

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 323**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/18** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08784775 .2**

96 Fecha de presentación: **15.07.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2178900**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54 Título: **Purificación de polipéptidos pegilados**

30 Prioridad:  
**17.07.2007 EP 07013959**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.08.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
GRENZACHERSTRASSE, 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**BURG, Josef;  
REICHERT, Klaus;  
SCHROTH, Axel;  
SCHURIG, Hartmut y  
WESSNER, Axel**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

**ES 2 386 323 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

Purificación de polipéptidos pegilados

- 5 La presente invención pertenece al área de los métodos de separación cromatográficos útiles para la purificación de polipéptidos, especialmente de eritropoyetina PEGilada.

Antecedentes de la invención

- 10 Las proteínas juegan un importante papel en el portafolio de la medicina actual. Para su aplicación en humanos, cada proteína terapéutica debe cumplir distintos criterios. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en humanos, deben eliminarse especialmente los subproductos que se acumulan durante el proceso de producción. Para cumplir las especificaciones regulatorias, el proceso de fabricación debe continuarse con uno o más pasos de purificación. Entre otros, la pureza, la eficiencia y el rendimiento juegan un importante papel  
15 en la determinación de un proceso de purificación apropiado.

- Se utilizan diferentes métodos bien establecidos y extendidos para la purificación de proteínas, como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo intercambio catiónico (resinas de sulfopropilo o carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio iónico de modo mixto), cromatografía de adsorción tiofílica (por ejemplo con betamercaptoetanol y otros ligandos SH), interacción hidrofóbica o adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenoflicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (por ejemplo con material de afinidad al Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos (como la electroforesis en gel o electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

- Se han descrito conjugaciones, por ejemplo, de polietilenglicol (PEG) e interleuquina-6 (PE 0 442 724), de PEG y eritropoyetina (WO 01/02017), de moléculas químicas que comprenden endostatina e inmunoglobulinas (US 2005/008649), de proteínas de fusión basadas en anticuerpos secretadas (US 2002/147311), de polipéptidos de fusión que comprenden albúmina (US 2005/0100991; albúmina sérica humana US 5.876.969), de polipéptidos pegilados (US 2005/0114037), y de fusiones de interferón.

- Necina, R., et al. (Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698) describieron la captura de anticuerpos monoclonales humanos directamente de sobrenadantes de cultivo celular mediante un medio de intercambio iónico que muestra una elevada densidad de carga. En la WO 89/05157 se describe un método para la purificación de un producto de inmunoglobulinas sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. En Danielsson, A., et al., J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88 se describe una purificación en un solo paso de anticuerpos IgG monoclonales a partir de ascites de ratón. En la WO 2004/024866 se describe un método para la purificación de un polipéptido mediante una cromatografía de intercambio iónico en la que se utiliza un lavado en gradiente para separar un polipéptido de interés de entre uno o más contaminantes. En la PE 0 530 447 se describe un proceso de purificación de anticuerpos IgG monoclonales mediante una combinación de tres pasos de cromatografía. Una purificación fácil de un antagonista del receptor de la interleuquina-1 monopegilado se describe en Yu, G., et al., en Process Biotechnol. 42 (2007) 971-977. Wang et al. (Wang, H., et al., Péptidos 26 (2005) 1213-1218) describe la purificación de hTFF3 expresado en E.coli mediante una cromatografía de intercambio de cationes en dos pasos. Yun et al. (Yun, Q., et al., J. Biotechnol. 118 (2005) 67-74) describe la purificación de rhG-CSF pegilado mediante dos pasos de cromatografía de intercambio de iones consecutivos. La WO 2007/039436 y WO 01/087329 describen la unión covalente de la eritropoyetina a grupos polietilenglicol y una composición farmacéutica líquida que comprende una proteína eritropoyetina.

- 50 En Current Protocols in Molecular Biology, Unidad 10.10 (aportado por Williams, A. y Frasca, V., John Wiley& Sons, Inc., Print ISSN: 1934-3639 (1998)) y en Current Protocols in Protein Science, Unidad 8.2 (aportado por Williams, A. y Frasca, John Wiley&Sons, Inc., Print ISSN:1934-3655 (1999)) se describe la planificación y la realización de una cromatografía de intercambio iónico para separar proteínas.

- 55 En la descripción técnica "Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods" (1994) de Pharmacia Biotech se describe la elección del tipo de gradiente.

- Goding, J.W., describe en "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" en la sección 4.2.4 (2ª edición, Adademic Press, ISBN:0-12-287021-2 (1986)) que la cromatografía de intercambio iónico es una manera útil de purificar inmunoglobulinas, especialmente IgG.

Resumen de la invención

- 65 La presente invención comprende un método para la purificación de una eritropoyetina monopegilada que comprende los pasos para proporcionar una solución que comprende eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada, en el que se realizan dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes, y una

recuperación de eritropoyetina monopegilada purificada en el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes, en el que se utiliza el mismo tipo de material de intercambio de cationes en ambos pasos de cromatografía de intercambio de cationes.

- 5 En una realización del método los dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes se realizan utilizando diferentes métodos de elución. En otra realización, los dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes comprenden los siguientes pasos:
- 10 a) aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una mezcla de eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada en una primera columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monopegilada al material de intercambio de cationes que contiene dicha primera columna,
- 15 b) recuperar la eritropoyetina monopegilada de la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución por pasos con un aumento en cada paso de la fuerza iónica del tampón de elución, de forma que la fracción de dicha eritropoyetina monopegilada aumenta comparado con la mezcla aplicada en el paso a),
- 20 c) aplicar la eritropoyetina monopegilada recuperada en una segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monopegilada al material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna, siendo el material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna del mismo tipo que el material de intercambio de cationes en la primera columna,
- 25 d) recuperar la eritropoyetina monopegilada purificada en forma sustancialmente homogénea de dicha segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución continuo con un aumento continuo de la fuerza iónica del tampón de elución.

En una realización del método, el material de intercambio de cationes es un material de intercambio de cationes fuerte. En una realización preferible, el material de intercambio de cationes fuerte es un material de intercambio de cationes de sulfopropilo. Es especialmente preferible el Toyopearl® SP 650 M. En otra realización, la eritropoyetina monopegilada se recupera en el paso d) en forma sustancialmente homogénea de una pureza de más de 95% en área. En otra realización del método el aumento por pasos de la fuerza iónica del paso b) del método es un aumento de la fuerza iónica en dos pasos. Preferiblemente, la eritropoyetina monopegilada se recupera en el segundo paso de método de elución en pasos, es decir tras el segundo aumento en la fuerza iónica.

35 Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción de una eritropoyetina monopegilada que comprende los siguientes pasos:

- 40 a) PEGilar la eritropoyetina utilizando un reactivo de PEGilado,
- b) purificar la eritropoyetina pegilada con dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes, en los que en la primera y segunda cromatografía de intercambio de cationes se emplea el mismo tipo de material de intercambio de cationes,
- 45 c) recuperar la eritropoyetina monopegilada de la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes en una forma sustancialmente homogénea.

#### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención comprende un método para la purificación de una eritropoyetina monopegilada que comprende dos pasos de cromatografía de intercambio de cationes, en los que se utiliza el mismo tipo de material de intercambio de cationes en ambos pasos de cromatografía de intercambio de cationes.

