo de 5,5 se minimizaba la liberación de gases HCN/H_2 , pero daba lugar a algo de precipitación de ZnCl_2 e IFN β . Por tanto, en una realización preferida se estudió el pH útil para la adición de ZnCl_2 . En esta realización preferida, se encontró que un pH de 4,6 a 5,2 era adecuado para prevenir la precipitación del ZnCl_2 y del IFN β . Si el pH estaba por encima de 5,2, se encontró que se reducía el rendimiento de mono-PEG. Además, en una realización preferida, se encontró que un pH de 4,8 a 5,2 era adecuado para la adición de NaCNBH_3 . Si el pH estaba por debajo de 4,8 o por encima de 5,2, se encontró que se reducía el rendimiento de mono-PEG. También se encontró que un pH preferido era 5,0 para la adición de cada reactivo y la reacción de acoplamiento. Por lo tanto, los tampones usados a lo largo del proceso se cambiaron en una realización preferida para adaptarse a un pH de la reacción de acoplamiento de 5,0. En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que el pH de la mezcla de reacción para la adición de ZnCl_2 en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave. También se determinó que el pH de la mezcla de reacción para la adición de NaCNBH_3 en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave con respecto a una realización preferida de la presente invención.

También se estudió la cantidad de NaCNBH_3 en la reacción de acoplamiento de PEG. En este estudio, el volumen de adición diana para la disolución madre de NaCNBH_3 400 mM se diseñó para ser de 1 L (1.025 gramos $\pm$ 50 gramos) para todos los lotes, basado en el volumen de disolución de IFN β utilizado para el estudio. El volumen de 1 L de disolución madre de NaCNBH_3 se basó en una concentración final de NaCNBH_3 de 5 mM a 100 mM, el rango para el que se encontró que se producía la reacción. Se encontró que la reacción no se completó y que el producto de la reacción era inestable por debajo de NaCNBH_3 5 mM. También se encontró que la reacción fue demasiado rápida con un bajo rendimiento por encima de 100 mM. En una realización preferida, se eligió para el estudio una concentración final de 20 mM en la mezcla de reacción (es decir, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG después de la adición de NaCNBH_3). Este estudio indicó que se prefiere un rango de NaCNBH_3 de 15 mM - 25 mM. Si la cantidad de NaCNBH_3 estaba por debajo de 15 mM, se encontró que el rendimiento de mono-PEG se reducía. Se debe tener cuidado para evitar la adición excesiva del stock

de NaCNBH_3 , para reducir el nivel de liberación de gases de HCN y H_2 . En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que la cantidad de NaCNBH_3 en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave.

También se estudió el tiempo para la adición de NaCNBH_3 a la reacción de acoplamiento de PEG. En este estudio, se analizó el tiempo de adición de NaCNBH_3 a la mezcla de reacción para tiempos superiores a 1 min. Se encontró que la velocidad de adición de NaCNBH_3 era insignificante en presencia de cloruro de cinc. Por lo tanto, períodos de adición de NaCNBH_3 más largos no afectaron significativamente la conversión del producto. Se eligió un límite inferior de 5 min. Se eligió arbitrariamente un límite superior de 600 min para proporcionar un límite de otro modo en el tiempo de adición. En una realización preferida, se encontró que el rendimiento de mono-PEG se redujo durante un tiempo de menos de 45 min para la adición de NaCNBH_3 . Se seleccionó un límite superior de 240 min para proporcionar un tiempo razonable para la adición de NaCNBH_3 . En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que el tiempo para la adición de NaCNBH_3 en la reacción de acoplamiento de PEG es un parámetro clave.

También se estudió la cantidad de IFN β en la mezcla de reacción. Se estudió la cantidad de IFN β en la reacción de acoplamiento de PEG después de la adición de NaCNBH_3 para determinar el efecto sobre la cantidad de mono-PEG producido. Se encontró que el proceso funcionaba para un rango de 0,4 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml de IFN β , que corresponde a un rango de 0,5 mg/ml a aproximadamente 4,7 mg/ml en la disolución de IFN β purificado. A 4,0 mg/ml y por encima, la reacción falló debido a la precipitación. En una realización preferida, se encontró que una concentración de IFN β de más de 2,8 mg/ml en la reacción final de acoplamiento de PEG (es decir, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG después de la adición del NaCNBH_3) daba lugar a un rendimiento menor causado por la precipitación. La concentración de 2,8 mg/ml de IFN β en la reacción final de acoplamiento de PEG se corresponde a una concentración de 3,3 mg/ml de IFN β en la disolución inicial de proteína purificada usada para la reacción de acoplamiento de PEGilación. Se encontró que las concentraciones de IFN β menores de 1,5 mg/ml en la reacción final de acoplamiento de PEG (correspondiente a 1,75 mg/ml de IFN β en la disolución inicial de proteína purificada) daban lugar a multi-PEG IFN β incrementado, parte de lo cual podría tolerarse si se eliminara en la purificación aguas abajo. Por ejemplo, una concentración de IFN β de 1,36 mg/ml en la reacción final de acoplamiento de PEG (correspondiente a 1,6 mg/ml de IFN β en la disolución inicial de proteína purificada) daba lugar a multi-PEG IFN β al 20 % en comparación con el 18 % a una concentración de 1,5 mg/ml. En vista de este estudio y particularmente, se determinó que la cantidad de IFN β en la mezcla de reacción es un parámetro clave.

También se estudió el tiempo de retención posterior a la adición de NaCNBH_3 (a veces denominado en la presente memoria tiempo de incubación o de reacción). En este estudio, la reacción se paró en varios momentos después de la adición de NaCNBH_3 . La parada se logró utilizando arginina. La parada a los 10 min proporcionó un rendimiento inferior al 20 %. Los datos de desarrollo indicaron que la reacción de acoplamiento comienza a estabilizarse al principio (~ 200 minutos), lo que implica que la parada después de 200 minutos debería dar lugar a una menor conversión de mono-PEG IFN β . Sin embargo, se pudo obtener un rendimiento de mono-PEG IFN β hasta un tiempo de reacción de 24 hr. Aunque la parada temprana de la reacción puede dar lugar a una conversión incompleta de mono-PEG IFN β (aumento de IFN β sin reaccionar y, por lo tanto, menor rendimiento del producto y disminución de multi-PEG IFN β), no debería tener un impacto en la calidad del producto. En una realización preferida, la parada de la reacción después del período de 9 horas da lugar a niveles aumentados de multi-PEG IFN β . Se prefiere discontinuar la agitación durante la retención de la reacción, para evitar un cizallamiento excesivo de la proteína durante la reacción. Sobre la base de un análisis de los puntos de datos para esta realización preferida, se concluyó que un tiempo de reacción menor de 5 hr daba lugar a un menor rendimiento de mono-PEG IFN β y consecuentemente niveles más altos de IFN β , mientras que un tiempo de reacción mayor de 9 hr daba lugar a niveles más altos de formas de alto peso molecular. En vista de este estudio y particularmente con respecto a una realización preferida de la presente invención, se determinó que el tiempo de retención después de la adición de NaCNBH_3 es un parámetro crítico/clave.

