

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 160**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/00** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 14/535** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2010 E 10197385 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2341061**

54 Título: **Procedimiento novedoso para preparar G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos)**

30 Prioridad:

**31.12.2009 TR 200910033**

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

**02.12.2013**

73 Titular/es:

**ARVEN ILAC SANAYI VE TICARET A.S. (100.0%)  
Balabandere Cad. Ilac Sanayi Yolu, No: 14, Istinye  
Istanbul 34460, TR**

72 Inventor/es:

**TOKSÖZ, AHMET;  
YENICE, IREM;  
ÜZGÜN, MEHMET y  
ÖNER, FILİZ**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 432 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento novedoso para preparar G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos)

**Aspecto técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso de aislamiento y purificación de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de un microorganismo que produce G-CSF, más específicamente G-CSF es metionil-G-CSF humano recombinante (rmetHuG-CSF).

**Antecedentes de la invención**

- 10 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una proteína de 175 aminoácidos preparada mediante tecnología de ADN recombinante. El G-CSF se produce mediante bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) en el que se ha insertado el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos humano. La proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia natural predicha a partir del análisis de secuencia de ADN humano, excepto por la adición de una metionina en el extremo N-terminal, necesaria para la expresión en *E. coli*. Debido a que G-CSF se produce en *E. coli*, el producto no está glicosilado y por tanto se difiere del G-CSF aislado a partir de una célula humana.

- 15 El G-CSF se suministra o bien en viales o bien en jeringas precargadas. El producto está disponible en jeringas precargadas y viales de un solo uso. Los viales de un solo uso contienen o bien 300 mcg o bien 480 mcg de G-CSF en un volumen de llenado de 1,0 ml o 1,6 ml respectivamente. Las jeringas precargadas de un solo uso contienen o bien 300 mcg o bien 480 mcg de G-CSF en un volumen de llenado de 0,5 ml o 0,8 ml respectivamente.

- 20 La secuencia de aminoácidos de G-CSF humano se muestra en la figura 1. El primer aminoácido de la proteína madura se determinó mediante secuenciación directa de aminoácidos de las proteínas purificadas. Los ARNm de G-CSF humano codifican para una secuencia líder hidrófoba de 30 aminoácidos típica de proteínas secretadas. El G-CSF tiene dos enlaces disulfuro formados por residuos de cisteína homólogos (figura 1) y un residuo de cisteína adicional en la posición 17 que no puede participar en enlaces disulfuro intramoleculares. Los enlaces disulfuro en estas moléculas estabilizan las estructuras y las hacen resistentes a tratamiento relativamente riguroso (algunas proteasas, temperaturas altas, disolventes desnaturizantes, pH extremo), que conducen a la desnaturalización tras la reducción de enlaces disulfuro (Nicos A. Nicola, The walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, "Granulocyte Colony Stimulating Factor", pág. 77-100).

- 30 El G-CSF humano puede producirse en organismos eucariotas (levadura y líneas celulares de mamífero) y organismos procariotas como bacterias. La forma en la se produce G-CSF depende del tipo de organismo huésped usado para la expresión. Si el G-CSF se expresa en células eucariotas, se produce en una forma soluble y se secreta. Cuando el G-CSF se produce en células procariotas, el producto se forma como cuerpos de inclusión (IB) inactivos. Normalmente los cuerpos de inclusión tienen una estructura secundaria y están agregados densamente. Se revela que la combinación de tantos factores del estado fisiológico de célula huésped y condiciones de crecimiento se ve afectada por la formación de cuerpos de inclusión.

- 35 El G-CSF producido en células procariotas, tales como las de *E. coli*, está en cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados nucleares o citoplasmáticos de sustancias que pueden teñirse, habitualmente proteínas. La purificación de las proteínas expresadas a partir de cuerpos de inclusión requiere habitualmente dos etapas principales; extracción de cuerpos de inclusión a partir de las bacterias seguido por la solubilización de los cuerpos de inclusión purificados.

- 40 La producción de proteína de G-CSF humano biológicamente activa a partir de cuerpos de inclusión inactivos expresada mediante tecnología de ADNr en células huésped procariotas usadas comúnmente es muy difícil. Se desean metodologías de procedimiento eficaces para la fabricación de G-CSF terapéuticamente útil a escala industrial. Se han notificado diversos métodos en la bibliografía científica para la producción de G-CSF en *E. coli*, levadura o células CHO (ovario de hámster chino) de mamífero.

- 45 Muchas patentes describen diversos aspectos de expresión y purificación de proteína G-CSF a partir de diferentes sistemas de expresión como células procariotas y eucariotas. La expresión de G-CSF en sistemas bacterianos se describe en las patentes estadounidenses, US 4 810 643 (03.03.1986, Kirin-Amgen Inc.) y US 4 999 291 (23.08.1985, Amgen Inc.). En los procedimientos preferidos, el gen de G-CSF se sintetiza, se clona y se transforma en *E. coli*. La proteína se expresa induciendo el cultivo elevando la temperatura hasta 42°C. Las condiciones y los parámetros para la clonación y expresión mediante fermentación no están claros. Varias etapas están implicadas en la construcción del clon. El procedimiento se realiza en condiciones de matraz y el nivel de expresión de proteínas es de tan sólo el 3-5% en base de proteína celular total.

- 55 El producto farmacéutico denominado NUPOGEN®, una marca comercial de Amgen Inc., incluye una proteína de 175 aminoácidos preparada mediante tecnología de ADN recombinante. La información de producto que puede recuperarse de la página web en: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=10056> da a conocer que el NEUPOGEN® se produce mediante bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) en las que se ha insertado

el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos humano. La formulación del producto contiene filgrastim, acetato, sorbitol, polisorbato 80, sodio y agua en una forma adecuada para la administración intravenosa y subcutánea.

