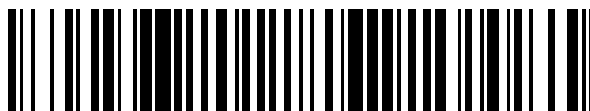


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 048**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011** **E 11754693 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014** **EP 2616101**

54 Título: **Procedimiento para purificar eritropoyetina pegilada**

30 Prioridad:

14.09.2010 EP 10176616

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

29.09.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FALKENSTEIN, ROBERTO;
KOEHNLEIN, WOLFGANG;
KUHNE, WOLFGANG y
SCHURIG, HARTMUT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 500 048 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 para purificar eritropoyetina pegilada

- 5 Se reseña en la presente memoria un procedimiento para purificar eritropoyetina PEGilada con un procedimiento de elución en gradiente lineal en una columna SP Sephacryl S 500 HR.

Antecedentes de la invención

- 10 Las proteínas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Para aplicación humana, cada proteína terapéutica tiene que satisfacer distintos criterios. Para asegurar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos frente a seres humanos, los subproductos que se acumulan durante el proceso de producción tienen que retirarse especialmente. Para cumplir los reglamentos reguladores, tienen que seguir al proceso de fabricación una o más etapas de purificación. Entre otras cosas, pureza, productividad y rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación de un proceso de purificación apropiado.

- 15 Se han reseñado conjugados de proteínas terapéuticas, por ejemplo, para polietilenglicol (PEG) e interleucina 6 (documento EP 0.442.724), para PEG y eritropoyetina (documento WO 01/02017), para moléculas químicas que comprenden endostatina e inmunoglobulinas (documento (US 2005/008649), para proteínas de fusión basadas en anticuerpo secretadas (documento US 2002/147311), para polipéptidos de fusión que comprenden albúmina (documento US 2005/0100991; seroalbúmina humana, documento US 5.876.969), para polipéptidos PEGilados (documento US 2005/0114037) y para fusiones de eritropoyetina.

- 20 Necina, R., *et al.* (Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698) ha reseñado la captura de anticuerpos monoclonales humanos directamente de sobrenadantes de cultivo celular por medios de intercambio iónico que exhiben una alta densidad de carga. En el documento WO 89/05157, se reseña un procedimiento para la purificación de inmunoglobulinas de producto sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. Se describe una purificación de una etapa de anticuerpos monoclonales de IgG de ascitis de ratón por Danielsson, A., *et al.*, J. Immun. Meth. 115 (1988) 79-88. Se reseña un procedimiento para purificar un polipéptido por cromatografía de intercambio iónico en el documento WO 2004/024866, en que se usa un lavado en gradiente para resolver un polipéptido de interés de uno o más contaminantes. En el documento EP 0.530.447, se reseña un proceso para purificar anticuerpos monoclonales de IgG mediante una combinación de tres etapas cromatográficas. Se reseña una purificación sencilla de antagonista de receptor de interleucina 1 mono-PEGilado por Yu, G., *et al.*, Process Biotechnol. 42 (2007) 971-977. Wang, H., *et al.*, Peptides 26 (2005) 1213-1218 reseña la purificación de hTFF3 expresada en *E. coli* mediante una cromatografía de intercambio catiónico de dos etapas. Yun, Q., *et al.* (Yun, Q., *et al.*, J. Biotechnol. 118 (2005) 67-74) reseña la purificación de rhG-CSF PEGilada mediante dos etapas de cromatografía de intercambio iónico consecutivas. Los documentos WO 2009/010271 y WO 2009/010270 dan a conocer un procedimiento de purificación de eritropoyetina PEGilada en dos etapas de cromatografía.

Sumario de la invención

- 40 Se reseña en la presente memoria un procedimiento para la purificación de un conjugado de proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol de los subproductos de reacción o material de partida no reaccionado mediante un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico. Se ha encontrado que, empleando el material de cromatografía de intercambio catiónico SP Sephacryl S 500 HR y elución en gradiente lineal, mediante lo cual se ha aplicado a la columna una solución tamponada de una conductividad definida por adelantado, puede obtenerse la proteína conjugada que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol en una sola etapa con alta pureza y rendimiento.