También se estudió el tiempo de expiración de la reacción parada para determinar la estabilidad de la mezcla de reacción parada hasta que se purificó el mono-PEG IFN β . Se encontró que la reacción parada era estable en el recipiente de reacción durante hasta 48 hr a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización preferida, la temperatura de retención es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C. Se encontró que se producían formas de alto peso molecular si el tiempo era superior a 48 hr. En vista de este estudio, se determinó que el tiempo de expiración de la reacción parada es un parámetro crítico con respecto a la purificación del mono-PEG IFN β .

En vista de estos estudios, los parámetros para una realización preferida de la presente invención que se consideraron críticos y/o claves como se define en la presente memoria para la reacción de acoplamiento de PEG y la purificación del producto mono-PEG IFN β se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Parámetros Críticos y/o Clave en una Realización Preferida para la PEGilación de IFN beta

Categoría	Parámetro	Rango o Límites de la Operación	Parámetro de Rendimiento Afectado	Atributo de Calidad Afectado
Crítico/Clave	Temp. de Reacción	19 ° - 27 °C	Rendimiento Reducido si < 19 °C	Formas de Alto Peso Molecular ^a si > 27 °C
Clave	mPEG Activado (Conc. Final)	4,0 - 5,5 mg/ml ^b	Rendimiento Reducido si < 4,0 mg/mL o si > 5,5 mg/mL	NA
Clave (opcional)	ZnCl ₂ (Conc. Final)	0,78 - 1,2 mM ^b	Rendimiento Reducido si < 0,78 mM o si > 1,2 mM	NA
Clave (opcional)	pH para la Adición de ZnCl ₂	4,6 - 5,2	Rendimiento Reducido si > 5,2	NA
Clave	NaCNBH ₃ (Conc. Final)	15 - 25 mM ^b	Rendimiento Reducido si < 15 mM Alto Nivel de Liberación de gases HCN y H ₂ si > 25 mM	NA
Clave	pH para la Adición de NaCNBH ₃	4,8 - 5,2	Rendimiento Reducido si < 4,8 o si > 5,2	NA
Clave	Tiempo de Adición de NaCNBH ₃	45 - 240 min	Rendimiento Reducido y Turbidez si < 45 min	NA
Clave	Conc. de IFN Durante la Adición de NaCNBH ₃	1,75 - 3,3 mg/ml ^c	Rendimiento Reducido si > 3,3 mg/ml	NA
Crítico/Clave	Tiempo de Retención Después de la Adición de NaCNBH ₃	5,0 - 9,0 hr	Rendimiento Reducido si < 5,0 hr	Formas de Alto Peso Molecular si > 9 hr IFN si < 5,0 hr
Crítico (opcional)	Tiempo de Expiración de la Reacción Parada ^d	0 - 48 hr	NA	Formas de Alto Peso Molecular si > 48 hr

^a Las formas de alto peso molecular incluyen oligómeros de IFN PEGilado y formas multi-PEGiladas de IFN.^b Concentración expresada como la concentración de reactante en la mezcla de reacción final de PEG después de la adición de todos los reactantes.^c La concentración se expresa como la concentración de IFN β en la disolución inicial de IFN β purificado.^d Este parámetro es crítico con respecto a la purificación del producto mono-PEG IFN β.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, la reacción de acoplamiento de PEG tiene en cuenta los experimentos y los datos descritos anteriormente. De acuerdo con esta realización de la presente invención, un proceso para acoplar PEG a IFN β comprende las siguientes etapas:

(a) añadir PEG activado a una disolución de IFN β purificado en un recipiente de reacción para formar una mezcla de PEG activado e IFN β, en donde la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de 1,75 mg/ml a 3,3 mg/ml y una temperatura de 2 °C a 30 °C, en donde la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG activado a IFN β en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 1:1 a 20:1 y en donde el pH de la mezcla es de 4,0 a 6,0;

(b) opcionalmente añadir un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla, en donde la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 0,1 mM a 2,2 mM;

5 (c) añadir NaCNBH_3 a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de 5 minutos a 600 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH_3 añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH_3 en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 15 mM a 25 mM; y

(d) incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG durante 10 minutos a 24 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β , después de la etapa (c).

10 En una realización, se añade un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla de reacción. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización adicional, el proceso comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción. En una realización, la reacción de acoplamiento de PEG se para añadiendo arginina. En otra realización, la cantidad de arginina en la mezcla de reacción parada es de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM.

15 En una realización, las diversas mezclas en el recipiente de reacción se recubren con un gas inerte. En una realización adicional, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el mPEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

20 Los reactivos se compran comercialmente o se preparan usando técnicas convencionales o se preparan como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el mPEG-O-2-metil-propionaldehído de 20 kDa puede comprarse a diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, BioVectra y NOF Corporation, o puede prepararse como se describe en la Patente de EE. UU. No. 8.017.733. El material de partida de IFN β se produce de forma recombinante, p. ej., en un biorreactor, usando procedimientos y técnicas convencionales y se purifica para su uso en una reacción de acoplamiento de PEG usando técnicas convencionales.

25 En una realización, el IFN β producido de forma recombinante se purifica usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica usando una temperatura para reducir la degradación del IFN β , tal como de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. Además, los tampones usados durante la purificación, tal como en las etapas finales de la purificación, se seleccionan de manera que la disolución de IFN β purificado tenga el pH deseado. Se determina la cantidad de IFN β purificado en la disolución. Si es necesario, la disolución de IFN β purificado se diluye o se concentra para
30 proporcionar una disolución que tenga la concentración de IFN β deseada. El IFN β purificado puede almacenarse congelado a -70 °C hasta su uso. Si la disolución de IFN β purificado se almacena congelada, se puede llevar a la temperatura deseada antes de añadirla al recipiente de reacción. Alternativamente, aunque menos eficiente, la disolución de IFN β purificado congelada podría añadirse al recipiente de reacción y llevarse a la temperatura deseada.

35 En otra realización, el IFN β producido de forma recombinante se purifica usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica usando una temperatura para reducir la degradación del IFN β , tal como de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En esta realización, se utiliza una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para producir una disolución de IFN β purificado que tiene un volumen constante de disolución de IFN β purificado de cada lote de IFN β producido de forma recombinante. El volumen constante de la disolución de IFN β purificado también tendrá la concentración deseada de IFN β . Un volumen constante de la disolución de IFN β purificado permite el uso de volúmenes
40 constantes de los reactivos para garantizar las concentraciones apropiadas de reactivos en la reacción de acoplamiento de PEG, lo que hace que sea más fácil automatizar la producción de mono-PEG IFN β y la integración de la reacción de acoplamiento de PEG en un proceso de biorreactor. Estos factores dan lugar a una mejor consistencia en la reacción de PEGilación y una mejor consistencia del mono-PEG IFN β producido en la reacción. Como se describió anteriormente, se utiliza un tampón apropiado en esta etapa de manera que la disolución de IFN β purificado resultante tenga el pH deseado
45 para la reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, la disolución de IFN β purificado después de la etapa de UF/DF se congela y almacena antes de su uso en una reacción de acoplamiento de PEG. Esta disolución congelada se lleva a la temperatura deseada como se describió anteriormente. En otra realización, la disolución de IFN β purificado se añade a un recipiente de reacción y se lleva a la temperatura deseada. En una realización adicional, la disolución de IFN β purificado se lleva a la temperatura deseada antes de añadirla al recipiente de reacción.

50 El PEG IFN β se purifica usando técnicas convencionales o como se describe en la presente memoria. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con el proceso de esta realización.