5 El documento WO 2008/096370-A2 da a conocer a procedimiento para aislar y purificar proteína G-CSF a partir de una *E. coli* que produce G-CSF que comprende lisar el microorganismo y separar G-CSF, aislar cuerpos de inclusión que comprenden G-CSF, solubilizar G-CSF con un agente caotrópico concentrado y un agente reductor tal como DTT, oxidar G-CSF, replegar-concentrar y desalar el mismo, someterlo a cromatografía de intercambio iónico y recuperar G-CSF purificado en una forma estable.

10 GETZ E B ET AL: "A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry" Analytical Biochemistry, 15 de agosto de 1999 LNKD-PUBMED: 10452801, vol. 273, n.º 1, páginas 73-80, presentan una comparación entre ditiotreitól (DTT) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en cuanto a: (1) estabilidad a pH neutro, (2) capacidad para conservar la actividad enzimática, (3) interferencia con la unión de marcadores a los tioles de proteína, (4) reducción de sondas de espín de nitróxido, y (5) capacidad para provocar degradación de proteínas no deseadas a temperaturas elevadas usadas en preparaciones de electroforesis en gel.  
15 Sin embargo, no se propone TCEP para aumentar el rendimiento del procedimiento rompiendo eficazmente los enlaces disulfuro con una actividad de desplegado en un procedimiento, por ejemplo para la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Los documentos EP 0 220 520 (30.09.1985, Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), WO 87/01132 (23.08.1985, Kirin-Amgen Inc.) y WO 88/01297 (11.08.1986, Cetus Corporation) describen la clonación de G-CSF.

20 La patente estadounidense US 5 055 555 (05.01.1989, Sassenfeld, Helmut) describe un procedimiento simplificado para la producción de G-CSF humano a partir de células eucariotas. Lograr la secreción de proteínas a través de organismos eucariotas extracelulares forma una tecnología completamente diferente en comparación con la expresión de proteínas a través de organismos procaríotas intracelulares. Aunque el procedimiento descrito en la patente US 5.055.555 es más simple; no puede aplicarse fácilmente a G-CSF recombinante expresado en *E. coli* u  
25 otras células en las que se produce G-CSF en forma de un cuerpo de inclusión. El método anterior se desarrolló para G-CSF soluble expresado y secretado mediante levadura recombinante en el medio de fermentación. Para G-CSF derivado de *E. coli*, la solubilización de cuerpos de inclusión y el replegado de G-CSF son etapas adicionales que hay que tener en cuenta. Además, hasta la fecha no se ha notificado obtener una preparación de G-CSF de calidad terapéutica libre de endotoxinas lipopolisacáridas, que son contaminantes probables cuando se usa *E. coli*  
30 como huésped, en un procedimiento, simple, ampliable a escala. A escala comercial, las pérdidas de rendimiento de un procedimiento de múltiple etapas se vuelven altamente significativas. Por tanto un procedimiento simplificado con menos etapas dará rendimientos más altos en un tiempo más corto, además de ser económico.

La producción de proteínas terapéuticas recombinantes usando *Escherichia coli* como sistema huésped es viable si se puede configurar un procedimiento aguas abajo simple y rentable. La expresión de alto nivel de proteínas eucariotas en *E. coli* a menudo conduce a la formación de IB insolubles en el citoplasma. La formación de IB puede producirse como consecuencia de la acumulación intracelular de formas parcialmente desplegadas de la proteína recombinante. Las propiedades de proteínas tales como la carga promedio, fracción de residuo de formación de giros, fracciones de cisteína y prolina, hidrofilia y número total de residuos se han correlacionado con la formación de cuerpos de inclusión. Condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y aporte de nutrientes desempeñan un  
35 papel vital en el control del reparto de la proteína recombinante en fracciones solubles e insolubles. A menudo es difícil recuperar la proteína a partir de IB debido a los problemas asociados con las etapas de recuperación, solubilización y renaturalización iniciales.

Los diversos protocolos de purificación tratados en las patentes anteriores mencionan múltiples cromatografías y otras etapas para la purificación de G-CSF. Ninguna de las patentes mencionadas anteriormente da a conocer un método más simple, económico y comercial para la producción de G-CSF a una escala comercialmente viable que garantice la estabilidad del producto obtenido mediante el procedimiento. Los procedimientos descritos en la técnica anterior son complejos, largos y los costes unitarios son altos.

45 Por tanto, para superar los principales problemas asociados con la fabricación de G-CSF, ahora se ha desarrollado un procedimiento simple, económico, que puede aplicarse en la industria y más estable para la recuperación elevada de G-CSF y se da a conocer en esta presente invención.

### Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso de aislamiento y purificación de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de un microorganismo que produce G-CSF y describe un método de producción de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que puede aplicarse en la industria, simple, rentable, que ahorra tiempo.

El objeto principal de la presente invención es proporcionar un procedimiento novedoso para aislar y purificar el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de un microorganismo que produce G-CSF que consiste en las siguientes etapas;