- 50 Por tanto, se reseña en la presente memoria como un aspecto un procedimiento para obtener una proteína de fusión que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol que comprende las siguientes etapas:

- 55 a) aplicar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a una columna de cromatografía que comprende el material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR,
- b) aplicar una solución que comprende una mezcla de eritropoyetina libre así como proteínas de fusión de eritropoyetina y polietilenglicol con uno o más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina a la columna de a),
- 60 c) aplicar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a la columna y recuperar así las proteínas de fusión que comprenden dos o más residuos de polietilenglicol,
- d) aplicar una solución de conductividad creciente de forma continua y lineal hasta un valor final de al menos 60 mS/cm a la columna y recuperar así separadamente la proteína de fusión que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol y la eritropoyetina libre, mediante lo cual se obtiene en primer lugar la

proteína de fusión que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol.

En una realización, la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5. En una realización, la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución tamponada con fosfato con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5.

En una realización, la solución aplicada en la etapa d) tiene un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5. En una realización, la aplicación de una solución de conductividad creciente de forma continua y lineal es hasta un valor de conductividad final de aproximadamente 70,0 mS/cm.

En una realización, la solución de conductividad creciente de forma continua y lineal es una solución de concentración de cloruro de sodio creciente de forma continua y lineal.

En una realización, la eritropoyetina es eritropoyetina humana. En una realización, la eritropoyetina humana tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 01 o SEQ ID NO: 02.

En una realización, el único residuo de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20 a 40 kDa.

En una realización, la solución que comprende una mezcla de eritropoyetina libre y proteínas de fusión de eritropoyetina y polietilenglicol con uno o más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina se aplica al material de cromatografía de modo que se aplique de 1 a 4 mg de proteína de fusión a 1 ml de material de cromatografía.

Descripción de la invención

Se reseña en la presente memoria un procedimiento para purificar una proteína que comprende una molécula de eritropoyetina y un residuo de polietilenglicol, con un procedimiento de elución en gradiente en el que el gradiente es un gradiente lineal de conductividad en una columna SP Sephacryl S 500 HR, mediante lo cual se aplica una solución de conductividad definida a la columna de cromatografía antes de la aplicación de la solución que comprende la proteína.

Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos para un especialista en la materia. Véanse, por ejemplo, Heftmann, E., (ed.), "Chromatography", 5ª edición, "Part A: Fundamentals and Techniques", Elsevier Science Publishing Company, Nueva York (1992); Deyl, Z., (ed.), "Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences", Elsevier Science BV, Amsterdam, Holanda (1998); Poole, C.F. y Poole, S.K., "Chromatography Today", Elsevier Science Publishing Company, Nueva York (1991); Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice", Springer Verlag (1982); Sambrook, J., *et al.*, (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) o Ausubel, F.M., *et al.*, (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1987-1994).

El término "aplicar a" designa una etapa parcial de un procedimiento de purificación en que se pone en contacto una solución con un material de cromatografía. Esto designa que a) la solución se añade a un dispositivo cromatográfico en que está contenido el material de cromatografía o b) el material de cromatografía se añade a la solución. En el caso a), la solución pasa a través del dispositivo, permitiendo una interacción entre el material de cromatografía y las sustancias contenidas en la solución. Dependiendo de las condiciones, tales como por ejemplo pH, conductividad, concentración salina, temperatura y/o caudal, algunas sustancias de la solución se unen al material de cromatografía y, por tanto, pueden recuperarse del material de cromatografía en una etapa posterior. Las sustancias que permanecen en disolución pueden encontrarse en el flujo continuo. El "flujo continuo" designa la solución obtenida después del paso por el dispositivo, que puede ser la solución aplicada o una solución tamponada que se usa para lavar la columna o causar la elución de sustancias unidas al material de cromatografía. En una realización, el dispositivo es una columna o módulo. En el caso b), puede añadirse el material de cromatografía, por ejemplo en forma de sólido, a la solución, que contiene por ejemplo la sustancia de interés para purificar, permitiendo una interacción entre el material de cromatografía y las sustancias en disolución. Después de la interacción, se retira el material de cromatografía, por ejemplo por filtración, y se retira también la sustancia unida al material de cromatografía con el mismo de la solución, mientras que las sustancias no unidas al material de cromatografía permanecen en disolución.