En una segunda realización, la reacción de acoplamiento de PEG, ilustrada en la Figura, tiene en cuenta los parámetros críticos y/o clave mostrados en la Tabla 1. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, un proceso para acoplar PEG a IFN β comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) añadir un PEG activado a una disolución de IFN β purificado en un recipiente de reacción para formar una mezcla de PEG activado e IFN β , en donde la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de aproximadamente 1,75 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml y una temperatura de aproximadamente 19 °C a aproximadamente 27 °C, en donde la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG a IFN β de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1 y en donde el pH es de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2;
- 10 (b) opcionalmente añadir un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla, en donde la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM;
- 15 (c) añadir NaCNBH₃ a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 240 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH₃ añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH₃ en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM; y
- (d) incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 9 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β .

En una realización, el proceso comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción. En otra realización, la reacción de acoplamiento de PEG se para añadiendo arginina. En una realización, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En otra realización, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM. En una realización adicional, la cantidad de arginina que se añade es suficiente para proporcionar una concentración de arginina en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada de aproximadamente 100 mM. En una realización adicional, las diversas mezclas en el recipiente de reacción se recubren con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno.

En una realización, la disolución de IFN β purificado se lleva a la temperatura deseada antes de añadirla a un recipiente de reacción. En otra realización, la disolución de IFN β purificado se añade al recipiente de reacción y se lleva a la temperatura deseada antes de añadir el PEG activado.

Aunque no es un parámetro crítico para la reacción de acoplamiento de PEG, el tiempo de retención de la reacción parada es crítico para maximizar la cantidad de mono-PEG IFN β purificado recuperado de la reacción de acoplamiento de PEG.

Los reactivos se compran comercialmente o se preparan usando técnicas convencionales o se preparan como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el mPEG-O-2-metil-propionaldehído de 20 kDa puede comprarse en varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, BioVectra y NOF Corporation, o puede prepararse como se describe en la Patente de EE. UU. No. 8.017.733. El material de partida de IFN β se produce de forma recombinante, p. ej., en un biorreactor, usando procedimientos y técnicas convencionales y se purifica para su uso en una reacción de acoplamiento de PEG usando técnicas convencionales.

En una realización, el IFN β producido de forma recombinante se purifica usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica usando una temperatura para reducir la degradación del IFN β , tal como de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. Además, los tampones usados durante la purificación, tal como en las etapas finales de la purificación, se seleccionan de manera que la disolución de IFN β purificado tenga un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2, preferiblemente de aproximadamente 4,9 a aproximadamente 5,1, más preferiblemente aproximadamente 5,0. Se determina la cantidad de IFN β purificado en la disolución. Si es necesario, la disolución de IFN β purificado se diluye o se concentra para proporcionar una disolución que tenga la concentración de IFN β deseada. En una realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 1,75 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En otra realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En una realización adicional, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,4 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En una realización adicional, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 2,9 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml. En otra realización, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de aproximadamente 3,3 mg/ml. El IFN β purificado puede almacenarse congelado a -70 °C hasta su uso. Si la disolución de IFN β purificado se almacena congelada, se puede llevar a la temperatura deseada antes de añadirla al recipiente de reacción. Alternativamente, aunque menos eficiente, la disolución de IFN β purificado congelada podría añadirse al

recipiente de reacción y llevarse a la temperatura deseada. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b.

En otra realización, el IFN β producido de forma recombinante se purifica usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica usando una temperatura para reducir la degradación del IFN β , tal como de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En esta realización, se utiliza una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para producir una disolución de IFN β purificado que tiene un volumen constante de disolución de IFN β purificado de cada lote de IFN β producido de forma recombinante. El volumen constante de la disolución de IFN β purificado también tendrá la concentración deseada de IFN β , es decir, de aproximadamente 1,75 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2,4 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 2,9 mg/ml a aproximadamente 3,3 mg/ml, lo más preferiblemente aproximadamente 3,3 mg/ml. Un volumen constante de la disolución de IFN β purificado permite el uso de volúmenes constantes de los reactivos para garantizar las concentraciones apropiadas de reactivos en la reacción de acoplamiento de PEG, lo que hace más fácil automatizar la producción de mono-PEG IFN β y la integración de la reacción de acoplamiento de PEG en un proceso de biorreactor. Estos factores dan lugar a una mejor consistencia en la reacción de PEGilación y una mejor consistencia del mono-PEG IFN β producido en la reacción. Como se describió anteriormente, se utiliza un tampón apropiado en esta etapa de manera que la disolución de IFN β purificado resultante tenga el pH deseado para la reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, la disolución de IFN β purificado después de la etapa de UF/DF se congela y almacena antes de su uso en una reacción de acoplamiento de PEG. Esta disolución congelada se lleva a la temperatura deseada como se describió anteriormente. En otra realización, la disolución de IFN β purificado se añade a un recipiente de reacción y se lleva a la temperatura deseada. En una realización adicional, la disolución de IFN β purificado se lleva a la temperatura deseada antes de añadirla al recipiente de reacción. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b.

En cada una de estas realizaciones, la disolución de IFN β purificado, a partir del stock congelado o de la disolución de IFN β purificado o en el recipiente de reacción, se lleva a una temperatura que varía de aproximadamente 19 °C a aproximadamente 27 °C, preferiblemente de aproximadamente 21 °C a aproximadamente 25 °C, más preferiblemente de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 24 °C, lo más preferiblemente aproximadamente 23 °C antes de la adición del PEG activado.

En una primera etapa, el PEG activado se añade a la disolución de IFN β purificado en el recipiente de reacción que está a la temperatura y pH deseados para formar una mezcla de PEG activado e IFN β . En una realización, la cantidad de PEG activado añadida a la disolución de IFN β purificado es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 5:1. En otra realización, la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1. En una realización adicional, la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es aproximadamente 1,5:1. Cuando se añade una disolución stock de PEG activado a la disolución de IFN β purificado, se debe tener cuidado para asegurar que el volumen de la disolución stock de PEG activado que se añade sea solo el necesario para garantizar que los reactivos restantes en la reacción de acoplamiento de PEG alcanzarán todos los niveles requeridos. No se encontró que la velocidad de adición de la disolución stock de PEG activado fuera crítica. La velocidad de agitación no es un parámetro crítico en esta etapa, pero preferiblemente se debe lograr un mezclado adecuado durante un período de 14-16 minutos, para asegurar una homogeneidad adecuada de la mezcla de reacción antes de la adición de la disolución stock de cloruro de cinc. Las velocidades de mezclado que dan como resultado la formación de espuma en el producto, probablemente darán como resultado la agregación del producto y deben evitarse. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el mPEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

En una realización, el catalizador de ácido de Lewis se añade a la mezcla de PEG activado e IFN β en una segunda etapa para proporcionar una mezcla de PEG activado, IFN β y catalizador de ácido de Lewis. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización, la cantidad de catalizador de ácido de Lewis añadida a la mezcla de PEG activado e IFN β es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM. En otra realización, la cantidad de catalizador de ácido de Lewis añadida a la mezcla de PEG activado e IFN β es suficiente para proporcionar una concentración de cloruro de cinc en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,1 mM. En una realización adicional, la cantidad de catalizador de ácido de Lewis añadida a la mezcla de PEG activado e IFN β es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 0,95 mM a aproximadamente 1,05 mM. En una realización adicional, la cantidad de catalizador de ácido de Lewis añadida a la mezcla de PEG activado e IFN β es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 1,0 mM. Cuando se añade una disolución madre de catalizador de ácido de Lewis a la mezcla de PEG activado e IFN β , se debe tener cuidado para asegurar que el volumen de la disolución madre

de catalizador de ácido de Lewis que se añade sea solo el necesario para asegurar que los reactivos restantes en la reacción de acoplamiento de PEG alcanzarán todos los niveles requeridos. La velocidad de mezclado no es crítica para la etapa de adición del catalizador de ácido de Lewis; sin embargo, preferiblemente se debe lograr un mezclado adecuado durante un período de 14-16 minutos. Las velocidades de mezclado que dan lugar a la formación de espuma en el producto, que pueden dar lugar a la agregación del producto y deben evitarse.