- a) lisar el microorganismo ajustando la densidad y la temperatura de suspensión de pasta celular y separar el material insoluble que comprende G-CSF,
- b) aislar los cuerpos de inclusión (IB) que comprenden G-CSF en presencia de agente tensioactivo iónico
- 5 c) solubilizar el G-CSF presente en el material insoluble, usando un agente caotrópico altamente concentrado y un agente desnaturalizante que es tris(2-carboxietil)fosfina HCl (TCEP)
- d) oxidar el G-CSF en presencia de cistina/cisteína siendo la razón molar de 1:10,
- e) replegar el G-CSF en condiciones de temperatura controlada mediante un método de una etapa,
- f) concentrar la disolución de G-CSF replegado usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) que usa cartuchos o casetes con un punto corte de peso molecular de 5-12 KDa,
- 10 g) desalar la disolución de G-CSF concentrada en una columna de temperatura controlada y separar la disolución de G-CSF a partir del caótropro mediante filtración en gel,
- h) someter la disolución de G-CSF a cromatografía de intercambio catiónico,
- i) recuperar el G-CSF purificado en tampón de formulación en forma estable,
- j) eliminar endotoxinas usando cromatografía de intercambio aniónico de tipo básico fuerte.
- 15 En una realización, el G-CSF es metionil-G-CSF humano recombinante (rmetHuG-CSF).
- En una realización de la invención, la densidad de la pasta celular de la etapa de lisado no es menor de 8 ml de tampón de resuspensión por gramo de IB y la temperatura es de entre 5 y 20°C, preferiblemente es de entre 5 y 15°C.
- 20 Otra realización de la invención es el agente tensioactivo iónico en la que es desoxicolato de sodio en la etapa de aislamiento.
- En una realización, el agente caotrópico altamente concentrado en la etapa de solubilización es guanidinio HCl en las concentraciones de 5,4 M a 6,6 M, preferiblemente es de 6 M.
- En una realización, la temperatura en la etapa de replegado es de entre 7 y 15°C, preferiblemente es de entre 7 y 11°C, más preferiblemente es de entre 8 y 10°C.
- 25 Según otra realización, la columna de filtración en gel es Sephadex G-25 Fine y el tamaño de partícula de las perlas de Sephadex G25 Fine es de entre 20 y 300 µm, preferiblemente es de aproximadamente 80 µm.
- En una realización, la columna en la etapa de desalado se estabiliza a una temperatura de entre 4 y 20°C, preferiblemente de entre 7 y 15°C, más preferiblemente de entre 7 y 13°C.
- 30 En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico consiste en sulfopropilo y el tampón de formulación estable en la etapa de recuperación es una disolución acuosa de tampón acetato 10 mM (o acetato de sodio), sorbitol al 5% y polisorbato 80 al 0,004% que se ajusta a pH 4,0.
- En otra realización, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico de tipo básico fuerte usada en la eliminación de endotoxinas consiste en amonio cuaternario.
- 35 En una realización el pH en la etapa c) es de desde 7,5 hasta 9,0, preferiblemente es de 8, y en otra realización el pH en la etapa e) es de desde 7,0 hasta 8,0, preferiblemente es de 7,5.
- Según otra realización, el microorganismo que produce G-CSF es *E. coli*.
- En una realización adicional de la invención, el método comprende la etapa adicional de formular el rmetHuG-CSF para producir un producto biofarmacéutico que consiste en;
- 40 a) 30-100 MU (300 - 1000 µg) rmetHuG-CSF
- b) 0,50 - 0,80 mg de acetato (o 0,250 - 1,00 mg de acetato de sodio)
- c) 25 - 100 mg de sorbitol
- d) 0,01 - 0,10 mg de polisorbato 80
- e) agua para inyección
- f) hidróxido de sodio o ácido acético para el ajuste de pH

en 1 ml de disolución estéril, que es aceptable para llenarse en dispositivos de suministro apropiados de concentraciones de dosificación definidas para la administración a pacientes.

En una realización preferida la cantidad de acetato es de 0,59 mg.

5 Los productos biofarmacéuticos obtenidos usando el procedimiento de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de neutropenia, leucemia, movilización de células progenitoras de sangre periférica (PBPC), infecciones por VIH tales como infecciones bacterianas y pacientes con cáncer que reciben quimioterapia citotóxica, quimioterapia mielosupresora y trasplante de médula ósea.

10 En la técnica anterior, se describen diferentes tipos de microorganismos, diferentes tipos de cepas y también diferentes secuencias génicas modificadas para producir el G-CSF. Cada procedimiento tiene condiciones de producción específicas y sus problemas que pueden obtenerse a partir de las condiciones de procedimiento o impurezas o proteínas diana producidas. El desarrollo de las etapas de purificación en la producción de proteínas depende de las especificaciones de la proteína no purificada obtenida a partir del procedimiento aguas arriba en diferentes condiciones. La presente invención se refiere a la producción del G-CSF puro y estable (al 98% según “el método de exclusión molecular” de EP) como un producto final considerando el gasto de tiempo, de trabajo y de dinero. Los procedimientos disponibles hasta la fecha generalmente requieren mucho tiempo, trabajo y dinero, así como que son complicados. Además, no logran proporcionar resultados estables. Todavía existe una necesidad de resultados de purificaciones mejoradas.

### Descripción detallada de la invención

20 Se lleva a cabo un método simple e innovador para la producción de G-CSF que es metionil-G-CSF humano recombinante (rmetHuG-CSF) usando células de *E. coli* debido al alto nivel de expresión de proteínas y a evitar complicaciones de glicosilación.

25 Las células de *E. coli* se recogen tras fermentación mediante centrifugación y se extrae su material proteico, que está en forma de cuerpo de inclusión, de las células lisando las células bacterianas usando un perturbador celular de alta presión ajustando la densidad y la temperatura de suspensión de la pasta celular y separando el material insoluble que comprende G-CSF. La pared de las células bacterianas se rompe por medios físicos, permitiendo así que los cuerpos de inclusión en las células se suspendan libremente en tampón. Los cuerpos de inclusión que se suspenden en la disolución de tampón se sedimentan mediante centrifugación a alta velocidad. Se aísla el cuerpo de inclusión que comprende G-CSF en presencia de un agente tensioactivo iónico. Tras las etapas de lavado y centrifugación, se solubilizan los cuerpos de inclusión en un tampón de solubilización adecuado que contiene un agente caotrópico altamente concentrado. El tampón de solubilización es una disolución acuosa con un valor de pH de 8,0 que comprende guanidina.HCl 6 M como agente caotrópico y TRIS 100 mM como sal tamponante. Los cuerpos de inclusión se solubilizan con el tampón mencionado anteriormente a temperatura ambiente.