El término "modo de unión y elución" designa un modo de operación de una etapa de cromatografía en que se aplica una solución que contiene una sustancia de interés para purificar a un material de cromatografía, mediante lo cual la sustancia de interés se une al material de cromatografía. Por tanto, la sustancia de interés se retiene sobre el material de cromatografía, mientras que las sustancias sin interés se retiran con el flujo continuo o sobrenadante. La sustancia de interés se recupera después del material de cromatografía en una segunda etapa con una solución de elución. En una realización, el procedimiento como se reseña en la presente memoria funciona en modo de unión y elución.

Las soluciones empleadas en el procedimiento como se reseña en la presente memoria son soluciones brutas o tamponadas. El término "solución tamponada" designa una solución en que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o alcalinas se compensan por la sustancia tampón disuelta. Puede usarse cualquier sustancia tampón con dichas propiedades. Se usan generalmente sustancias tampón farmacéuticamente aceptables. En una realización, se selecciona la solución tamponada de una solución tamponada con fosfato consistente en ácido fosfórico y/o sales del mismo, o una solución tamponada con acetato consistente en ácido acético y sales del mismo, o una solución tamponada con citrato consistente en ácido cítrico y/o sales del mismo, o una solución tamponada con morfolina, o una solución tamponada con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, o una solución tamponada con histidina, o una solución tamponada con glicina, o una solución tamponada con tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). En una realización, la solución tamponada se selecciona de una solución tamponada con fosfato, o una solución tamponada con acetato, o una solución tamponada con citrato o una solución tamponada con histidina. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio.

Los términos "elución continua" y "procedimiento de elución continua", que se usan intercambiamente en esta solicitud, designan un procedimiento en el que se cambia la conductividad de la solución que causa la elución, concretamente la recuperación, de un compuesto unido de un material de cromatografía, concretamente se eleva o reduce continuamente, concretamente la concentración se cambia mediante una secuencia de etapas pequeñas cada una menor de un cambio de 2 o 1 % de la concentración de la sustancia que causa la elución. En esta "elución continua", pueden cambiarse una o más condiciones, por ejemplo pH, fuerza iónica, concentración de sal y/o flujo de cromatografía, de forma lineal o exponencial o asintótica. En una realización, el cambio es lineal.

El término "material de cromatografía de intercambio iónico" designa una matriz inmóvil de alto peso molecular que porta sustituyentes cargados unidos covalentemente usados como fase estacionaria en cromatografía de intercambio iónico. Para la neutralidad de carga global, se unen al mismo contraiones no unidos covalentemente. El "material de cromatografía de intercambio iónico" tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos covalentemente por iones cargados similares de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, se hace referencia a la "resina de intercambio iónico" como resina de intercambio catiónico o resina de intercambio aniónico. Dependiendo de la naturaleza del grupo cargado (sustituyente), se hace referencia a la "resina de intercambio iónico" como, por ejemplo en el caso de resinas de intercambio catiónico, resina de ácido sulfónico (S) o resina de sulfopropilo (SP) o resina de carboximetilo (CM).

Los métodos y procedimientos para convertir una secuencia aminoacídica, por ejemplo de un polipéptido, en la correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica esta secuencia aminoacídica son bien conocidos para el especialista en la materia. Por lo tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácido nucleico consistente en nucleótidos individuales e igualmente por la secuencia aminoacídica del polipéptido codificado por el mismo.