En una tercera etapa, se añade NaCNBH_3 a la mezcla de PEG activado, IFN β y catalizador de ácido de Lewis opcional para formar una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, la cantidad de NaCNBH_3 añadida a la mezcla de PEG activado, IFN β y de catalizador de ácido de Lewis opcional es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM. En otra realización, la cantidad de NaCNBH_3 añadida a la mezcla de PEG activado, IFN β y catalizador ácido de Lewis opcional es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 22 mM. En una realización adicional, la cantidad de NaCNBH_3 añadida a la mezcla de PEG activado, IFN β y catalizador de ácido de Lewis opcional es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH_3 en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de aproximadamente 20 mM. El NaCNBH_3 se añade al PEG activado, IFN β y catalizador de ácido de Lewis opcional con agitación. En una realización, el NaCNBH_3 se añade durante un período de tiempo de aproximadamente 45 min a aproximadamente 240 min. En otra realización, el NaCNBH_3 se añade durante un período de tiempo de aproximadamente 45 min a aproximadamente 80 min. En una realización adicional, el NaCNBH_3 se añade durante un período de tiempo de aproximadamente 60 min. Cuando se añade una solución madre de NaCNBH_3 a la mezcla de PEG activado, IFN β y catalizador de ácido de Lewis opcional, se debe tener cuidado para asegurar que el volumen de la disolución madre de NaCNBH_3 que se añade sea solo el necesario para asegurar que el resto de los reactivos de la reacción de acoplamiento de PEG alcanzarán los niveles requeridos. Se prefiere la agitación inicial (14-16 min) de la mezcla de reacción para asegurar un mezclado apropiado y una concentración uniforme de NaCNBH_3 en todo el recipiente de reacción; las reacciones no mezcladas pueden dar lugar a una conversión incompleta de mono-PEG IFN.

En una cuarta etapa, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG se incuba para producir mono-mPEG IFN β . En una realización, la incubación se realiza durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 9 horas. En otra realización, la incubación se realiza durante aproximadamente 7 horas a aproximadamente 9 horas. En una realización adicional, la incubación se realiza durante aproximadamente 8 horas a aproximadamente 8,5 horas. En una realización adicional, la incubación se realiza durante aproximadamente 8,5 horas.

Con el fin de reducir la degradación de los materiales y productos, para reducir el oxígeno disuelto y para diluir los gases de HCN y H_2 producidos durante la reacción, se prefiere emplear un recubrimiento de gas inerte en el recipiente de reacción. En una realización, se prefiere usar una tasa de recubrimiento de gas inerte de 3-5 LPM para (a) calentar la disolución de IFN β purificado en el recipiente de reacción, (b) añadir el PEG activado al recipiente de reacción y (c) añadir el catalizador de ácido de Lewis opcional al recipiente de reacción. En otra realización, se prefiere usar una tasa de recubrimiento de gas inerte de 10 LPM para (a) añadir el NaCNBH_3 al recipiente de reacción, (b) incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG y (c) parar la reacción de acoplamiento de PEG. La tasa de recubrimiento de gas inerte se aumenta a 10 LPM con el fin de disminuir el oxígeno disuelto en el recipiente de reacción, pero también para diluir los gases de HCN y H_2 producidos durante la reacción. Las tasas de recubrimiento de gas inerte reducidas pueden dar lugar a un aumento de oxígeno disuelto (producto potencial de dimerización/agregación), así como a un aumento de los niveles medidos de HCN y H_2 (posible acumulación de gas tóxico en el recipiente), pero debido a que la reacción de PEGilación se lleva a cabo en un sistema cerrado, esto tendrá poco efecto sobre los operadores del proceso. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno.

Aunque no es un parámetro crítico para el reactivo de acoplamiento de PEG, el tiempo de retención de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada es crítico para maximizar la cantidad de mono-PEG IFN β purificado recuperado de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG parada se puede retener durante hasta 48 horas entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 25 °C antes de iniciar la purificación del mono-PEG IFN β . En una realización, la temperatura de retención es de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 23 °C. En otra realización, la temperatura de retención es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En una realización adicional, la temperatura de retención es de aproximadamente 8 °C a aproximadamente 18 °C. El PEG IFN β se purifica usando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con el proceso de esta realización.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG. En una realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende los siguientes elementos:

(a) IFN β a una concentración de 1,5 mg/ml a 2,8 mg/ml;

(b) PEG activado en una relación molar de PEG activado a IFN β de 1:1 a 20:1; y

(c) NaCNBH_3 a una concentración de 15 mM a 25 mM, en donde el pH de la mezcla de reacción de PEG es de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0.

En una realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,2 mM. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc. En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además arginina a una concentración en la mezcla de reacción de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. En una realización, se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG que comprende además arginina. En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG en el recipiente de reacción se recubre con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

El PEG IFN β se purifica utilizando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con esta realización.

En otra realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende los siguientes elementos:

(a) IFN β a una concentración de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 2,8 mg/ml, más preferiblemente aproximadamente 2,8 mg/ml;

(b) PEG activado en una relación molar de PEG activado a IFN β de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1, preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 5:1, más preferiblemente de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 2:1, aún más preferiblemente aproximadamente 1,5:1; y

(c) NaCNBH_3 a una concentración de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, preferiblemente de aproximadamente 18 mM a aproximadamente 22 mM, más preferiblemente aproximadamente 20 mM, en donde el pH de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2, preferiblemente de aproximadamente 4,9 a aproximadamente 5,1, más preferiblemente aproximadamente 5,0.

En una realización, la reacción de acoplamiento de PEG comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de aproximadamente 0,78 mM a aproximadamente 1,2 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,1 mM, más preferiblemente de aproximadamente 0,95 mM a aproximadamente 1,05 mM, aún más preferiblemente aproximadamente 1,0 mM. En otra realización, el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc.

En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG comprende además arginina a una concentración en la mezcla de reacción de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, preferiblemente de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM, más preferiblemente aproximadamente 100 mM. En una realización, se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG que comprende además arginina. En otra realización, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG está en un recipiente de reacción. En una realización adicional, la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG en el recipiente de reacción se recubre con un gas inerte. En una realización, el gas inerte es argón. En otra realización, el gas inerte es nitrógeno.

En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización, el PEG es mPEG. En una realización, el PEG activado es PEG-O-2-metilpropionaldehído. En otra realización, el PEG activado es mPEG-O-2-metilpropionaldehído. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

El PEG IFN β se purifica utilizando técnicas convencionales. Por tanto, en una realización, la presente descripción también proporciona un PEG IFN β purificado a partir de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con esta realización.