55 El término "material de intercambio iónico" como se utiliza en esta solicitud indica una matriz de elevado peso molecular inmovilizada que contiene sustituyentes cargados unidos de forma covalente que se utiliza como fase estacionaria en una cromatografía de intercambio iónico. Para conseguir una carga total neutra, se unen contraiones a este material de forma no covalente. El "material de intercambio iónico" tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos de forma covalente por iones de carga similar de la solución que lo rodea. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, la "resina de intercambio iónico" se denomina resina de intercambio de cationes o resina de intercambio de aniones. Dependiendo de la naturaleza del grupo cargado (sustituyente), la

60 "resina de intercambio iónico" se denomina, por ejemplo, en el caso de las resinas de intercambio de cationes, resina de ácido sulfónico (S), resina de sulfopropilo (SP) o resina de carboximetilo (CM). Dependiendo de la naturaleza química del grupo/ sustituyente cargado, la "resina de intercambio iónico" puede clasificarse adicionalmente como una resina de intercambio iónico fuerte o débil, dependiendo de la fuerza del sustituyente cargado unido covalentemente. Por ejemplo, las resinas de intercambio de cationes fuertes poseen un grupo de ácido sulfónico, preferiblemente un grupo sulfopropilo, como sustituyente cargado, y las resinas de intercambio de

65

cationes débiles poseen un grupo carboxílico, preferiblemente un grupo carboximetilo, como sustituyente cargado, y las resinas de intercambio de aniones débiles poseen un grupo dietilaminoetilo como sustituyente cargado.

5 Hay disponibles diferentes tipos de materiales de intercambio iónico, es decir fases estacionarias, bajo diferentes nombres y de una multitud de compañías como por ejemplo el material de intercambio de cationes Bio-Rex® (por ejemplo tipo 70), Chelex® (por ejemplo tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo tipo 50W, MP) todos ellos disponibles en BioRad laboratories, WCX 2 disponible en Ciphergen, Dowex® MAC-3 disponible en Dow chemical company, Mustang C y Mustang S disponible en Pall Corporation, celulosa CM (por ejemplo tipo 23, 52), hyper-D y partisphere disponibles en Whatman plc., Amberlite® IRC (por ejemplo tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo tipo SP, CM, 650M) todos ellos disponibles en Tosoh Bioscience GmbH, CM 1500 y CM 3000 disponibles en BioChrom Labs, SP-Sepharose™, CM-Sepharose™ disponibles en GE Healthcare, las resinas Poros disponibles en PerSeptive Biosystems, Asahipak ES (por ejemplo tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo tipo 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (por ejemplo tipo 420N, 825), IEC QA (por ejemplo tipo LG, 825) disponibles en Shoko America Inc., resina de intercambio de cationes 50W disponible en Eichrom Technologies Inc. Preferiblemente el material de intercambio de cationes es un material fuerte de intercambio de cationes como Macro-Prep® High S o 25S, MacroCap SP, Toyopearl® SP 650M, Source S, SP Sepharose o POLYCAT A. Son materiales de intercambio de aniones de ejemplo el Dowex® 1 disponible en Dow chemical company, AG® (por ejemplo tipo 1, 2, 4), Bio-Rex® 5, DEAE Bio-Gel 1 y Macro-Prep® DEAE, todos ellos disponibles en BioRad Laboratories, resina de intercambio de aniones tipo 1 disponible en Eichrom Technologies Inc., Source Q, ANX Sepharose 4, DEAE Sepharose (por ejemplo tipo CL-6B, FF), Q Sepharose, Capto Q y Capto S, todos ellos disponibles en GE Healthcare, AX-300 disponible en PerkinElmer, Asahipak ES-502C, AXpak WA (por ejemplo tipo 624, G) e IEC DEAE, todos ellos disponibles en Shoko America Inc., Amberlite® IRA-96, Toyopearl® DEAE y TSKgel DEAE, todos ellos disponibles en Tosoh Bioscience GmbH, y Mustang Q disponible en Pall Corporation. En una realización, el material de intercambio de cationes es un material de intercambio de cationes de sulfopropilo.

El término "el mismo tipo de material de intercambio de cationes" indica dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio iónico que se realizan utilizando un material de intercambio de cationes idéntico. Esto significa que los pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes se realizan utilizando una primera porción de material de intercambio de cationes para el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes y utilizando una segunda porción del mismo material de intercambio de cationes para el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes o utilizando el mismo material de intercambio de cationes para ambos pasos de cromatografía de intercambio de cationes. En una realización, el segundo material de intercambio de cationes es el mismo tipo de material de intercambio de cationes pero no la misma fracción de material de intercambio de cationes que el primer material de intercambio de cationes.

Los términos "elución en pasos" y "método de elución en pasos", que se utilizan de forma intercambiable en esta solicitud, indican un método en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que causa la elución, es decir la disolución de un compuesto unido a un material, se aumenta o disminuye de golpe, es decir directamente de un valor/ nivel al siguiente valor/ nivel. En esta "elución en pasos" se cambian una o más condiciones, por ejemplo el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de la cromatografía, de una vez a partir de un primer valor de partida, por ejemplo, a un segundo valor, por ejemplo, final, es decir las condiciones se cambian por incrementos, es decir por pasos, en contraste con un cambio lineal. En el "método de elución en pasos" se recoge una nueva fracción tras cada aumento en la fuerza iónica. Esta fracción contiene los compuestos recuperados del material de intercambio iónico con el aumento correspondiente de la fuerza iónica. Tras cada aumento, las condiciones se mantienen hasta el siguiente paso en el método de elución. En la "elución en pasos" se cambian una o más condiciones de una vez a partir de un primer valor, por ejemplo de partida, a un segundo valor, por ejemplo, el final. En una realización el cambio es del 10% o más de la concentración de la sustancia que causa la elución. En esta realización, la concentración de la sustancia que causa la elución es del 100% en el primer paso, del 110% o más en el segundo paso, y del 120% o más en el tercer paso. En otra realización, el cambio es del 50% o más de la concentración de la sustancia que causa la elución. En otra realización, el cambio es del 120% o más de la concentración de la sustancia que causa la elución. "Elución en pasos" indica que las condiciones se cambian por incrementos, es decir por pasos, en contraste con el cambio lineal.

Los términos "elución continua" y "método de elución continua", que se utilizan de forma intercambiable en esta solicitud, indica un método en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que causa la elución, es decir, la disolución de un compuesto unido/ adsorbido de un material cromatográfico, se aumenta o disminuye de forma continua, es decir la concentración se modifica mediante una secuencia de pequeños pasos, y cada uno de ellos no es superior a un cambio del 2%, preferiblemente del 1% de la concentración de la sustancia que causa la elución. En esta "elución continua", pueden modificarse una o más condiciones, por ejemplo el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de una cromatografía, de forma lineal, exponencial o asintótica. Preferiblemente el cambio es lineal.

El término "aplicar en" y los equivalentes gramaticales del mismo, tal y como se utilizan en esta solicitud indica un paso parcial de un método de purificación en el que una solución que contiene una sustancia de interés a purificar se pone en contacto con una fase estacionaria. esto indica que a) la solución se añade a un dispositivo de

5 cromatografía en el que se encuentra situada la fase estacionaria, o b) que una fase estacionaria se añade a la solución. En el caso a), la solución que contiene la sustancia de interés a purificar pasa a través de la fase estacionaria permitiendo la interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Dependiendo de las condiciones, como por ejemplo el pH, conductividad, concentración de sales, temperatura y/o tasa de flujo, algunas sustancias de la solución se unen a la fase estacionaria y así se eliminan de la solución. Otras sustancias permanecen en la solución. Las sustancias que permanecen en solución pueden encontrarse en el flujo no retenido. El "flujo no retenido" indica la solución obtenida tras el paso por el dispositivo de cromatografía, que puede ser la solución aplicada que contiene la sustancia de interés o el tampón, que se utiliza para lavar la columna o para causar la elución de una o más sustancias unidas a la fase estacionaria. En una realización, el dispositivo de cromatografía es una columna o un casete. La sustancia de interés puede recuperarse de la solución tras el paso de purificación mediante métodos familiares para el experto en la materia, como por ejemplo la precipitación, desplazamiento con sales, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad o reducción del volumen de solvente para obtener la sustancia de interés en forma sustancialmente homogénea. En el caso b), se añade la fase estacionaria, por ejemplo como un sólido, a la solución que contiene la sustancia de interés a purificar, lo que permite la interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Tras la interacción, la fase estacionaria se elimina, por ejemplo mediante filtración, y la sustancia de interés se une entonces a la fase estacionaria y se elimina junto con ella de la solución o no se une a la fase estacionaria y permanece en la solución.