El término "polietilenglicol" o "residuo de polietilenglicol" designa un residuo no proteico que contiene polietilenglicol como parte esencial. Dicho residuo de polietilenglicol puede contener grupos químicos adicionales que son necesarios para reacciones de unión, que son el resultado 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 usan para el cálculo del peso molecular del residuo de polietilenglicol. Además, dicho residuo de polietilenglicol puede consistir en una o más cadenas de polietilenglicol que están ligadas covalentemente entre sí. Los residuos de polietilenglicol con más de una cadena de PEG se denominan residuos de polietilenglicol de múltiples brazos o ramificados. Los residuos de polietilenglicol ramificados pueden prepararse, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a diversos polioles, incluyendo glicerol, pentaeritritol y sorbitol. Los residuos de polietilenglicol ramificados se reseñan, por ejemplo, en los documentos EP 0.473.084 y US 5.932.462. En una realización, el residuo de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20 a 35 kDa y es un residuo de polietilenglicol lineal. En otra realización, el residuo de polietilenglicol es un residuo de polietilenglicol ramificado con un peso molecular de 35 a 40 kDa.

El término "fusión de eritropoyetina con un residuo de polietilenglicol" designa un ligamiento covalente introducido químicamente de un residuo de polietilenglicol en el extremo N o en un residuo de lisina interno de la eritropoyetina. La fusión da como resultado un conjugado de proteína que comprende una molécula de eritropoyetina y uno o más residuos de polietilenglicol. El proceso de fusión se designa también como PEGilación y el producto del mismo como eritropoyetina PEGilada. La fusión/conjugación de polipéptidos con residuos de polietilenglicol es ampliamente conocida en el estado de la técnica y se revisa, por ejemplo, en Veronese, F.M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. El residuo de polietilenglicol puede ligarse usando diferentes grupos funcionales. Pueden usarse polietilenglicoles con diferentes pesos moleculares, diferentes formas así como diferentes grupos de ligamiento (véanse 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 fusión de eritropoyetina y un residuo de polietilenglicol puede efectuarse en solución acuosa con reactivos de residuo de polietilenglicol como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/44785. La fusión puede efectuarse también en fase sólida según Lu, Y., *et al.*, *Reactive Polymers* 22 (1994) 221-229. Puede producirse también una fusión N-terminal no aleatoria según el documento WO 94/01451.

Los términos “fusionar eritropoyetina y polietilenglicol” y “PEGilación” designan la formación de un ligamiento covalente entre un residuo de polietilenglicol y el extremo N y/o un residuo de lisina interno de la eritropoyetina para obtener un conjugado de proteína que comprende una molécula de eritropoyetina y un residuo de polietilenglicol. En una realización, se efectúa la PEGilación de eritropoyetina en solución acuosa usando moléculas de PEG lineales o ramificadas activadas con NHS de un peso molecular de entre 5 y 40 kDa.

El término “en condiciones adecuadas para la unión” y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en esta solicitud designa que una sustancia de interés, por ejemplo, eritropoyetina PEGilada, se une a una fase estacionaria cuando se pone en contacto con ella, por ejemplo, un material de intercambio iónico. Esto no designa necesariamente que se una el 100 % de la sustancia de interés, sino que se une esencialmente el 100 % de la sustancia de interés, concretamente que se une al menos un 50% de la sustancia de interés, que se une al menos un 75% de la sustancia de interés, que se une al menos un 85 % de la sustancia de interés o que se une más de un 95 % de la sustancia de interés a la fase estacionaria.

La fusión o conjugación química de eritropoyetina y polietilenglicol da generalmente como resultado una mezcla de diferentes compuestos, tales como eritropoyetina poli-PEGilada, eritropoyetina mono-PEGilada, eritropoyetina no PEGilada, productos de hidrólisis de éster de PEG activado, así como productos de hidrólisis de la eritropoyetina misma. Para obtener una eritropoyetina mono-PEGilada en forma sustancialmente homogénea, estas sustancias tienen que separarse.

Por lo tanto, es un aspecto como se reseña en la presente memoria proporcionar un procedimiento para producir un conjugado de proteína que comprende una molécula de eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol en forma sustancialmente homogénea, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas

- a) conjugar eritropoyetina y polietilenglicol usando un éster de polietilenglicol activado de un peso molecular de 20 a 40 kDa,
- b) aplicar los conjugados obtenidos en la etapa a) a un material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR al que se ha aplicado una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm,
- c) recuperar la proteína, que comprende una molécula de eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol (eritropoyetina mono-PEGilada), en forma sustancialmente homogénea mediante una elución en gradiente lineal de conductividad y producir así el conjugado de proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol.