El PEG IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG o en la reacción de acoplamiento de PEG parada se purifica usando técnicas convencionales bien conocidas por el experto en la técnica. Dichas técnicas de purificación pueden incluir el uso de una columna de cromatografía de SP-Sefarosa y una columna de FPLC de exclusión por tamaño de Superosa 6 HR 10/30. Alternativamente, una técnica de purificación puede incluir una columna de intercambio catiónico fractogel EMD SE HiCap. Puede utilizarse ultrafiltración/diafiltración para concentrar el mono-PEG IFN β purificado. El mono-PEG IFN β purificado se formula para su uso y se almacena a -70 °C en botellas de teflón. Por lo tanto, en una realización, la presente descripción proporciona un mono-PEG IFN β purificado de la reacción de acoplamiento de PEG o

la reacción de acoplamiento de PEG parada obtenida de acuerdo con la presente invención o de la reacción de acoplamiento de PEG o la reacción de acoplamiento de PEG parada de la presente invención. En una realización, el IFN β es IFN β -1a. En otra realización, el IFN β es IFN β -1b. En una realización adicional, el PEG es mPEG. En otra realización, el mPEG es mPEG de 20 kDa.

- 5 Los interferones PEGilados producidos por la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas usando técnicas bien conocidas por el experto en la técnica. El PEG IFN β (también denominado a veces conjugado de PEG IFN β o conjugado) de la presente descripción se administra en una cantidad farmacológicamente efectiva para tratar cualquiera de las afecciones descritas anteriormente, y se basa en la actividad de IFN β del conjugado. El término "cantidad farmacológicamente efectiva" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta
- 10 biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que busca un investigador o un médico. Es una cantidad que es suficiente para afectar significativamente una respuesta clínica positiva mientras se mantienen niveles reducidos de efectos secundarios. La cantidad de PGC IFN-beta que puede administrarse a un sujeto que lo necesita está en el rango de 0,01-100 $\mu\text{g/kg}$, o más preferiblemente 0,01-10 $\mu\text{g/kg}$, administrado en dosis únicas o divididas.

- 15 La administración de las dosificaciones descritas puede ser en días alternos, pero preferiblemente ocurre una vez a la semana o una vez cada dos semanas. Las dosis se administran típicamente durante al menos un período de 24 semanas mediante inyección.

- La administración de la dosis puede ser oral, tópica, intravenosa, subcutánea, intramuscular o cualquier otro método sistémico aceptable. Según el criterio del médico responsable del tratamiento, la cantidad de fármaco administrado y el régimen de tratamiento utilizado dependerán, por supuesto, de la edad, el sexo y el historial médico del paciente que está
- 20 siendo tratado, el recuento de neutrófilos (p. ej., la gravedad de la neutropenia), la gravedad de la enfermedad específica y la tolerancia del paciente al tratamiento, como se pone de manifiesto por la toxicidad local y los efectos secundarios sistémicos.

- En la práctica, los conjugados de la descripción se administran en cantidades que serán suficientes para inhibir o prevenir afecciones médicas o enfermedades no deseadas en un sujeto, tal como un mamífero, y se usan en la forma más adecuada para tales propósitos. Las composiciones son preferiblemente adecuadas para uso interno e incluyen una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la descripción, solo o en combinación con otros agentes activos, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles porque tienen una toxicidad muy baja, si es que tienen alguna.
- 25

- Los conjugados descritos en la presente memoria pueden formar el ingrediente activo de una composición farmacéutica y se administran típicamente en una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (denominados colectivamente en la presente memoria como materiales "vehiculares") seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración pretendida, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares. Las composiciones incluirán típicamente una cantidad efectiva de compuesto activo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo y, además, también pueden incluir cualquier material vehicular que se utilice habitualmente en las ciencias farmacéuticas. Dependiendo del modo de administración que se pretenda utilizar, las composiciones pueden estar en una
- 30 forma de dosificación sólida, semisólida o líquida, tal como, por ejemplo, inyectables, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de liberación prolongada, polvos, líquidos, suspensiones o similares, preferiblemente en dosificaciones unitarias.
- 35

- Las composiciones farmacéuticas convencionales que comprenden una cantidad farmacológicamente efectiva de un conjugado, p. ej., PEG IFN β , junto con vehículos, adyuvantes, diluyentes, conservantes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables se pueden usar en la práctica de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de interferón incluyen diluyentes de varios tampones (p. ej., arginina, Tris-HCl, acetato, fosfato) que tienen un rango de pH y fuerza iónica, vehículos (p. ej., albúmina de suero humano), solubilizantes (p. ej., tween, polisorbato) y conservantes (p. ej., alcohol bencílico). Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 4.496.537.
- 40

- La administración de los compuestos activos descritos en la presente memoria puede ser a través de cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes terapéuticos. Estos modos incluyen la administración sistémica o local, tal como los modos de administración oral, nasal, parenteral, transdérmica, subcutánea, o tópica.
- 45

- Por ejemplo, para la administración oral en la forma de un comprimido o cápsula (p. ej., una cápsula de gelatina), se puede combinar el componente de fármaco activo con un vehículo inerte, oral, no tóxico y farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar a la mezcla
- 50 aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azúcares, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como arábica, de tragacanto o alginato de sodio, polietilén glicol, ceras y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice,

- talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio, y/o polietilen glicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma de xantano, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes, y similares. Los diluyentes incluyen, p. ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina. Los conjugados de la descripción también se pueden administrar en formas de dosificación oral tales como comprimidos o cápsulas de liberación prolongada y liberación sostenida, píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden, por ejemplo, prepararse mediante disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o se mezcla con un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar, de esta manera, la disolución o suspensión inyectable. Además, se pueden formular formas sólidas adecuadas para disolverse en líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son preferiblemente disoluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.
- Los conjugados de la presente descripción se pueden administrar en forma intravenosa (p. ej., bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, en todos los casos utilizando las formas bien conocidas por los expertos en la técnica farmacéutica. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, como disoluciones o suspensiones líquidas.
- La administración parenteral inyectable se usa generalmente para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Por ejemplo, cuando se usa una inyección subcutánea para administrar 0,01-100 µg/kg, o más preferiblemente 0,01-10 µg/kg de IFN-beta PEGilado durante una semana, pueden administrarse dos inyecciones de 0,005-50 µg/kg, o más preferiblemente 0,005-5 µg/kg, respectivamente, a las 0 y 72 horas. Además, una estrategia para la administración parenteral emplea el implante de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, que asegura que se mantiene un nivel constante de dosificación, según la Patente de EE. UU. No. 3.710.795.
- Además, los conjugados preferidos para la presente descripción se pueden administrar en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o mediante rutas transdérmicas, utilizando esas formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Para ser administrada en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas incluyen cremas, ungüentos, lociones, aerosoles, pulverizadores y geles, en donde la cantidad administrada sería 10-100 veces la dosis administrada típicamente por administración parenteral.
- Para las composiciones sólidas, pueden usarse excipientes que incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. El compuesto activo definido anteriormente también se puede formular como supositorios usando, por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol, como vehículo. En algunas realizaciones, los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.
- Los conjugados de la presente descripción también se pueden administrar en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas realizaciones, una película de componentes de lípidos se hidrata con una disolución acuosa de un fármaco para formar una capa de lípido que encapsula el fármaco, como se describe en la Patente de EE. UU. No. 5.262.564.
- Los conjugados de la presente descripción también pueden administrarse mediante el uso de fusiones de inmunoglobulinas como vehículos individuales a los que se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos de la presente descripción también se pueden acoplar con polímeros solubles tales como vehículos de fármacos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietilspanamida-fenol o polietilénóxido-polilisina sustituido con residuos de palmitoilo. Los conjugados también se pueden acoplar a proteínas tales como, por ejemplo, proteínas receptoras y albúmina. Además, los compuestos de la presente descripción se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros reticulados o de bloque anfipáticos de hidrogeles.
- Si se desea, la composición farmacéutica que se va a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio, oleato de trietanolamina, etc.