20 El término "bajo condiciones adecuadas para la unión" y los equivalentes gramaticales del mismo como se utiliza en esta solicitud indica que una sustancia de interés, por ejemplo la eritropoyetina pegilada, se une a una fase estacionaria cuando se pone en contacto con ésta, por ejemplo un material de intercambio iónico. Esto no indica necesariamente que el 100% de la sustancia de interés esté unida pero que esencialmente el 100% de la sustancia de interés está unida, es decir al menos el 50% de la sustancia de interés está unida, al menos el 75% de la sustancia de interés está unida, al menos el 85% de la sustancia de interés está unida, o más del 95% de la sustancia de interés está unida a la fase estacionaria.

30 El término "tamponado" como se utiliza en esta solicitud indica una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas son equilibrados por la sustancia tampón. Puede utilizarse cualquier sustancia tampón que resulte en este efecto. Preferiblemente se utilizan sustancias tampón aceptables a nivel farmacéutico, como por ejemplo ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfolina, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma, o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo. En una realización, se utiliza como sustancia tampón el ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, o sales del mismo, o histidina o sales de la misma. Opcionalmente la solución tamponada puede comprender una sal adicional, como por ejemplo el cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, citrato sódico o citrato potásico.

40 Los métodos generales de cromatografía y su utilización son conocidos para el experto en la materia. Véase por ejemplo, *Chromatography*, 5ª edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (Ed.), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deil, Z. (Ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Holanda, (1998); *Chromatography Today*, Poole, C. F., y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice* (1982); *Sambrook, J., et al. (Ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M., et al. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York.

50 La PEGilación de la eritropoyetina normalmente resulta en una mezcla de diferentes compuestos, como la eritropoyetina polipegilada, eritropoyetina monopegilada, eritropoyetina no pegilada, productos de hidrólisis del éster de PEG activado, por ejemplo los ácidos pegilados libres, así como los productos de hidrólisis de la eritropoyetina en sí misma. Para obtener una eritropoyetina monopegilada en forma sustancialmente homogénea, estas sustancias deben separarse y el compuesto de interés debe ser purificado.

55 Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención proporcionar un método para obtener una eritropoyetina monopegilada en una forma sustancialmente homogénea que comprende los siguientes pasos:

a) PEGilar la eritropoyetina utilizando un reactivo de pegilado activado de un peso molecular de entre 20 kDa y 40 kDa,

60 b) purificar la eritropoyetina pegilada obtenida en el paso a) con dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes, en los que en el primer y segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes se emplea el mismo tipo de material de intercambio de cationes,

65 c) recuperar la eritropoyetina monopegilada de la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes en una forma sustancialmente homogénea.

Este método es especialmente útil para la purificación de polipéptidos recombinantes pegilados, que están glucosilados, es decir que han sido producidos por una célula de mamífero, preferiblemente una célula CHO, célula HEK293, célula BHK, célula Per.C6® o célula HeLa y a continuación se han PEGilado químicamente.

5 En el primer paso del método la eritropoyetina se PEGila. Las moléculas de polímero de poli(etilenglicol) (PEG) se utilizan en la reacción de PEGilado tienen un peso molecular de entre alrededor de 20 kDa y 40 kDa (por "peso molecular" como aquí se utiliza debe entenderse el peso molecular medio del PEG, ya que el PEG como compuesto polimérico no se obtiene con un peso molecular definido pero de hecho posee una distribución de peso molecular; el término "alrededor" indica que en dichas preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán más y algunas menos  
10 que el peso molecular indicado, es decir el término alrededor se refiere a una distribución de peso molecular en la que el 95% de las moléculas de PEG poseen un peso molecular dentro del +/- 10% del peso molecular indicado. Por ejemplo, un peso molecular del 30 kDa indica un rango de entre 27 kDa y 33 kDa).

15 El término "eritropoyetina" se refiere a la proteína con la secuencia del Id. de Sec. N°:1 o Id. de Sec. N°:2, o una proteína o polipéptido sustancialmente homólogo de estos, cuyas propiedades biológicas están relacionadas con la estimulación de la producción de hematíes y la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. La eritropoyetina recombinante puede prepararse mediante la expresión en células eucariotas, por ejemplo en células CHO o células BHK, o células HeLa mediante la tecnología de DNA recombinante o mediante activación de genes endógenos. Por ejemplo la glucoproteína eritropoyetina se expresa mediante la activación génica endógena como se describe en las patentes US 5.733.761, US 5.641.670, US 5.733.746, WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955. En una realización, la eritropoyetina de acuerdo con la invención se basa en la secuencia de la EPO humana. En otra realización, la eritropoyetina humana posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1 o Id. de Sec. N°: 2, preferiblemente la eritropoyetina humana posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1. El término "eritropoyetina" también indica las variantes de la proteína de Id. de Sec. N°: 1 o Id. de Sec. N°: 2, en el que uno o más residuos de aminoácido se han modificado, delecionado o insertado, y que poseen la misma actividad biológica que la proteína no modificada, como por ejemplo la que se describe en la PE 1 064 951, o US 6.583.272. Una variante puede poseer la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana con entre 1 y 6 puntos adicionales de glucosilación. La actividad específica de la eritropoyetina pegilada puede determinarse  
25 mediante varios ensayos conocidos en la materia. La actividad biológica de la eritropoyetina pegilada purificada de esta invención es tal, que la administración de la proteína mediante inyección a pacientes humanos resulta en un aumento de la producción celular de la médula ósea de reticulocitos y hematíes comparado con los sujetos no inyectados o los grupos control. La actividad biológica de la eritropoyetina pegilada obtenida y purificada de acuerdo con esta invención puede probarse mediante métodos de acuerdo con el capítulo específico de la farmacopea europea Eritropoyetina BRP Bio 1997(2).  
30  
35

El "PEG" o "grupo PEG" de acuerdo con la invención significa un residuo que contiene polietilenglicol como parte esencial. Tal PEG puede contener grupos químicos adicionales que son necesarios para la reacción de unión, es decir de conjugación, que resultan de la síntesis química de la molécula, o que son un espaciador para la distancia óptima de partes de la molécula. Estos grupos químicos adicionales no se utilizan para el cálculo del peso molecular de la molécula de polímero PEG. Además, tal PEG puede consistir en uno o más cadenas laterales de PEG, que están unidas entre ellas. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG multibrazo o ramificados. Los PEG ramificados pueden prepararse, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a varios polioles, lo que incluye glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, las patentes PE 0 473 084, US 5.932.462. En una realización, se utiliza como PEG moléculas de PEG lineal con un peso molecular de 20-35 kDa y como polímeros de PEG se utilizan moléculas de PEG ramificado con un peso molecular de más de 35 kDa, especialmente de 40 kDa. En una realización se utiliza como PEG un PEG de dos brazos de 40 kDa.  
40  
45