[En una realización, el material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR está en una columna de cromatografía. Este procedimiento es especialmente útil para la purificación de eritropoyetina recombinante PEGilada que está glucosilada, concretamente, que se ha producido por una célula de mamífero, en una realización por una célula CHO, o una célula HEK293, o una célula BHK, o una célula Per.C6® o una célula HeLa, y después se PEGila químicamente.

En la primera etapa del procedimiento, la eritropoyetina se PEGila. Las moléculas de polímero de polietilenglicol (PEG) usadas en la reacción de PEGilación tienen un peso molecular de aproximadamente 20 a 40 kDa (el término “peso molecular” como se usa en la presente memoria se entiende que significa peso molecular medio del PEG, porque el PEG como compuesto polimérico no se obtiene con un peso molecular definido, sino que de hecho tiene una distribución de peso molecular; el término “aproximadamente” indica que, en las preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular indicado, concretamente el término aproximadamente hace referencia a una distribución de peso molecular en que un 95 % de las moléculas de PEG tienen un peso molecular dentro del ± 10 % del peso molecular indicado. Por ejemplo, un peso molecular de 30 kDa designa un intervalo de 27 a 33 kDa.

El término “eritropoyetina” y su abreviatura “EPO” hacen referencia a una proteína que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o a una proteína o polipéptido sustancialmente homólogo de la misma, cuyas propiedades biológicas se refieren a la estimulación de la producción de eritrocitos y la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritroides dedicados en la médula ósea. La eritropoyetina recombinante puede prepararse mediante la expresión en células eucarióticas, por ejemplo en células CHO, o células BHK, o células HeLa, mediante tecnología de ADN recombinante o activación génica endógena, concretamente la glucoproteína eritropoyetina se expresa mediante activación génica endógena, véanse, por ejemplo, los documentos 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 es EPO humana. En una realización, la eritropoyetina humana tiene la secuencia aminoacídica fijada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización, la eritropoyetina humana tiene la secuencia aminoacídica fijada en la SEQ ID NO: 1. El término “eritropoyetina” designa también variantes de la proteína de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en que uno o más residuos aminoacídicos se han cambiado, eliminado o insertado y que tiene una actividad biológica comparable a la

de la proteína no modificada tal como se reseña, por ejemplo, en los documentos EP 1.064.951 o US 6.583.272. Una variante puede tener la secuencia aminoacídica de la eritropoyetina humana que tiene de 1 a 6 sitios adicionales para glucosilación. La actividad específica de la eritropoyetina PEGilada puede determinarse mediante diversos ensayos conocidos en la materia. La actividad biológica de la eritropoyetina PEGilada purificada es tal que la administración de la proteína mediante inyección a pacientes humanos da como resultado la producción aumentada en células de médula ósea de reticulocitos y eritrocitos en comparación con grupos de sujetos no inyectados o de control. La actividad biológica de la eritropoyetina PEGilada obtenida y purificada de acuerdo con el procedimiento que se reseña en la presente memoria puede ensayarse mediante los procedimientos según Bristow, A., Pharmeuropa Spec. Issue Biologicals BRP Erythropoietin Bio 97-2 (1997) 31-48.

Pueden prepararse variantes de secuencia aminoacídica de eritropoyetina introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica la eritropoyetina, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de residuos en las secuencias aminoacídicas de la eritropoyetina. Puede hacerse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, a condición de que el constructo final posea una actividad biológica comparable a la eritropoyetina humana.