### Purificación

35 Tras la etapa de solubilización de cuerpos de inclusión, hay varios materiales proteicos diferentes, no sólo diferentes de G-CSF sino también varias isoformas de G-CSF. Existe una necesidad de cambiar la conformación de G-CSF plegado erróneamente y de romper puentes disulfuro intermoleculares que pueden formar dímeros, oligómeros y agregados. Por tanto, las proteínas solubilizadas con un agente desnaturizante apropiado se desnaturizan para obtener cadenas de monómeros desplegadas. La etapa de desnaturización de las proteínas es importante y afecta al rendimiento y a la pureza del producto final. Si queda proteína plegada erróneamente en la disolución puede desencadenar la agregación a lo largo de todas las etapas de purificación. Por tanto, se elige tris-2-carboxietilfosfina.HCl 0,5 M (TCEP) o DTT 0,5 M como agente desnaturizante fuerte para obtener niveles de desnaturización deseados. En 1-2 horas de mezclado a temperatura ambiente, se permiten niveles apropiados de desnaturización.

45 DTT es un producto químico oloroso y cuando entra en contacto con el aire, puede oxidarse fácilmente. Debido a la oxidación con el aire, es difícil almacenar DDT como disolvente y es un compuesto relativamente inestable. Por tanto, se elige TCEP para la presente invención. Sorprendentemente, se ha encontrado que tiene un efecto sinérgico sobre el desplegado de la proteína que se muestra en la figura 3. Como resultado de este efecto, se aumenta el rendimiento al final de procedimiento.

50 La figura 2 muestra el cromatograma de los cuerpos de inclusión en el tampón de disolución. En este cromatograma se observa que todas las proteínas están en una mezcla incluyendo el G-CSF debido a los cuerpos de inclusión.

La figura 3 muestra el cromatograma tras añadir el TCEP y DDT al tampón de solubilización y se observa claramente el efecto de TCEP en el desplegado de G-CSF plegado erróneamente con diferentes conformaciones. En la figura 3, el pico de DDT es el que está por debajo de 0,025 AU y el pico de TCEP es el que está por encima de 0,025 AU.

55 Se muestra claramente que el pico que se refiere a TCEP tiene un pico más alto y una superficie más plana y lisa sin picos adicionales que el pico que se refiere a DDT. El pico de DDT también tiene 3 picos pequeños que muestran

que no es completamente satisfactorio para obtener proteína desplegada en una cadena plana. Esto muestra el efecto sinérgico del TCEP sobre la etapa de desplegado y la concentración de proteína total aumenta en un 10-15%.

El replegado de moléculas de G-CSF se realiza en presencia de un par de agente oxidante/reductor. La pareja cistina/cisteína se usa para obtener la formación de la molécula de G-CSF plegada apropiadamente. La razón molar de cistina con respecto a cisteína es de 1/10. La disolución de replegado es una disolución acuosa con un valor de pH de 7,5 que comprende L-arginina.HCl 0,5 M, sorbitol 50 mg/ml, TRIS 0,1 M y EDTA 2 mM. El volumen de disolución de replegado se ajusta hasta alcanzar una concentración de 0,2 mg/ml de proteína desnaturalizada. La disolución se mantiene entre 7 y 15°C, preferiblemente entre 7 y 11°C, más preferiblemente de 8 a 10°C durante 16-20 horas hasta alcanzar la conformación de plegado apropiada y niveles de plegado deseados.

- 5
- 10 Cuando se finaliza el plegado de la conformación apropiada, existe la necesidad de concentrar la disolución hasta volúmenes más pequeños para etapas de purificación adicionales que implican cromatografía. Se usa filtración de flujo tangencial (TFF) para eliminar moléculas no deseadas que tienen un peso molecular más bajo de 5-12 kDa. De esta manera, no sólo se concentra la disolución sino que también pueden eliminarse algunas impurezas relacionadas con el procedimiento, tales como moléculas proteicas pequeñas que no podían eliminarse en etapas anteriores.
- 15 La concentración de la proteína afecta a la concentración de la concentración de producto finalizado y por consiguiente al rendimiento del procedimiento. Por tanto, el uso de TFF es muy importante en esta etapa.

Entonces se somete la disolución concentrada a filtración en gel de modo que se eliminan las sales del tampón junto con material proteico de bajo peso molecular. La proteína se separa de dicha sal por la enorme diferencia de tamaño molecular mediante inyección y movimiento en la columna de desalado. La columna de desalado está empaquetada con gel Sephadex G-25, que tiene un tamaño de perla de entre 20-300 µm, preferiblemente de aproximadamente 80 µm, a la que la resolución de G-CSF con otro material proteico es mejor, dando así producto intermedio más puro en cuanto a impurezas de procedimiento. La columna de desalado se enfría hasta 4-20°C de modo que la muestra concentrada en la salida de la columna permanece estable. La disolución concentrada de la etapa de TFF se inyecta en la columna y se mueve con una fase móvil que tiene pH=5,4 con un valor de conductividad de 1,0-2,0 uS/cm que comprende acetato de sodio 20 mM y sorbitol 50 mg/ml.

- 20
- 25
- 30 Entonces se somete la disolución de salida de desalado a cromatografía de intercambio catiónico. Esta es la etapa en la que se separa G-CSF plegado apropiadamente de sus isoformas plegadas erróneamente y otras impurezas. En primer lugar se alimentan las proteínas a la columna de intercambio catiónico llena con material de intercambio catiónico fuerte y se mantienen en los medios. Entonces, usando gradualmente un método en gradiente, se aumenta la conductividad hasta determinados valores permitiendo que se eluyan las impurezas y el G-CSF a diferentes tiempos para la separación con respecto a sus valores de pI diferentes. El método en gradiente hace uso de dos fases móviles diferentes con dos valores de conductividad diferentes: fase móvil A y fase móvil B. La fase móvil A es una disolución de pH=5,4, que tiene un valor de conductividad de 1,0 - 2,0 uS/cm, que comprende acetato de sodio 20 mM y sorbitol 50 mg/ml. La fase móvil B es una disolución de pH=5,4, que tiene un valor de conductividad de 40-50 uS/cm, que comprende acetato de sodio 20 mM, sorbitol 50 mg/ml y NaCl 0,5 M.
- 35

Entonces se somete el material proteico puro presente en la disolución de agua tamponada a filtración en gel para producir el producto final. Por tanto, la molécula de G-CSF activa se recupera directamente como producto final con una formulación apropiada y estable evitando la complejidad y los problemas de otras técnicas de recuperación, tales como liofilización y reconstitución. La filtración en gel se lleva a cabo con la misma matriz en la etapa de desalado pero con diferente composición de fase móvil, que se denomina tampón de formulación. Comprende tampón de acetato 10 mM y sorbitol 50 mg/ml y polisorbato 80 al 0,004% con un valor de pH de 4,0.