El régimen de dosificación que utiliza los conjugados se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección que se va a tratar; la ruta de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo que se emplea. También se consideran la actividad de los compuestos de la descripción y la sensibilidad del paciente a los efectos secundarios. Un

5

Las dosificaciones orales de la presente descripción, cuando se usan para los efectos indicados, variarán de aproximadamente 0,01-100 µg/kg/día oralmente, o más preferiblemente 0,01-10 µg/kg/día oralmente. Las composiciones se proporcionan preferiblemente en la forma de comprimidos ranurados que contienen 0,5-5.000 µg o más preferiblemente

10

0,5-500 µg de ingrediente activo.

Para cualquier ruta de administración, se pueden usar dosis divididas o únicas. Por ejemplo, los compuestos de la presente descripción se pueden administrar diariamente o semanalmente, en una dosis única, o se puede administrar la dosificación total en dosis divididas de dos, tres, o cuatro.

15

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores puede contener 0,1-99 %, 1-70 %, o, preferiblemente, 1-50 % de los compuestos activos de la descripción como ingredientes activos.

20

Como se describió anteriormente, el curso de la enfermedad y su respuesta a los tratamientos farmacológicos pueden ser seguidos por un examen clínico y hallazgos de laboratorio. La eficacia de la terapia de la descripción está determinada por el grado en que se alivian los signos y síntomas de una afección descrita anteriormente, p. ej., hepatitis crónica, y por el grado en que se eliminan o reducen sustancialmente los efectos secundarios normales del interferón (es decir, síntomas similares a los de la gripe tales como fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, mialgias, fatiga, etc. y los síntomas relacionados con el sistema nervioso central tales como depresión, parestesia, alteración de la concentración, etc.).

25

Los interferones PEGilados se pueden usar para el tratamiento de afecciones que son susceptibles de tratamiento con interferón que son bien conocidas por el experto en la técnica usando modos de administración aceptados. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 8.017.733 que describe composiciones farmacéuticas, administración y tratamientos usando interferones PEGilados. Dichas afecciones incluyen, pero no están limitadas a, trastornos de la proliferación celular, en particular esclerosis múltiple, cáncer (p. ej., leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, carcinoma de células basales y melanoma maligno, cáncer de ovario, linfoma de células T cutáneo), infecciones o enfermedades virales, hepatitis C crónica. Las infecciones virales incluyen, pero no están limitadas a, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otras hepatitis no A/no B, virus del herpes, virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpes simple, virus del herpes humano tipo 6 (HHV-6), papiloma, poxvirus, picomavirus, adenovirus, rinovirus, virus linfotrópico humano T tipo 1 y 2 (HTLV-1/-2), rotavirus humano, rabia, retrovirus, incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), encefalitis e infecciones virales respiratorias. Por ejemplo, el PEG IFN purificado de la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG se usa para tratar la esclerosis múltiple, particularmente la esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR). La EMRR se caracteriza por ataques claramente definidos de empeoramiento de la función neurológica. Estos ataques - a menudo llamados recaídas, brotes o exacerbaciones - van seguidos de períodos de recuperación parcial o completa (remisiones), durante los cuales los síntomas mejoran parcial o completamente y no hay una progresión aparente de la enfermedad. La EMRR es el curso de la enfermedad más común en el momento del diagnóstico. Aproximadamente el 85 por ciento de las personas son diagnosticadas inicialmente con EMRR, en comparación con el 10-15 por ciento con formas progresivas de la enfermedad.

35

40

Se ha realizado un estudio de eficacia y seguridad de fase 3 del PEG IFN β-1a para el tratamiento de EMRR. Véase Calabresi et al., 2014, *Lancet Neurol* 13(7):657-665. En este estudio, investigadores de todo el mundo asignaron aleatoriamente a 1.512 personas con EM recidivante a uno de tres grupos: placebo, 125 µg de PEG IFN β-1a administrado por vía subcutánea (debajo de la piel) cada dos semanas, o 125 µg de PEG IFN β-1a administrado por vía subcutánea cada cuatro semanas. El objetivo primario del estudio fue determinar los efectos del fármaco frente al placebo sobre la

45

tasa de recaída anualizada después de 48 semanas. Los objetivos secundarios incluyeron los efectos sobre el daño del sistema nervioso central como se observa en los escaneos de MRI, y la progresión de la enfermedad según lo medido por la escala de discapacidad EDSS. Después del primer año, los participantes que recibieron placebo fueron reasignados para recibir PEG IFN β-1a cada dos o cuatro semanas, y los que ya estaban en terapia permanecieron en sus respectivos grupos.

50

Los resultados para el primer año del estudio mostraron que la tasa de recaída anualizada se redujo significativamente más que en el placebo, un 35,6 % en el grupo de dosificación de dos semanas, y un 27,5 % en el grupo de dosificación de cuatro semanas. Las nuevas lesiones (áreas de daño tisular) en los escaneos de MRI se redujeron un 67 % en el grupo de dosificación de dos semanas y un 28 % en el grupo de dosificación de cuatro semanas. El riesgo de progresión de la discapacidad (confirmado durante 12 semanas), medido por la escala EDSS, se redujo un 38 % en ambos grupos de PEG

55

IFN β-1a.

Por tanto, en una realización para el tratamiento de EMRR, se dosifica PEG IFN β -1a una vez cada 2 semanas y se administra por vía subcutánea con un autoinyector o una jeringa precargada. Una dosis recomendada de PEG IFN β -1a es de 125 μ g cada 14 días. Se recomienda que los pacientes comiencen el tratamiento con 63 μ g el día 1. El día 15, la dosis se aumenta a 94 μ g, alcanzando la dosis completa de 125 μ g el día 29.

5 Ejemplos

La presente invención se describe con referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Se utilizaron técnicas estándar bien conocidas en la técnica o las técnicas descritas específicamente a continuación.