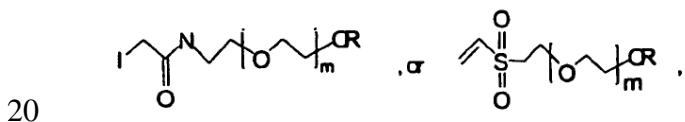
50 El término "PEGilación" significa un enlace covalente de un residuo de polietilenglicol en el extremo N-terminal del polipéptido y/o un residuo de lisina interna. La PEGilación de proteínas es ampliamente conocida en el estado de la materia y ha sido revisada, por ejemplo en Veronese, F.M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. El PEG puede unirse utilizando diferentes grupos funcionales y polietilenglicoles con diferentes pesos moleculares, PEG lineales y ramificados así como diferentes grupos de unión (véase también Francis, G.E., et al., *Int. J. Hematol.* 68 (1998) 1-18; Delgado, C., et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9 (1992) 249-304). La PEGilación de la eritropoyetina puede realizarse en solución acuosa con reactivos de PEGilación como se describen, por ejemplo, en la WO 00/44785, en una realización, utilizando moléculas de PEG lineal o ramificado activadas con NHS de un peso molecular de entre 5 kDa y 40 kDa. La PEGilación también puede realizarse en fase sólida de acuerdo con Lu, Y., et al., *Reactive Polymers* 22 (1994) 221-229. También pueden obtenerse polipéptidos pegilados en el extremo N-terminal de forma dirigida de acuerdo con la WO 94/01451.  
55  
60

Tales métodos resultan en una eritropoyetina que está pegilada en uno o más grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos lisina y/o en el grupo amino N-terminal. La PEGilación en el aminoácido N-terminal puede realizarse de acuerdo con Felix, A.M., et al., *ACS Symp. Ser.* 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238. La PEGilación selectiva N-terminal puede realizarse durante la síntesis en fase sólida mediante el acoplamiento de un derivado de aminoácido N $\alpha$ -pegilado al aminoácido N-1 terminal de la cadena peptídica. La PEGilación de cadenas laterales puede realizarse durante la  
65

síntesis en fase sólida mediante el acoplamiento de derivados de lisina N $\epsilon$ -pegilada a la cadena en crecimiento. La PEGilación combinada N-terminal y en cadena lateral es factible tanto como se ha descrito anteriormente en la síntesis en fase sólida o mediante síntesis en fase solución mediante la aplicación de reactivos de PEG activado al péptido desprotegido en amino.

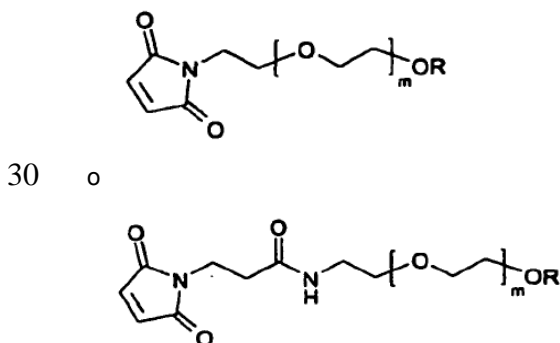
5 Los derivados del PEG adecuados son moléculas de PEG activado con un peso molecular promedio de entre alrededor de 5 a alrededor de 40 kDa, en una realización de alrededor de 20 a alrededor de 40 kDa, preferiblemente alrededor de 30 kDa a alrededor de 35 kDa. En una realización el derivado de PEG es un lineal o un PEG ramificado. Pueden obtenerse una gran variedad de derivados del PEG adecuados para su utilización en la preparación de conjugados PEG-proteína y PEG-péptido de Shearwater Polymers (Huntsville, AL, U.S.A.; [www.nektar.com](http://www.nektar.com)).

15 Los derivados de PEG activado son conocidos en la materia y se describen en, por ejemplo, Morpurgo, M., et al., J. Bioconjug. Chem. 7 (1996) 363-368, para la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y ramificada son adecuadas para la preparación de los fragmentos pegilados. Ejemplos de reactivos de PEG reactivo son el yodo-acetil-metoxi-PEG, o metoxi-PEG-vinilsulfona (m es preferiblemente un entero de alrededor de 450 a alrededor de 900 y R es un alquilo C1 a C6, lineal o ramificado, con de uno a seis átomos de carbono, como metilo, etilo, isopropilo, etc., y en una realización R = metilo):



La utilización de estas sustancias activadas con yodo es conocida en la materia y se describen por ejemplo en Hermanson, G. T., in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148.

25 En una realización, la especie de PEG es un éster de PEG activado, por ejemplo, propionato de N-hidroxisuccinimidilo, o butanoato de N-hidroxisuccinimidilo, o N-hidroxisuccinimidas como PEG-NHS (Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69). En una realización, el éster de N-hidroxisuccinimida activado es



35 utilizando alcoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida, como metoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida (PM 30.000; Shearwater Polymers, Inc.), en el que R y m son como se han definido anteriormente. En una realización, la especie de PEG es el metoxi-polietilenglicol-butirato de N-hidroxisuccinimidilo. El término "alcoxi" se refiere a un grupo éter de alquilo en el que el término 'alquilo' significa un grupo alquilo de cadena sencilla o ramificada que contiene un máximo de cuatro átomos de carbono, como metoxi, etoxi, n-propoxi y similares, preferiblemente metoxi.

40 El término "forma sustancialmente homogénea" tal y como se utiliza en esta aplicación indica que la eritropoyetina pegilada obtenida, contenida o utilizada es aquella con un número definido de grupos PEG unidos. En una realización, la eritropoyetina pegilada es una eritropoyetina monopegilada. La preparación puede contener eritropoyetina que no ha reaccionado (es decir, que carece del grupo PEG), eritropoyetina polipegilada, así como fragmentos del polipéptido generado durante la reacción de PEGilación. El término "forma sustancialmente homogénea" indica que una preparación de una eritropoyetina monopegilada contiene en una realización al menos un 50 % (p/p) de la eritropoyetina monopegilada, al menos un 75 % de la eritropoyetina monopegilada, al menos un 90 % de la eritropoyetina monopegilada, o más del 95 % de la eritropoyetina monopegilada. Los valores en porcentaje se basan en el % del área del cromatograma correspondiente a la purificación mediante cromatografía de intercambio de cationes a partir del que se obtiene la eritropoyetina monopegilada.

50 La presente invención describe un método para la purificación de una eritropoyetina monopegilada para obtener una forma sustancialmente homogénea de una eritropoyetina monopegilada. Sorprendentemente, se ha descubierto que la combinación de dos pasos de cromatografía de intercambio de cationes consecutivos, utilizando en ambos el mismo tipo de material de intercambio de cationes proporciona una forma sustancialmente homogénea de una

eritropoyetina monopegilada. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la purificación de una eritropoyetina monopegilada que comprende los pasos de proporcionar una solución que comprende eritropoyetina no pegilada, monopegilada y polipegilada, realizando dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes, y recuperando la eritropoyetina monopegilada purificada en el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes, en el que se utiliza el mismo tipo de material de intercambio de cationes en ambos pasos de cromatografía de intercambio de cationes. En una realización, la recuperación en el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes se realiza mediante un método de elución diferente que la recuperación en el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes. En otra realización, la columna de cromatografía de intercambio de cationes se regenera tras el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes y tras el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes.

La recuperación de la eritropoyetina monopegilada purificada en el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes se realiza mediante la elución de la eritropoyetina monopegilada del material de la segunda cromatografía de intercambio de cationes. En una realización del método de acuerdo con la invención, los dos pasos de cromatografía de intercambio de cationes difieren en el método de elución utilizado. En esta realización el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes se realiza con un método de elución por pasos, es decir la fuerza iónica del tampón utilizada se aumenta por pasos, es decir de una vez, de un valor de fuerza iónica al siguiente valor de fuerza iónica, preferiblemente mediante un cambio del 10 % o más. En una realización, el método de elución por pasos se realiza como un método de elución de tres pasos. En el primer paso, se eluye principalmente eritropoyetina polipegilada de la columna de cromatografía de intercambio de cationes. El segundo aumento de la fuerza iónica básicamente eluye la eritropoyetina monopegilada con una pureza de más del 60 % en base al área del cromatograma de exclusión por tamaño correspondiente (% en área). El tercer aumento en la fuerza iónica eluye principalmente la eritropoyetina no pegilada restante de la columna.

El segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes se realiza en una realización con un método de elución continua, es decir la fuerza iónica del tampón se aumenta de forma continua, preferiblemente mediante un cambio inferior al 5 %. Las fracciones eluidas que contienen la eritropoyetina monopegilada se combinan para obtener una eritropoyetina monopegilada en forma sustancialmente homogénea, que en una realización contiene menos del 0,5 % de formas de bajo peso molecular en base al área del cromatograma correspondiente. El tampón se encuentra presente preferiblemente a una concentración de entre 10 mM y 250 mM, en una realización entre 50 mM y 150 mM, y en otra realización a alrededor de 100 mM. Por lo tanto en el método de acuerdo con la invención los dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes son los siguientes:

a) aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una mezcla de eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada, y formas de bajo peso molecular a una primera columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monopegilada al material de intercambio de cationes contenido en dicha primera columna,

b) recuperar una eritropoyetina monopegilada de la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución por pasos con un aumento por pasos de la fuerza iónica del tampón de elución, en el que el contenido relativo de eritropoyetina monopegilada en la solución recuperada se aumenta comparado con la mezcla aplicada del paso a),

c) aplicar la eritropoyetina monopegilada recuperada del paso b) a la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo las condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina al material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna, en la que el material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna es del mismo tipo que el material de intercambio de cationes en la primera columna,

d) recuperar la eritropoyetina monopegilada purificada en una forma sustancialmente homogénea a partir de dicha segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución continua con un aumento continuo de la fuerza iónica del tampón de elución.

La PEGilación de un polipéptido normalmente no proporciona el producto de PEGilación en forma homogénea. Se obtiene además como una mezcla de producto monoPEGilado, poliPEGilado y no pegilado. Por lo tanto, la solución de eritropoyetina pegilada que se aplica en el paso a) del método es una mezcla de eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada y formas o fragmentos de bajo peso molecular en un tampón acuoso. El contenido relativo de las diferentes sustancias se determina mediante una cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC). Un cromatograma de ejemplo se muestra en la Figura 1. La suma del área de los picos correlacionados, es decir el área bajo los picos, en la Figura 1 es el área total del cromatograma de exclusión por tamaño. La fracción de un único pico se proporciona como el % de área, es decir, como una fracción de área relativa del área total del cromatograma.

Los métodos cromatográficos generales, su utilización y los términos relacionados son conocidos para un experto en la materia. Véase por ejemplo, Chromatography, 5ª edición, Parte A: Fundamentos y técnicas, Heftmann, E. (Ed.), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992) y otros libros de texto relacionados. Durante la



cromatografía, se hace fluir un tampón a través de una columna de cromatografía de intercambio de cationes. Este "tampón que fluye a través de la columna" se ajusta de acuerdo con los requisitos de los pasos del método de cromatografía. Éste transporta la sustancia de interés hasta (carga) y desde (elución) el material de cromatografía.

5 En el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes, la mezcla de eritropoyetina monoPEGilada, poliPEGilada y no pegilada se aplica a una concentración de proteína de entre 0,7 y 1,5 mg/ml, preferiblemente  
 10 alrededor de 1 mg/ml, en la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes en una solución acuosa tamponada. En una realización, la solución acuosa tamponada contiene fosfato potásico a alrededor de 100 mM a un pH de alrededor de 3,0. El término "alrededor" como se utiliza en la presente solicitud indica un rango del 10% en las proximidades del valor proporcionado, es decir  $\pm 10\%$ . En una realización, previamente y tras la aplicación, la primera columna se lava con la misma solución tampón. Para el primer paso en el método de elución por pasos el tampón se cambió por un tampón con fosfato potásico alrededor de 100 mM, cloruro sódico alrededor de 90 mM a un pH a alrededor de 3,0. Con este tampón, el reactivo de PEG activado hidrolizado, es decir, el correspondiente  
 15 ácido carbónico pegilado, el reactivo de acoplamiento que no ha reaccionado y la eritropoyetina polipegilada se eluyen de la columna de cromatografía de intercambio de cationes. Para el segundo paso en el método de elución en tres pasos, el tampón se cambia por un tampón con fosfato potásico a alrededor de 100 mM, cloruro sódico a alrededor de 250 mM a un pH de alrededor de 3,0. En este paso, la eritropoyetina monopegilada se recupera de la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes. El tampón recogido de este paso de elución se diluye aproximadamente de 1:5 (v/v) a 1:8 (v/v), preferiblemente a 1:5 (v/v), con agua purificada. Una primera  
 20 cromatografía de intercambio de cationes de ejemplo se muestra en la Figura 2. Para el tercer paso del método de elución en tres pasos, el tampón se cambia por un tampón con fosfato potásico alrededor de 100 mM, cloruro sódico alrededor de 750 mM a un pH de alrededor de 3,0. En este paso la eritropoyetina no pegilada se recupera de la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes.

25 El tampón de elución recogido del segundo paso de la primera cromatografía de intercambio de cationes contiene la eritropoyetina monopegilada con una proporción relativa aumentada, es decir la fracción en peso o en % de área (en el cromatograma de una cromatografía de exclusión por tamaño del tampón de elución recogido del segundo paso) de la eritropoyetina monopegilada ha aumentado cuando se compara con el paso previo a la primera cromatografía de intercambio de cationes. En una realización, el contenido relativo de eritropoyetina monopegilada es al menos de un 60% en área. En otra realización, el contenido relativo de eritropoyetina monopegilada es de al menos un 80 % en área.

35 Para una mayor purificación de la eritropoyetina monopegilada se realiza un segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes. Para la segunda cromatografía de intercambio de cationes, se ajusta la concentración del tampón de elución recogido y diluido del segundo paso de elución a una concentración de fosfato potásico de alrededor de 100 mM y a un pH de alrededor de 3,0 y se carga en una segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes que contiene un material de intercambio de cationes del mismo tipo que la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes. En una realización, la segunda columna de intercambio de cationes y el material de intercambio de cationes que ésta contiene es el mismo que en el primer paso de cromatografía de  
 40 intercambio de cationes. La eritropoyetina monopegilada se recupera de la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante la aplicación de un gradiente lineal que empieza con tampón fosfato potásico a una concentración de alrededor de 100 mM con cloruro sódico a alrededor de 50 mM a un pH de alrededor de 3,0 y finaliza con un tampón fosfato potásico a una concentración de alrededor de 100 mM con cloruro sódico a alrededor de 500 mM a un pH de alrededor de 3,0. El cambio de concentración de cloruro sódico es lineal a lo largo de diez volúmenes de columna. El tampón de elución se fracciona y cada fracción se diluye con hidrógeno fosfato dipotásico  
 45 I M para aumentar el valor de pH a alrededor de pH 6 a 8. Un cromatograma de ejemplo se muestra en la Figura 3.

50 Tras el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes la eritropoyetina monopegilada se obtiene en forma sustancialmente homogénea, en una realización con una pureza de al menos el 95% en área.

55 Un experto en la materia está familiarizado con la tecnología de cromatografía de intercambio iónico. En el paso de recuperación del polipéptido unido al material de intercambio de cationes se aumenta la fuerza iónica, es decir, la conductividad del tampón / solución que pasa a través de la columna de intercambio iónico. Esto puede conseguirse mediante una mayor concentración de sales del tampón o mediante la adición de otras sales, denominadas sales de elución, a la solución tampón. Dependiendo del método de elución, la concentración del tampón / sales se aumenta de una vez (método de elución por pasos) o de forma continua (método de elución continua) mediante la adición fraccionada de un tampón concentrado o una solución de sales de elución. Las sales de elución preferibles son el citrato sódico, cloruro sódico, sulfato sódico, fosfato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, fosfato potásico u otras sales de ácido cítrico o ácido fosfórico, o cualquier mezcla de estos componentes. En una realización, la sal de  
 60 elución es el citrato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico o mezclas de los mismos.