- 40
- 45 El nivel de endotoxinas es esencial en la producción de disolución inyectable estéril tal como el producto que se produce mediante la presente invención. En la producción de sustancias activas biológicas y biotecnológicas, las disoluciones estériles tales como tampones de lavado, fases móviles y disoluciones de formulación pueden ser muy costosas, lo que también puede requerir un entorno controlado que también contribuirá a un coste elevado por su requerimiento de pruebas y control microbiológico regular. Es un reto mantener los niveles de endotoxinas si no está disponible un entorno estéril totalmente controlado. La presente invención permite que los costes de producción disminuyan significativamente haciendo posible trabajar en un entorno no estéril y mantener los niveles de endotoxinas cumpliendo la monografía de EP. La presente invención utiliza cromatografía de intercambio iónico en la que los medios de intercambio iónico son un intercambiador aniónico de tipo básico fuerte. Los medios de intercambio aniónico fuertes pueden ser amonio cuaternario. La cromatografía de intercambio iónico es el método de despirogenización más común para proteínas; sin embargo, tiene varias desventajas, que limitan su utilidad como etapa de despirogenización. Estas incluyen problemas de manipulación y de uso tales como empaquetado, canalización, velocidades de flujo bajas, tiempos de regeneración largos, compresibilidad y estabilidad química limitada. Las velocidades de flujo pequeñas y la propensión a las incrustaciones significan que incorporar resinas de cromatografía en las etapas de purificación a escala de procedimiento puede ser caro y problemático. Una tecnología de membrana de intercambio iónico de alta capacidad, ampliable a escala y lista para usar, proporciona despirogenización en el procedimiento. Mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico con intercambiadores aniónicos de tipo básico fuerte, los niveles de endotoxinas pueden disminuirse mucho más.
- 50
- 55

Tal como se describió en detalle anteriormente, la secuencia de la etapa de purificación es importante para desarrollar un procedimiento puro, simple, eficaz y comercialmente económico y más estable para la expresión de alto nivel de G-CSF.

5 La etapa de intercambio catiónico se realiza siguiendo la etapa de desalado que permite la eliminación de componentes de sal elevados.

La importancia de la secuencia también se muestra mediante los datos cromatográficos en la figura 3 a continuación mediante análisis SDS-PAGE. Las muestras marcadas con la flecha, en la 3ª y 4ª fila entre 29 y 45 kDa en el marcador de referencia, son las que se eliminan mediante la etapa de intercambio catiónico.

10 En una realización preferida de la invención, el G-CSF biológicamente activo obtenido usando el procedimiento de la presente invención puede usarse para la preparación de medicamentos.

Según esta realización de la invención, uno de los medicamentos es el producto biofarmacéutico fabricado según el procedimiento de la invención descrita que consiste en

a) 30-100 MU (300 - 1000 µg) de rmetHuG-CSF

b) 0,50 - 0,80 mg de acetato, preferiblemente 0,59 mg de acetato

15 c) 25 - 100 mg de sorbitol

d) 0,01 - 0,10 mg de polisorbato 80

e) agua para inyección

f) el pH se ajusta con hidróxido de sodio

en 1 ml de disolución estéril.

20 Tales medicamentos están indicados para una amplia gama de indicaciones e incluyen neutropenia y secuelas clínicas relacionadas con la neutropenia, neutropenia crónica, infecciones neutropénicas y no neutropénicas, reducción de la hospitalización para neutropenia febril tras quimioterapia citotóxica y para la reducción en la duración de neutropenia en pacientes que se someten a terapia mieloablativa seguida por trasplante de médula ósea que se considera que corren riesgo aumentado de neutropenia grave prolongada.

25 El G-CSF también está indicado para la movilización de células progenitoras de sangre periférica (PBPC) y estados inflamatorios crónicos.

Su administración a largo plazo está indicada para aumentar el recuento de neutrófilos y para reducir la incidencia y duración de acontecimientos relacionados con la infección, el tratamiento de neutropenia persistente en pacientes con infección por VIH avanzada, con el fin de reducir el riesgo de infecciones bacterianas.

30 El G-CSF también está indicado para mejorar el desenlace clínico en pacientes en la unidad de cuidados intensivos y pacientes enfermos críticos, cicatrización y tratamiento de heridas/úlceras cutáneas/quemaduras, intensificación de quimioterapia y/o radioterapia, aumento de citocinas antiinflamatorias, potenciación de los efectos antitumorales de la terapia fotodinámica.

35 Está indicado para la prevención y el tratamiento de enfermedades provocadas por diferentes disfunciones cerebrales, tratamiento de enfermedades tromboticas y sus complicaciones y recuperación tras la irradiación de eritropoyesis. También puede usarse para el tratamiento de cualquier otra enfermedad, para las que el G-CSF está indicado.

40 Por tanto, puede administrarse una composición biofarmacéutica que contiene el G-CSF puro y biológicamente activo obtenido mediante el procedimiento de la invención a pacientes, niños o adultos, en una cantidad terapéutica que es eficaz en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

La presente invención se describe adicionalmente haciendo referencia al siguiente ejemplo. Aunque el ejemplo no pretende limitar el alcance de la presente invención, debe considerarse a la luz de la descripción detallada anteriormente.