Ejemplo 1

10 Reacción de PEGilación

El IFN β -1a purificado producido de forma recombinante en un combinado de ultrafiltración se transfiere a un recipiente de reacción de acero inoxidable cerrado con camisa protectora y la temperatura se lleva a 18 °C - 26 °C bajo mezclado constante. El volumen diana es 21L - 22,5L. Se prepara una disolución madre de mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa en acetato, tampón Bis-Tris y se añade al IFN β -1a a una concentración diana de 4,5 mg/mL de mPEGO-2-metilpropionaldehído activo de 20 kDa. El pH diana de la reacción de acoplamiento es pH 5. A pH 5, la química de aminación reductora ocurre selectivamente en el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal porque está significativamente menos protonado que el grupo α -amino de los residuos de lisina. Después del mezclado, se añade una disolución madre del catalizador de ácido de Lewis a la mezcla de reacción hasta una concentración diana de 1 mM. A continuación, se añade el reductor suave NaCNBH₃ como una disolución madre (con mezclado constante) a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 20 mM durante un período de 1 hr. La reducción con NaCNBH₃ da como resultado un enlace C-N covalente estable entre el mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa y la proteína. Se aplica un recubrimiento de argón durante el procedimiento de acoplamiento para barrer cualquier gas de hidrógeno y cianuro de hidrógeno que pueda desprenderse. La mezcla de reacción se incuba durante 5-9 horas seguido de la adición de una disolución madre de arginina hasta una concentración final de 100 mM. El exceso de arginina para la reacción al reaccionar con el mPEG-O-2-metilpropionaldehído de 20 kDa activo remanente para formar una mPEG-O-2-metilpropionilarginina de 20 kDa, que se elimina posteriormente mediante cromatografía de intercambio catiónico SE HiCap. La mezcla de reacción parada se retiene hasta 48 horas antes del procesamiento adicional.

Ejemplo 2

Reacción de PEGilación

30 Se repite el Ejemplo 1 excepto que el combinado de ultrafiltración se almacenó congelado antes de ejecutar la reacción de acoplamiento de PEG. Las botellas se descongelan a temperatura ambiente, se combinan en el mismo recipiente de reacción y se llevan a temperatura ambiente.

Se debe interpretar que el uso de los términos "un", y "una", y "el/la" y los referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) incluye tanto el singular como el plural, a no ser que se indique de otra forma en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. Se debe considerar que las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" son expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a no ser que se indique de otra forma. Se pretende que la mención de rangos de valores en la presente memoria sirva solamente como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentra en el rango, a no ser que se indique de otra forma en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. Por ejemplo, si se describe el rango 10-15, también se describen 11, 12, 13 y 14, así como cualquier fracción en el mismo. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria o que se contradiga de otro modo claramente por el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o las expresiones ejemplares (p. ej., "tal como") que se proporcionan en la presente memoria, ilumine mejor la invención y no presente una limitación en el alcance de la invención a no ser que se reivindique de otra forma. No se debe considerar ninguna expresión de la memoria descriptiva como una indicación de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para acoplar PEG a IFN β que comprende las siguientes etapas:

(a) añadir PEG activado a una disolución de IFN β purificado en un recipiente de reacción para formar una mezcla de PEG activado e IFN β , en donde la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de 1,75 mg/ml a 3,3 mg/ml y una temperatura de 2 °C a 30 °C, en donde la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG activado a IFN β en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 1:1 a 20:1 y en donde el pH de la mezcla es de 4,0 a 6,0;

(b) opcionalmente añadir un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla, en donde la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 0,1 mM a 2,2 mM;

(c) añadir NaCNBH₃ a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de 5 minutos a 600 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH₃ añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH₃ en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 15 mM a 25 mM; y

(d) después de la etapa (c), incubar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG durante 10 minutos a 24 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β .

2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción, opcionalmente en donde la reacción de acoplamiento de PEG se para por la adición de arginina, y opcionalmente en donde la cantidad de arginina en la mezcla de reacción parada es de 25 mM a 250 mM.

3. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la mezcla en la etapa de parada se recubre con un gas inerte, opcionalmente en donde la tasa de recubrimiento de gas inerte es de 10 LPM.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en donde la reacción de acoplamiento de PEG parada se retiene durante hasta 48 horas a 2 °C a 30 °C antes de purificar el mono-PEG IFN β .

5. El proceso de la reivindicación 1, en donde:

(a) la disolución de IFN β purificado tiene una concentración de IFN β de 1,75 mg/ml a 3,3 mg/ml y una temperatura de 19 °C a 27 °C, y la cantidad de PEG activado añadida es suficiente para proporcionar una relación molar de PEG activado a IFN β en una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 1:1 a 5:1 y en donde el pH de la mezcla es de 4,8 a 5,2;

(b) la cantidad de catalizador de ácido de Lewis cuando se añade opcionalmente es suficiente para proporcionar una concentración de catalizador de ácido de Lewis en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 0,78 mM a 1,2 mM;

(c) el NaCNBH₃ se añade a la mezcla para formar la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG con agitación durante un período de 45 minutos a 240 minutos, en donde la cantidad de NaCNBH₃ añadida es suficiente para proporcionar una concentración de NaCNBH₃ en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de 15 mM a 25 mM; y

(d) la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG se incuba durante 5 horas a 9 horas para producir preferentemente mono-PEG IFN β .

6. El proceso de la reivindicación 5, que comprende además parar la reacción de acoplamiento de PEG para detener la reacción, opcionalmente en donde la reacción de acoplamiento de PEG se para por la adición de arginina, y opcionalmente en donde la cantidad de arginina en la mezcla de reacción parada es de 50 mM a 150 mM, preferiblemente de 75 mM a 125 mM, más preferiblemente 100 mM.

7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde:

(i) la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es de 2,4 mg/ml a 3,3 mg/ml, preferiblemente 2,9 mg/ml a 3,3 mg/ml, más preferiblemente 3,3 mg/ml;

(ii) la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de 1,5:1 a 5:1, preferiblemente de 1,5:1 a 2:1, más preferiblemente 1,5:1;

(iii) la concentración de catión de cinc en la reacción de acoplamiento de PEG es de 0,9 mM a 1,1 mM, preferiblemente de 0,95 mM a 1,05 mM, más preferiblemente 1,0 mM;

(iv) la concentración de NaCNBH₃ en la reacción de acoplamiento de PEG es de 18 mM a 22 mM, preferiblemente 20 mM;