Se muestran en la Tabla 1 las sustituciones aminoacídicas conservativas bajo el encabezamiento "sustituciones preferidas". Se proporcionan más cambios sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones ejemplares" y como se describe a continuación con referencia a las clases de cadena lateral aminoacídica. Pueden introducirse sustituciones aminoacídicas en eritropoyetina humana y cribarse en los productos la retención de la actividad biológica de la eritropoyetina humana.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse según las propiedades de cadena lateral comunes:

- 1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

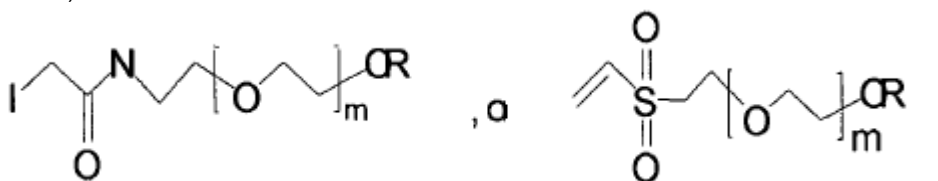
Las sustituciones no conservativas conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

La PEGilación química de eritropoyetina generalmente da como resultado una preparación de proteína que comprende eritropoyetina que está PEGilada en uno o más grupos ϵ -amino de residuos de lisina y/o el grupo amino N-terminal. Puede efectuarse la PEGilación selectiva en el aminoácido N-terminal según Felix, A.M., *et al.*, ACS Symp. Ser. 680 "(Poly(ethylene glycol))" (1997) 218-238. Puede conseguirse una PEGilación N-terminal selectiva durante la síntesis en fase sólida acoplado un derivado aminoacídico N^o-PEGilado con el aminoácido terminal N-1 de la cadena peptídica. La pegilación de la cadena lateral puede efectuarse durante la síntesis en fase sólida

acoplado derivados de lisina N^ε-PEGilados con la cadena creciente. Es factible la PEGilación N-terminal y de cadena lateral combinada como se describe anteriormente en la síntesis en fase sólida o mediante síntesis en fase de disolución, aplicando reactivos de PEG activados a un péptido aminodesprotegido.

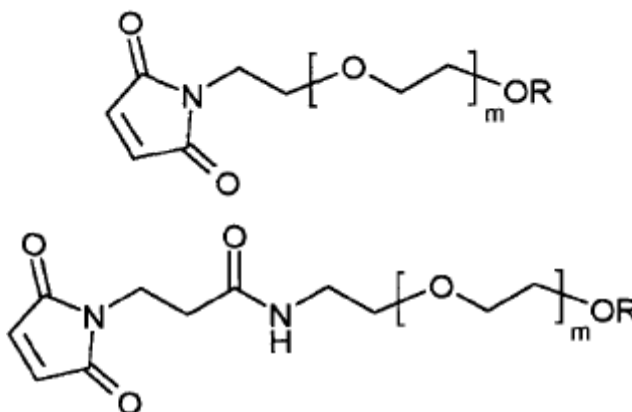
5 Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular, como en una realización, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 kDa, en otra realización de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 kDa y en una realización adicional de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 kDa. Los derivados de PEG pueden ser PEG lineales o ramificados. Están disponibles una amplia variedad de derivados de PEG adecuados para uso en la preparación de conjugados de PEG-proteína y PEG-péptido.

10 Los derivados de PEG activados son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M., *et al.*, J. Bioconjug. Chem., 7 (1996) 363-368, para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y ramificada son adecuadas para la preparación de fragmentos PEGilados. Son ejemplos de reactivos de PEG yodoacetilmetoxi-PEG o metoxi-PEG-vinilsulfona (m es en una realización un entero de aproximadamente 450 a aproximadamente 900 y R es alquilo inferior, lineal o ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, isopropilo, etc., prefiriéndose metilo):



20 El uso de estas sustancias yodoactivadas es conocido en la materia y se describe, por ejemplo, por Hermanson, G. T., en "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego (1996) pág. 147-148.

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-hidroxisuccinimida tal como PEG-NHS (Monfardini, C., *et al.*, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69). En una realización, el PEG se activa por éster de N-hidroxisuccinimida



25 usando alcoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida, tal como metoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida (PM 30000), en la que R y m son como se definen anteriormente. En una realización, la especie de PEG es el éster N-hidroxisuccinimidilo del ácido metoxipolietilenglicolbutírico. El término "alcoxi" hace referencia a un grupo alquiléter en que el término "alquilo" significa un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene un máximo de 4 átomos de carbono, tal como metoxilo, etoxilo, n-propoxilo y similares, preferiblemente metoxilo.