65 En una realización del presente método el material de intercambio de cationes es un material de intercambio de cationes fuerte, como preferiblemente el Toyopearl® SP 650 M. La concentración de sal, que causa la elución, en una realización se encuentra en el rango de entre 5 mM y 500 mM, preferiblemente en el rango de entre 5 mM y 400 mM, y más preferiblemente en el rango de entre 5 mM y 250 mM. En otra realización de la invención la sal que

causa the elución se utiliza al mismo tiempo como sustancia tampón, como por ejemplo ácido cítrico o sales del mismo, o ácido fosfórico o sales del mismo.

5 La eritropoyetina monopegilada puede utilizarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección con un transportador o vehículo aceptable a nivel farmacéutico mediante los métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, se han descrito composiciones apropiadas en las patentes WO 97/09996, WO 97/40850, WO 98/58660 y WO 99/07401. Entre los transportadores aceptables a nivel farmacéutico preferibles para la formulación de los productos de la invención están la albúmina sérica humana, las proteínas plasmáticas humanas, etc. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en un tampón fosfato sódico / potásico 10 mM a pH 7 que contiene un agente de tonicidad, por ejemplo cloruro sódico 132 mM. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener un conservante. La composición farmacéutica puede contener diferentes cantidades de eritropoyetina monopegilada, por ejemplo 10-1000 µg/ml, por ejemplo 50 µg o 400 µg.

15 La administración de los productos de glucoproteína eritropoyetina de la presente invención resulta en la formación de hematíes en humanos. Por lo tanto, la administración del producto de glucoproteína eritropoyetina monopegilada repone esta proteína eritropoyetina que es importante en la producción de hematíes. Las composiciones farmacéuticas que contienen los productos de glucoproteína eritropoyetina monopegilada pueden formularse a una potencia efectiva para su administración a través de varios medios a un paciente humano que experimenta trastornos sanguíneos que se caracterizan por una producción baja o anormal de hematíes, únicamente o como parte de un trastorno o enfermedad. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inyección como una inyección subcutánea o intravenosa. Las cantidades promedio de producto de glucoproteína eritropoyetina monopegilada pueden variar. La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencias que está sujeta a factores como el tipo exacto de condición a tratar, es estado del paciente a tratar, así como el resto de ingredientes en la composición. Por ejemplo, pueden administrarse de 0,01 a 10 µg por kg de peso corporal, preferiblemente de 0,1 a 1 µg por kg de peso corporal, por ejemplo una vez a la semana.

25 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a una mayor comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se fija en las reivindicaciones anexas. Se entenderá que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

30 Descripción de las Figuras

Figura 1 SE-HPLC de una mezcla de eritropoyetina pegilada de diferente forma, que incluye la correlación entre picos y sustancias.

35 Figura 2 Cromatograma de ejemplo del método de elución por pasos.

Figura 3 Cromatograma de ejemplo del método de elución continuo.

40 Materiales y Métodos

#### SE-HPLC

45 El SE-HPLC separa proteínas de acuerdo con la su peso molecular aparente. Por lo tanto, el método puede detectar la presencia de eritropoyetina monopegilada, formas y fragmentos de bajo peso molecular, formas polipegiladas y agregados mayores de eritropoyetina. El equipo de HPLC está equipado con un detector de 220 nm y una columna Superose 6 HR (dimensiones 10 x 300 mm, Pharmacia Biotech, N° Cat.: 17-0537-01) o una columna Superose 6 10/300 GL (Pharmacia Biotech, N° Cat.: 17-5172-01). La columna se hace funcionar bajo condiciones isocráticas a temperatura ambiente, utilizando una tasa de flujo de alrededor de 0,4 ml/min. El tampón de la fase móvil es un tampón fosfato sódico 50 mM con cloruro sódico 300 mM a pH 6,8. Dependiendo del sistema de HPLC utilizado, el método puede realizarse con un volumen de aplicación de la muestra de 100 µL o 500 µL. Las muestras se diluyen con el tampón de la fase móvil a una concentración de proteína de alrededor de 0,5 mg/mL (carga de 100 µL) o 0,1 mg/mL (carga de 500 µL). Las muestras con una concentración de proteína inferior a 0,1 mg/mL pueden utilizarse sin diluir. Las proteínas eluidas se detectan con una longitud de onda en el detector de 220 nm.

55 Ejemplo 1 Fermentación y purificación de eritropoyetina

La eritropoyetina puede producirse por ejemplo de acuerdo con la WO 01/87329, y purificarse como se describe en la WO 96/135718.

60 Ejemplo 2 PEGilación de la eritropoyetina con reactivos bifuncionales

a) Activación de la eritropoyetina

Las cantidades especificadas de un reactivo que contiene un grupo tiol bloqueado, SATA (acetiltioacetato de succinimidilo) o SATP (acetiltiopropionato de succinimidilo) (disuelto en DMSO a 10 mg/ml) se añadieron a una solución de la eritropoyetina protegida con bencilo, aquí con hasta 1 ml de proteína 5 mg/ml en tampón fosfato potásico 10 mM suplementado con cloruro sódico 50 mM a pH 7,3. La mezcla de reacción se agitó durante alrededor de 30 minutos (a 25°C) y se detuvo mediante la adición de una solución de lisina 1 M hasta una concentración final de 10 mM. Las cantidades en exceso de SATA y SATP se eliminaron mediante diálisis frente a un tampón fosfato potásico 10 mM que comprende cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM a pH 6,2. El grupo protector acetilo se eliminó con hidroxilamina.

#### 10 b) PEGilado de la eritropoyetina activada

380 mg de metoxi-PEG-maleimida (PM 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, USA)) se disolvió en una solución que contenía 95 mg de eritropoyetina activada (4,5 mg/ml en tampón fosfato potásico 10 mM con cloruro sódico 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,2). La proporción molar resultante entre la eritropoyetina activada y la metoxi-PEG-maleimida en la solución fue de 1:2 a 1:4. Mediante la adición de solución acuosa de hidroxilamina 1 M a una concentración final de 30 mM (pH 6,2) a la solución anterior, los grupos tiol bloqueados unidos covalentemente de la eritropoyetina activada se desbloquearon. La eritropoyetina activada resultante en la mezcla de reacción de la solución contenía grupos tiol (-SH) libres. El desbloqueo de grupos tiol se siguió de forma inmediata por una reacción de acoplamiento entre la eritropoyetina activada que ahora contiene grupos tiol (-SH) libres y metoxi-PEG-maleimida durante 90 minutos (con agitación a 25°C). La reacción de acoplamiento se detuvo mediante la adición de una solución de cisteína acuosa 0,2 M hasta una concentración final de 2 mM a la mezcla de reacción. Tras 30 minutos, los grupos tiol libres en exceso de la eritropoyetina activada que no reaccionan con la metoxi-PEG-maleimida se bloquearon mediante la adición de una solución de N-metilmaleimida 0,5 M en DMSO para alcanzar una concentración final de 5 mM. Tras 30 minutos, la mezcla de reacción resultante que ahora contiene la eritropoyetina pegilada puede purificarse.

#### Ejemplo 3 Purificación de la eritropoyetina monopegilada

##### 30 a) Primera cromatografía en SP Toyopearl 650 M

La primera cromatografía del producto se realiza en una columna de sulfopropilo (SP) empaquetada con SP Toyopearl 650M. La columna se utilizó a temperatura ambiente. La capacidad máxima de carga de la primera columna se define como 1,5 g de proteína por litro de volumen de columna (VC). La columna se equilibró con un tampón fosfato potásico 100 mM con un pH de 2,9 a 3,1 (tampón SP-A). Tras el paso de carga, la columna se lavó y se eluyó con una serie de tampones fosfato potásico que contenían cantidades crecientes de NaCl. El reactivo de PEG hidrolizado y las formas polipegiladas se eliminaron en el tampón elución y el subsiguiente paso de lavado con tampón SP-A y tampón fosfato potásico 100 mM, a pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro sódico 90 mM (tampón SP-B), respectivamente.