- (v) la relación molar de PEG activado a IFN β en la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG es de 1,5:1 a 5:1, preferiblemente de 1,5:1 a 2:1, más preferiblemente 1,5:1;
- (vi) la temperatura es de 21 °C a 25 °C, preferiblemente de 22 °C a 24 °C, más preferiblemente 23 °C; y/o
- (vii) el pH es de 4,9 a 5,1, preferiblemente 5,0.
- 5 8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde la reacción de acoplamiento de PEG parada se retiene durante hasta 48 horas a 2 °C a 25 °C antes de purificar el mono-PEG IFN β .
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde se añade un catalizador de ácido de Lewis a la mezcla de reacción, opcionalmente en donde el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el IFN β es IFN β -1a.
- 10 11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el PEG es mPEG, opcionalmente en donde el mPEG es mPEG-O-2-metilpropionaldehído.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde:
- (i) el IFN β se lleva a dicha temperatura antes de añadirlo al recipiente de reacción; o
- (ii) el IFN β se añade al recipiente de reacción y después se lleva a dicha temperatura.
- 15 13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde las mezclas en las etapas (a) - (d) se recubren con un gas inerte, opcionalmente en donde la tasa de recubrimiento del gas inerte es de 3-5 LPM para las etapas (a) y (b) y es de 10 LPM para las etapas (c) y (d).
- 20 14. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-13, en donde el pH es 5,0, la temperatura es 23 ° C, la concentración de IFN β en la disolución de IFN β purificado es 3,3 mg/ml, la relación molar de PEG activado a IFN β es 1,5:1 y la concentración de NaCNBH₃ en la reacción de acoplamiento de PEG es 20 mM, opcionalmente en donde el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc a una concentración en la reacción de acoplamiento de PEG de 1,0 mM.
15. El proceso de la reivindicación 14, en donde la reacción de acoplamiento de PEG se para por la adición de arginina a la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG a una concentración de 100 mM en la mezcla de reacción parada.
- 25 16. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, en donde las mezclas en las etapas (a) - (d) se recubren con un gas inerte a una tasa de recubrimiento de gas inerte de 3-5 LPM para las etapas (a) y (b) y de 10 LPM para las etapas (c) y (d).
- 30 17. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el mono-PEG IFN β se formula en una composición farmacéutica, opcionalmente en donde la composición farmacéutica comprende además vehículos, adyuvantes, diluyentes, conservantes y/o solubilizantes farmacéuticamente aceptables.
18. El proceso de la reivindicación 17, en donde (a) dicho solubilizante se selecciona de tween o polisorbato; y/o (b) dicho diluyente comprende un tampón, opcionalmente seleccionado entre arginina, Tris-HCl, acetato o fosfato.
19. Una mezcla de reacción de acoplamiento de PEG que comprende los siguientes elementos:
- (a) IFN β a una concentración de 1,5 mg/ml a 2,8 mg/ml;
- 35 (b) PEG activado en una relación molar de PEG activado a IFN β de 1:1 a 20:1; y
- (c) NaCNBH₃ a una concentración de 15 mM a 25 mM,
- en donde el pH de la mezcla de reacción de PEG es de 4,0 a 6,0.
20. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de la reivindicación 19, que comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de 0,1 mM a 2,2 mM, opcionalmente en donde el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc.
- 40 21. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 19-20, que comprende además arginina a una concentración en la mezcla de reacción de 25 mM a 200 mM.

22. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de las reivindicaciones 19-21, en donde se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG.

23. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de la reivindicación 19, en donde:

5 (a) el IFN β está a una concentración de 2,0 mg/ml a 2,8 mg/ml, más preferiblemente 2,5 mg/ml a 2,8 mg/ml, aún más preferiblemente 2,8 mg/ml;

(b) el PEG activado está a una relación molar de PEG activado a IFN β de 1:1 a 5:1, preferiblemente de 1,5:1 a 5:1, más preferiblemente de 1,5:1 a 2:1, aún más preferiblemente 1,5:1; y;

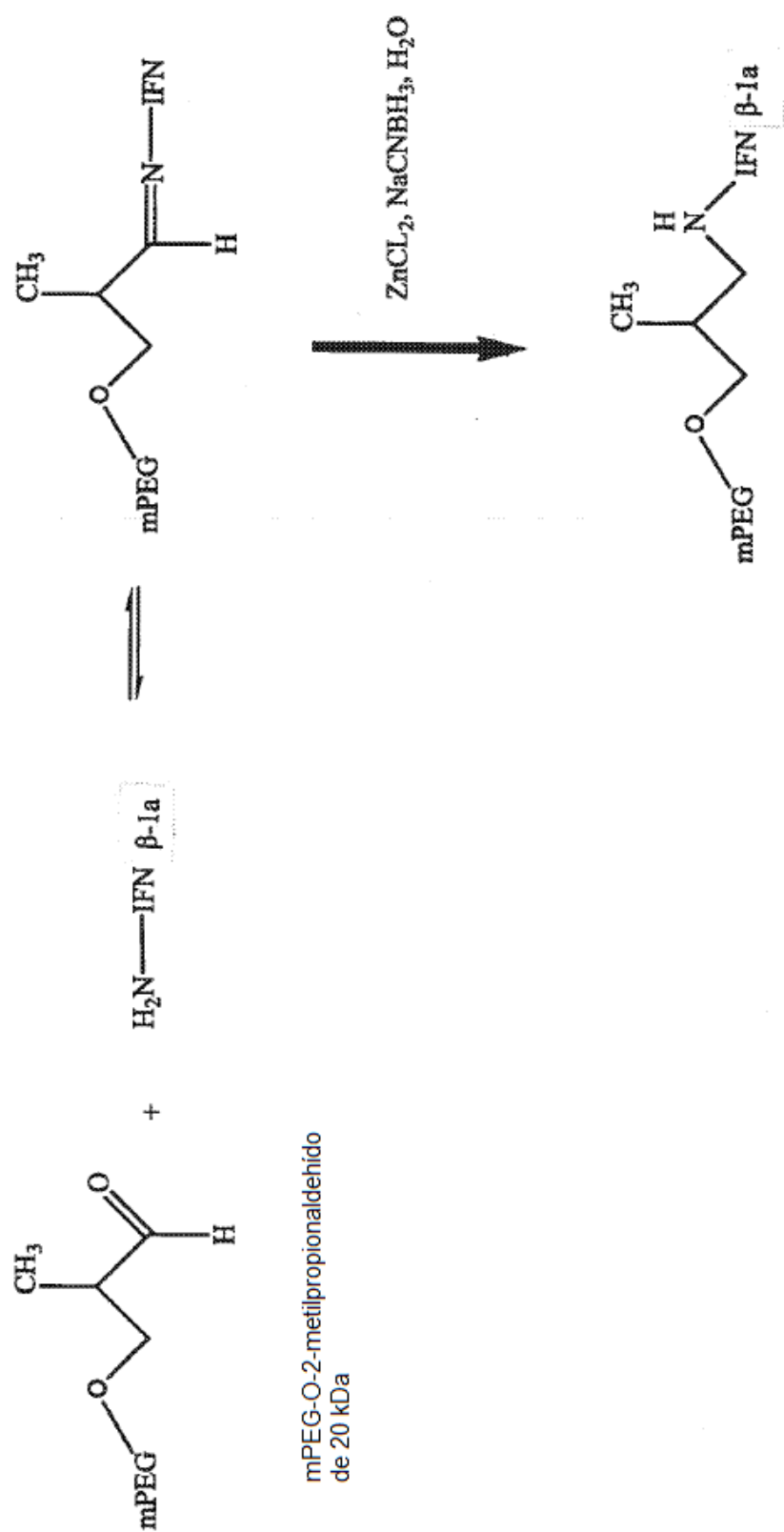
(d) el NaCNBH_3 está a una concentración de 18 mM a 22 mM, más preferiblemente 20 mM,

en donde el pH de la mezcla de reacción de PEG es de 4,8 a 5,2, preferiblemente de 4,9 a 5,1, más preferiblemente 5,0.

10 24. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de la reivindicación 23, que comprende además un catalizador de ácido de Lewis a una concentración de 0,78 mM a 1,2 mM, preferiblemente de 0,9 mM a 1,1 mM, más preferiblemente de 0,95 mM a 1,05 mM, aún más preferiblemente 1,0 mM, opcionalmente en donde el catalizador de ácido de Lewis es un catión de cinc.

15 25. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 23-24, que comprende además arginina a una concentración en la mezcla de reacción de 50 mM a 150 mM, preferiblemente de 75 mM a 125 mM, más preferiblemente 100 mM.

26. La mezcla de reacción de acoplamiento de PEG de una cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en donde se para la mezcla de reacción de acoplamiento de PEG.



FIGURA