### **Ejemplo**

45 **Desalado**

Se separa G-CSF de agentes caotrópicos y del par oxidante/reductor así como de otras impurezas relacionadas con el procedimiento y sales tampón de la etapa de solubilización y replegado. En esta etapa el producto intermedio es un concentrado de la etapa de TFF que comprende sales que necesitan separarse de G-CSF y eliminarse. La fase móvil para esta etapa es una disolución acuosa de pH=5,4 con un valor de conductividad de 1,0 - 2,0 uS/cm que

comprende acetato de sodio 20 mM y sorbitol 50 mg/ml. Al inyectarse la muestra en la columna, se monitorizan cuidadosamente la absorbancia y el valor de conductividad de la disolución de salida a una longitud de onda de 280 nm para determinar la absorbancia y a aproximadamente 1,35  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para determinar la conductividad. Se mantiene la línea base para cada parámetro hasta que se eluyen las moléculas. Puesto que las moléculas proteicas se eluyen en primer lugar, el primer pico observado está en la línea base de absorbancia que corresponde a la de la proteína que sale de la columna. Se separa el producto hasta que se eluye el primer pico. Entonces otro material proteico con moléculas más pequeñas de G-CSF da otro pico de UV que eluye justo antes de un aumento de la conductividad que corresponde a la elución de sales.

#### Intercambio catiónico

10 Se retira el G-CSF plegado apropiadamente de sus impurezas y se purifica. Se toma el producto intermedio tras la etapa de desalado y se alimenta a una columna de intercambio catiónico con fase móvil A que tiene  $\text{pH}=5,4$ , que tiene un valor de conductividad de 1,0 - 2,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , que comprende acetato de sodio 20 mM y sorbitol 50 mg/ml. Mientras se alimenta a la columna, se mantiene la línea base de UV a 280 nm. El aumento en la línea base es la señal de la capacidad de retención de la columna. Debe elegirse un volumen de columna apropiado para evitar la saturación de la columna. Tras alimentar la muestra, el procedimiento de purificación continúa con inyección de fase móvil B gradual en la columna con un programa en gradiente para permitir la separación de proteínas e impurezas.

15 La fase móvil B tiene  $\text{pH}=5,4$ , tiene un valor de conductividad de 40 - 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , comprende acetato de sodio 20 mM, sorbitol 50 mg/ml y NaCl 0,5 M. Su valor de conductividad superior permite el cambio de la concentración de sal en la columna para separar las proteínas.

20 Filtración en gel para la etapa final

Se recupera G-CSF directamente en el tampón de formulación. En esta etapa el producto intermedio está en el tampón de salida de intercambio catiónico que contiene NaCl 0,1 - 0,5 M. Puesto que el producto es para inyección i.v., la sal y el producto deben separarse, por tanto se realiza cromatografía de filtración en gel. Tal como se mencionó anteriormente, la fase móvil para esta etapa es el tampón de formulación que es una disolución acuosa con un valor de  $\text{pH}$  de 4,0, que comprende tampón acetato 10 mM y sorbitol 50 mg/ml y polisorbato 80 al 0,004%. Al inyectarse la muestra en la columna, se monitoriza cuidadosamente la absorbancia y el valor de conductividad de la disolución de salida a una longitud de onda de 280 nm para determinar la absorbancia y aproximadamente 1,35  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para determinar la conductividad. Se mantiene la línea base para cada parámetro hasta que se eluyen las moléculas. Puesto que las moléculas proteicas se eluyen en primer lugar, el primer pico observado está en la línea base de absorbancia que corresponde a la de la proteína que sale de la columna. Se separa el producto hasta que se monitoriza un aumento de conductividad que corresponde a que está teniendo lugar la elución de sales.

25

30

#### Intercambio iónico

Esta es la etapa opcional en la que el producto que contiene G-CSF puede separarse adicionalmente de sus impurezas de endotoxinas. En esta etapa, se alimenta el producto final que es G-CSF recuperado en tampón de formulación como en la etapa de filtración en gel, a una columna de intercambio iónico continuamente de manera que recircula durante varias veces y al final la muestra libre de endotoxinas se esteriliza por filtración para el llenado.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para asilar y purificar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de un microorganismo que produce G-CSF que consiste en las siguientes etapas;
  - 5 a) lisar el microorganismo ajustando la densidad y la temperatura de una suspensión de pasta celular y separar material insoluble que comprende G-CSF,
  - b) aislar el cuerpo de inclusión (IB) que comprende G-CSF en presencia de agente tensioactivo iónico
  - c) solubilizar el G-CSF presente en el material insoluble, usando un agente caotrópico altamente concentrado y un agente desnaturalizante que es tris(2-carboxietil)fosfina HCl (TCEP)
  - d) oxidar el G-CSF en presencia de cistina/cisteína siendo la razón molar de 1:10,
  - 10 e) replegar el G-CSF en condiciones de temperatura controlada mediante un método de una etapa,
  - f) concentrar la disolución de G-CSF replegado usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) que usa cartuchos o casetes con un punto de corte de peso molecular de 5-12 KDa,
  - g) desalar la disolución de G-CSF concentrada en una columna de temperatura controlada y separar la disolución de G-CSF del caótropro mediante filtración en gel,
  - 15 h) someter la disolución de G-CSF a cromatografía de intercambio catiónico,
  - i) recuperar el G-CSF purificado en tampón de formulación en forma estable,
  - j) eliminar endotoxinas usando cromatografía de intercambio aniónico de tipo básico fuerte.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el G-CSF es metionil-G-CSF humano recombinante (rmetHuG-CSF).
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 y 2, en el que la densidad de la pasta celular no es menor de 8 ml de tampón de resuspensión por gramo de IB y la temperatura es de entre 5 y 20°C.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 y 2, en el que el agente tensioactivo iónico en la etapa de aislamiento es desoxicolato de sodio.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el agente caotrópico altamente concentrado en la etapa de solubilización es guanidinio HCl en concentraciones de entre 5,4 M y 6,6 M.
- 25 6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la temperatura en la etapa de replegado es de entre 7 y 15°C.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la columna de filtración en gel es Sephadex G-25 Fine.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el tamaño de partícula de perlas de Sephadex G25 Fine es de entre 20 y 300 µm.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la columna se estabiliza en una temperatura de entre 4 y 20°C grados en la etapa de desalado.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la cromatografía de intercambio catiónico consiste en sulfopropilo.
- 35 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que el tampón de formulación estable en la etapa de recuperación es una disolución acuosa de tampón acetato 10 mM, sorbitol al 5% y polisorbato 80 al 0,004% ajustado a pH 4,0.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico de tipo básico fuerte usada en la eliminación de las endotoxinas consiste en amonio cuaternario.
- 40 13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que en la etapa c) el pH es de desde 7,5 hasta 9,0.
14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, en el que en la etapa e) el pH es de desde 7,0 hasta 8,0.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo que produce G-CSF es *E. coli*.
- 45 16. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende además la etapa de formular el rmetHuG-CSF