40 La eritropoyetina monopegilada se eluyó al aplicar un tampón fosfato potásico 100 mM, de pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro sódico 250 mM (tampón SP-C), se recogió en un recipiente y se diluyó directamente 1:5 con agua purificada. El eluido recogido se denominó "Eluido agrupado SP I".

45 La columna se lavó a continuación con tampón fosfato potásico 100 mM, pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro sódico 750 mM (tampón SP-D) para eliminar la eritropoyetina que no había reaccionado y para regenerar la columna.

##### b) Segunda cromatografía en SP Toyopearl 650 M

50 La segunda columna se operó a temperatura ambiente. Tras el equilibrado con tampón SP-A, el agrupado de eluidos SP I se cargó en la columna y a continuación se lavó la columna con tampón SP-A. La eritropoyetina monopegilada se eluyó mediante la aplicación de un gradiente lineal con un gradiente de cloruro sódico entre 50 y 500 mM a lo largo de diez volúmenes de columna tamponado con tampón fosfato potásico 100 mM a un pH de 2,9 a 3,1. El pico de producto se fraccionó en hasta 8 fracciones y cada fracción se diluyó directamente con hidrógeno fosfato dipotásico 1 M para aumentar el pH de 6 a 8.

Tras la finalización de la elución de la eritropoyetina monopegilada, el pendiente del gradiente puede aumentarse dando lugar a un lavado inmediato de la columna con fosfato potásico 100 mM, pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro sódico 500 mM.

##### 60 c) Regeneración de las columnas de SP Toyopearl 650 M

65 Las resinas de ambas columnas se regeneraron en una secuencia de siete pasos. Las columnas se lavaron con agua purificada seguido de una solución de hidróxido sódico 0,5 M. La solución alcalina se desplazó con agua purificada seguida de un lavado ácido (dihidrógeno fosfato sódico 0,5 M, ácido fosfórico 1 M). Tras otro paso de agua purificada, las columnas se despirogenaron con hidróxido sódico 0,5 M durante  $\geq 4$  horas. Tras la regeneración

cáustica, las columnas se lavaron con agua purificada de nuevo. Véase la Tabla 1 y la Tabla 2 para un resumen de los parámetros de columna.

5

Tabla 1: Parámetros de la primera columna de cromatografía

Paso	Solución Tampón	Volúmenes de columna	Tasa de flujo [L/min]
Equilibrado	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9 -3,1 (tampón SP-A)	≥6	1,6 – 2,1
Carga de la columna	mezcla de reacción, diluida con SP-A (1:5)	n. a.	1,6 – 2,1
Lavado con SP-A	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9 -3,1 (tampón SP-A)	2	1,6 – 2,1
Lavado con SP-B	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9-3,1, NaCl 90 mmol/L (tampón SP-B)	2-3	1,6 – 2,1
Elución con SP-C	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9-3,1, NaCl 250 mmol/L (tampón SP-C)	2-3	1,6 – 2,1
Lavado con SP-D	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9 -3,1, NaCl 750 mmol/L (tampón SP-D)	2-3	1,6 – 2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6 – 2,1
Regeneración cáustica de la columna I	NaOH 0,5 mol/L	≥2	1,6 – 2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6 – 2,1
Regeneración ácida de la columna	ácido fosfórico 1 mol/L dihidrógeno fosfato sódico 0,5 mol/L	≥3	1,6 – 2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6 – 2,1
Regeneración cáustica de la columna II	NaOH 0,5 mol/L	≥3	n. a.
Aclarado	PW III	≥2	1,6-2,1

n. a.: no aplica

Tabla 2: Parámetros de la segunda columna de cromatografía

Paso	Solución Tampón	Volúmenes de columna	Tasa de flujo [L/min]
Equilibrado	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9-3,1 (tampón SP-A)	≥6	1,6-2,1
Carga de la columna	Eluido agrupado SP I, diluido con PW III (1:5)	n. a.	1,6-2,1
Lavado con SP-A	fosfato potásico 100 mmol/L, pH 2,9-3,1, (tampón SP-A)	2-3	1,6-2,1
Gradiente y elución	Gradiente con una pendiente de NaCl de 50-500 mmol/L a lo largo de 10 VC entre tampón SP-A y fosfato potásico 100 mmol/L, NaCl 500 mmol/L pH.2,9 – 3,1 (tampón SP-E)	10	1,6-2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6-2,1
Regeneración cáustica de la columna I	NaOH 0,5 mol/L	≥2	1,6-2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6-2,1
Regeneración ácida de la columna	ácido fosfórico 1 mol/L dihidrógeno fosfato sódico 0,5 mol/L	≥3	1,6-2,1
Aclarado	PW III	≥2	1,6-2,1
Regeneración cáustica de la columna II	NaOH 0,5 mol/L	≥3	n. a.
Aclarado	PW III	≥2	1,6-2,1

n. a.: no aplica

10

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Purificación de polipéptidos pegilados  
 <130> 24380 FT  
 <150> EP 07013959.7  
 <151> 2007-07-17  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.2  
 10 <210> 1  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30  
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45  
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95  
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110  
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125  
 15 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140  
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160  
 Cys Arg Thr Gly Asp  
 165

ES 2 386 323 T3

<210> 2  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

5

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
 65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 165