según una composición que consiste en:

- a) 30-100 MU (300 - 1000  $\mu$ g) de rmetHuG-CSF
  - b) 0,50-0,80 mg de acetato
  - c) 25-100 mg de sorbitol
  - d) 0,01-0,10 mg de polisorbato 80
  - e) agua para inyección
  - f) hidróxido de sodio o ácido acético para el ajuste de pH
- en 1 ml de disolución estéril.

5

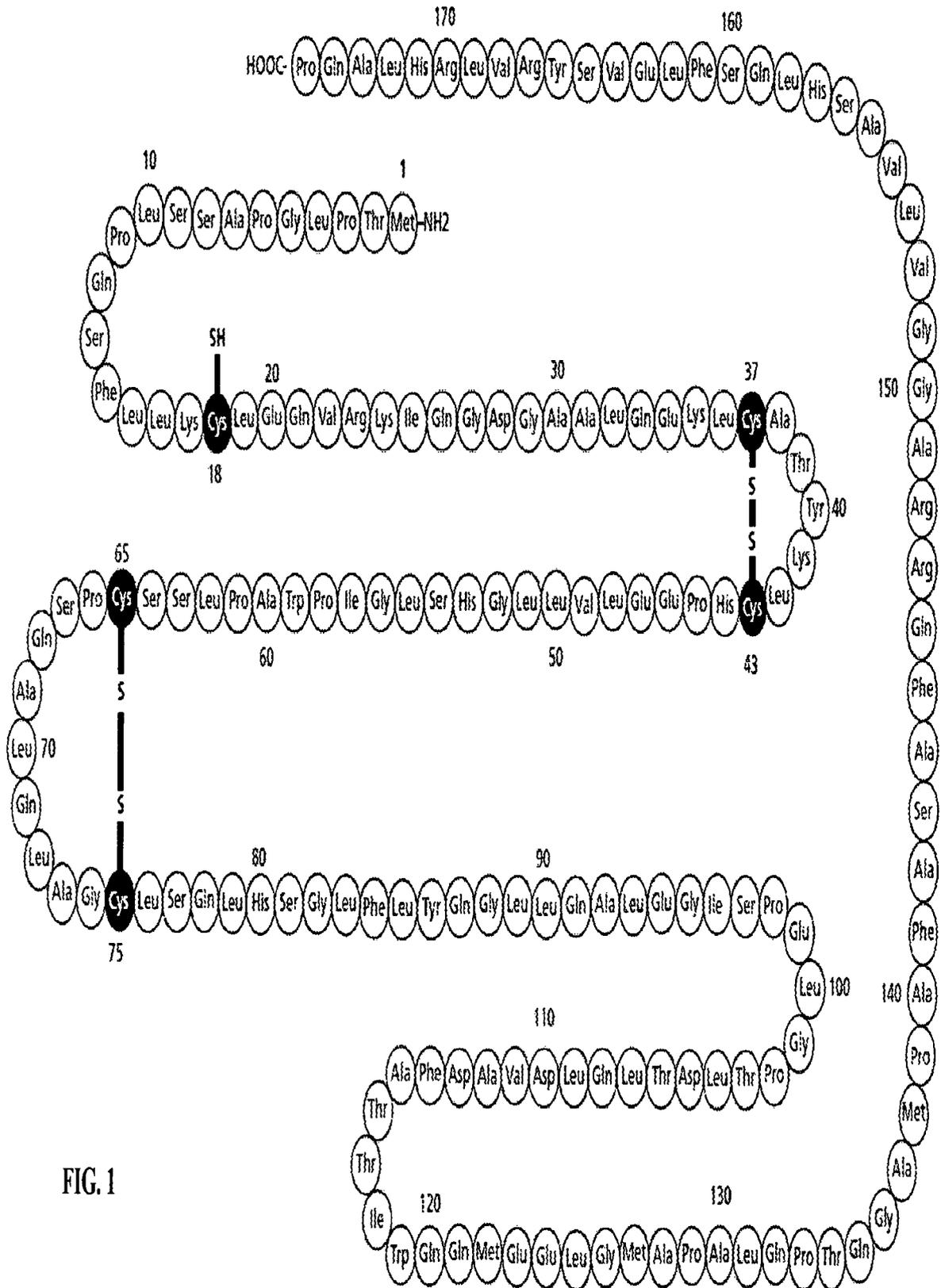


FIG. 1

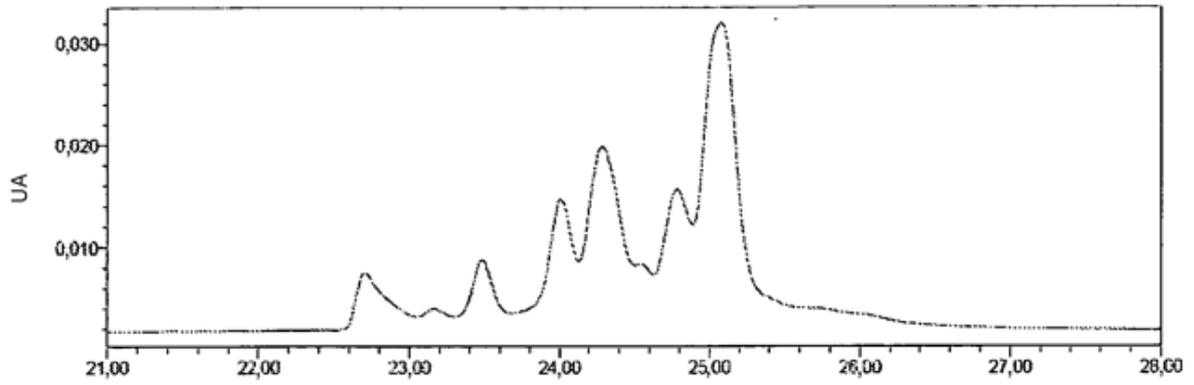


FIG. 2

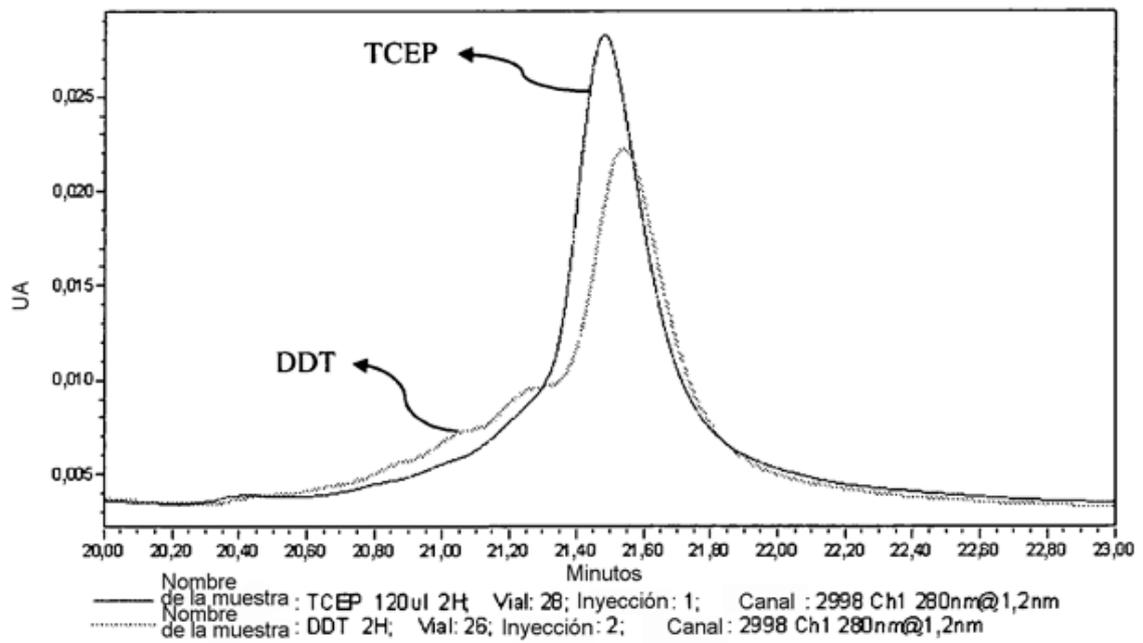
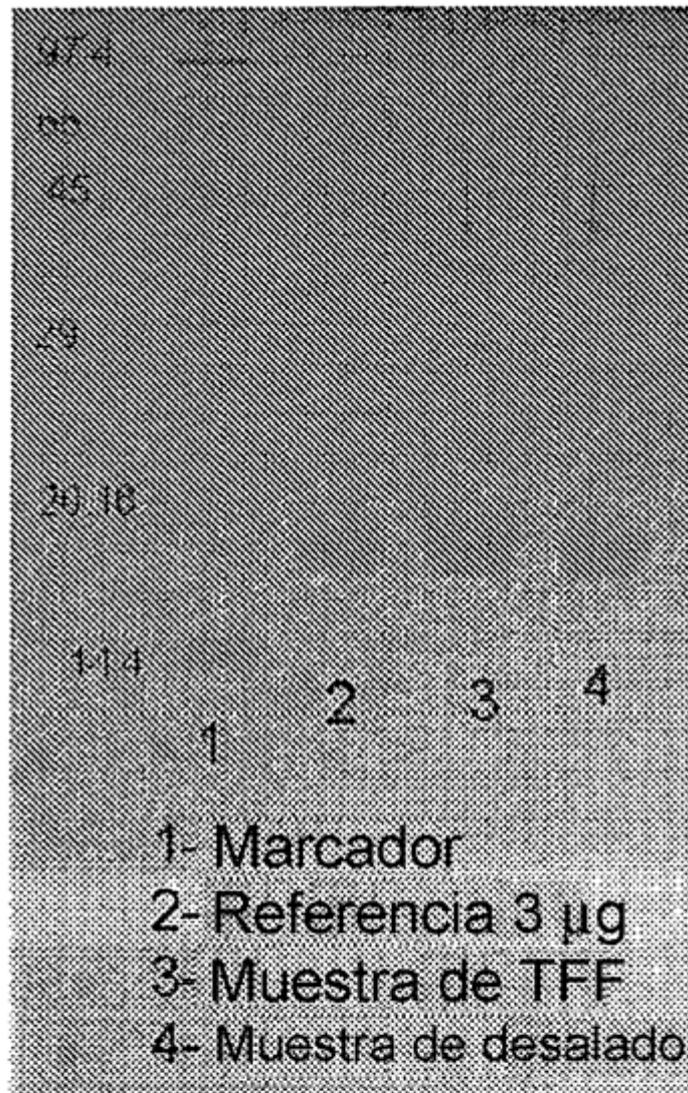


FIG. 3



**FIG. 4**