## REIVINDICACIONES

1. El método para la purificación de una eritropoyetina monopegilada que comprende los pasos de proporcionar una solución que comprende eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada, en el que se realizan dos pasos de cromatografía de intercambio de cationes consecutivos, y la recuperación de la eritropoyetina monopegilada purificada en el segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes, que se caracteriza porque se utiliza el mismo tipo de material de intercambio de cationes en ambos pasos de cromatografía de intercambio de cationes y porque los dos pasos de cromatografía de intercambio de cationes consecutivos se realizan utilizando diferentes métodos de elución, y en el que los dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes comprenden los siguientes pasos:
- a) aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una mezcla de eritropoyetina monopegilada, polipegilada y no pegilada, y formas de bajo peso molecular a una primera columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monopegilada al material de intercambio de cationes contenido en dicha primera columna,
- b) recuperar la eritropoyetina monopegilada de la primera columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución por pasos con un aumento progresivo de la fuerza iónica del tampón de elución, en el que la fracción de dicha eritropoyetina monopegilada en la solución recuperada aumenta comparado con la mezcla aplicada,
- c) aplicar la eritropoyetina monopegilada recuperada del paso b) en una segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes bajo las condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monopegilada al material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna, en la que el material de intercambio de cationes contenido en dicha segunda columna es del mismo tipo que el material de intercambio de cationes en la primera columna,
- d) recuperar la eritropoyetina monopegilada purificada en una forma sustancialmente homogénea a partir de dicha segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante un método de elución continua con un aumento continuo de la fuerza iónica del tampón de elución.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicho material de intercambio de cationes es un material de intercambio de cationes de sulfopropilo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicho aumento a pasos de la fuerza iónica del paso b) del método es un aumento de la fuerza iónica de tres pasos.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que se caracteriza porque la eritropoyetina monopegilada recuperada en el paso b) se recupera en el segundo paso del método de elución por pasos.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que se caracteriza porque en dicho paso b) se recupera eritropoyetina polipegilada tras el primer aumento de fuerza iónica en el tampón no retenido, se recupera eritropoyetina monopegilada tras el segundo aumento de fuerza iónica en el tampón no retenido, y se recupera eritropoyetina no pegilada tras el tercer aumento de fuerza iónica del tampón no retenido.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, que se caracteriza porque la diferencia de la concentración de sal que causa la elución en el método de elución por pasos del paso b) es del 120 % o más en cada uno de los pasos del método de elución por pasos.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, que se caracteriza porque dicha solución acuosa tamponada contiene ácido fosfórico o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma como sustancia tampón.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, que se caracteriza porque en dicho paso d) la eritropoyetina monopegilada se recupera de la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes mediante la aplicación de un gradiente lineal que se inicia con un tampón de fosfato potásico de una concentración de alrededor de 100 mM con cloruro sódico a alrededor de 50 mM a un pH de aproximadamente 3,0 y finalizando con un tampón fosfato potásico a una concentración de alrededor de 100 mM con cloruro sódico a alrededor de 500 mM a un pH de aproximadamente 3,0, en el que el cambio en la concentración de cloruro sódico es lineal a lo largo de diez volúmenes de columna.
9. El método para la producción de una eritropoyetina monopegilada que comprende los siguientes pasos: a) PEGilar la eritropoyetina, b) purificar la eritropoyetina monopegilada con dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes, en la que el primer y segundo paso de cromatografía de intercambio de cationes emplean el mismo tipo de material de intercambio de cationes, c) recuperar la eritropoyetina monopegilada de la segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes en forma sustancialmente homogénea, y realizando los dos pasos consecutivos de cromatografía de intercambio de cationes utilizando diferentes métodos de elución de acuerdo con la reivindicación 1.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque el segundo material de intercambio de cationes es el mismo tipo de material de intercambio de cationes pero no la misma fracción del material de intercambio de cationes que el primer material de intercambio de cationes.
- 5 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque dicho residuo de PEG posee un peso molecular de 20-35 kDa en forma de PEG lineal y de 40 kDa como PEG ramificado.
- 10 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque dicha eritropoyetina monopegilada se obtiene en una forma sustancialmente homogénea que contiene más del 95% en área de eritropoyetina monopegilada determinado mediante HPLC de exclusión por tamaño.
- 15 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque dicha eritropoyetina monopegilada se recupera en el primer paso de cromatografía de intercambio de cationes con una pureza de más del 60% en área determinado mediante HPLC de exclusión por tamaño.
- 20 14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 3 a 13, que se caracteriza porque dicha solución acuosa tamponada que contiene tampón fosfato potásico a alrededor de 100 mM y posee un pH de aproximadamente 3,0.
- 25 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque en dichos pasos de cromatografía, el valor de pH de las soluciones es de alrededor de 3,0.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque la sal que causa la elución de la eritropoyetina pegilada de las columnas de cromatografía de intercambio de cationes es citrato sódico, cloruro sódico o cloruro potásico.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se caracteriza porque dicha eritropoyetina posee la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 1 o 2.



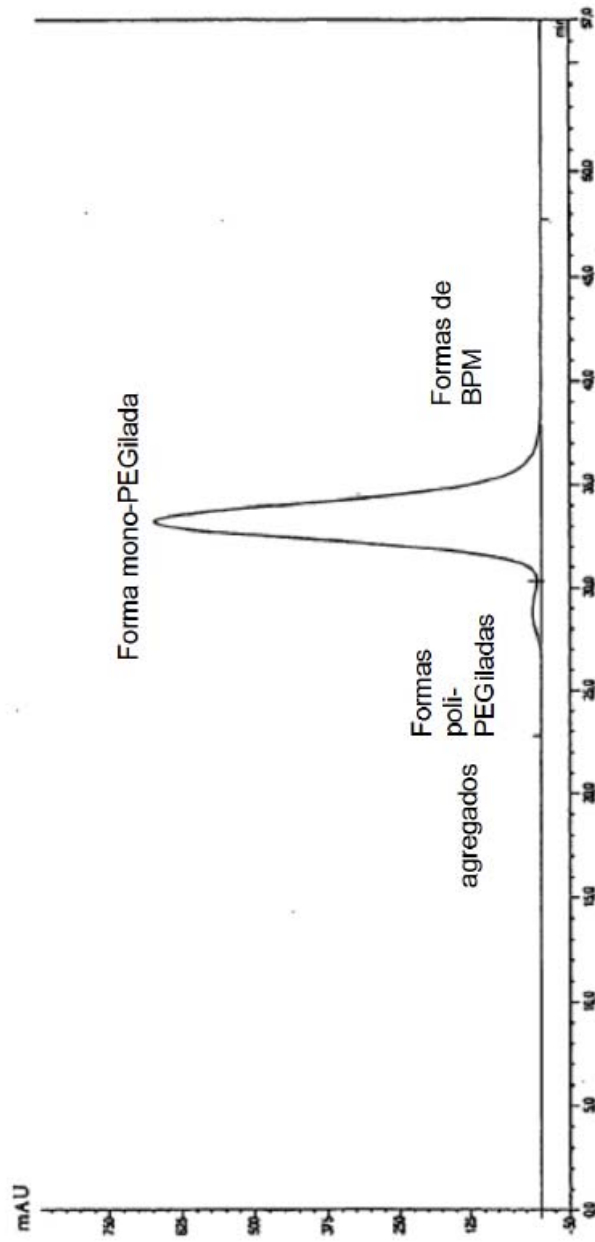


Fig. 1

Fig. 2

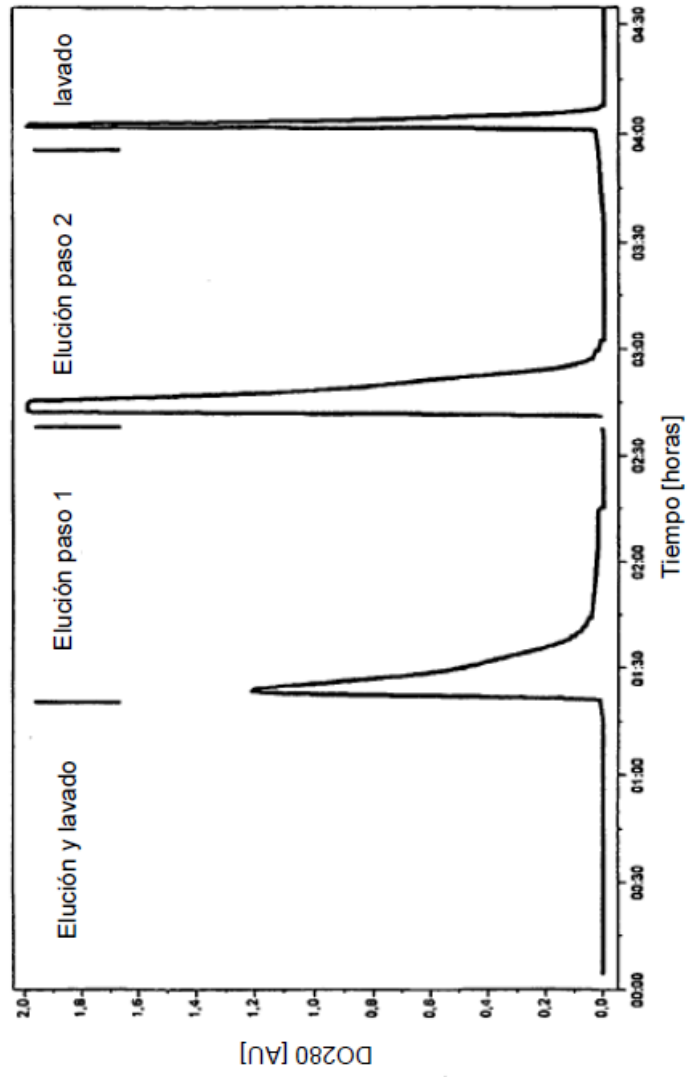


Fig. 3