30 El término "forma sustancialmente homogénea" designa que la proteína de fusión o conjugado de eritropoyetina obtenido, contenido o usado es aquel que tiene un número definido de residuos de PEG unidos. En una realización, la eritropoyetina PEGilada es una eritropoyetina mono-PEGilada. La preparación puede contener eritropoyetina no reaccionada (concretamente, que carece del grupo PEG), eritropoyetina poli-PEGilada, así como fragmentos del polipéptido generado durante la reacción de PEGilación. El término "forma sustancialmente homogénea" designa que una preparación de eritropoyetina mono-PEGilada contiene al menos un 50 % (p/p) de eritropoyetina mono-PEGilada, o al menos un 75% de eritropoyetina mono-PEGilada, o al menos un 90 % de eritropoyetina mono-PEGilada, o más de un 95 % de eritropoyetina mono-PEGilada. Los valores porcentuales están basados en el % de área del cromatograma correspondiente al procedimiento de cromatografía con el que se obtiene la eritropoyetina mono-PEGilada.

35 Se reseña en la presente memoria un procedimiento para la purificación de una eritropoyetina PEGilada para obtener una forma sustancialmente homogénea de una eritropoyetina mono-PEGilada. Se ha encontrado que el material de cromatografía tiene que acondicionarse antes de la aplicación de la preparación de eritropoyetina

PEGilada con una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm. Si el material de cromatografía se acondiciona con una conductividad menor, la separación de las diferentes especies de la preparación de eritropoyetina PEGilada es menos eficaz. Tampoco es ventajoso ajustar la conductividad de la solución de la preparación de eritropoyetina PEGilada antes de la aplicación al material de cromatografía. Además, también el uso de un procedimiento de gradiente en etapas es menos eficaz, ya que la eritropoyetina no PEGilada no puede recuperarse cuantitativamente del material de cromatografía. La recuperación de material de partida no reaccionado es ventajosa, ya que este puede reutilizarse en la reacción de PEGilación.

Por lo tanto, la actual invención proporciona un procedimiento para la obtención de una eritropoyetina mono-PEGilada usando un material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR en una sola etapa, aplicando en primer lugar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm al material de cromatografía y aplicando después la solución que comprende la preparación de eritropoyetina PEGilada al material de cromatografía. Se ha encontrado que la conductividad de la primera solución tiene que controlarse precisamente para asegurar la separación de los componentes individuales de la preparación de proteína bruta.

Por lo tanto, el procedimiento para obtener un conjugado de proteína, que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol como se reseña en la presente memoria, comprende las siguientes etapas:

- a) aplicar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a una columna de cromatografía que comprende el material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR;
- b) aplicar una solución que comprende una mezcla de eritropoyetina libre, así como conjugados de proteína de eritropoyetina y polietilenglicol con uno o más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina, a la columna de a);
- c) aplicar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a la columna y recuperar así el polietilenglicol libre y proteínas que comprenden dos o más residuos de polietilenglicol;
- d) aplicar una solución de conductividad creciente de forma continua y lineal hasta un valor final de aproximadamente 62,5 mS/cm a la columna y recuperar así separadamente la proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol y la eritropoyetina libre, obteniéndose en primer lugar la proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol.

Se ha encontrado que, para asegurar la separación de los componentes individuales de la preparación, tiene que aplicarse en primer lugar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm al material de cromatografía.

En una realización, el procedimiento es un procedimiento de cromatografía en columna.

En una realización, antes de la aplicación de una solución que comprende la preparación de eritropoyetina PEGilada, se aplica una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm durante hasta 8 volúmenes de columna al material de cromatografía. En una realización, la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5. En una realización, la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución tamponada con fosfato con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5.

Después de la aplicación de la solución que comprende la preparación de eritropoyetina PEGilada, se aplica una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a la columna y se recuperan así el polietilenglicol libre y las proteínas de fusión (concretamente conjugados de proteína) que comprenden dos o más residuos de polietilenglicol del material de cromatografía. En una realización, se aplica la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm durante hasta 8 volúmenes de columna al material de cromatografía.

Después de recuperar la eritropoyetina poli-PEGilada del material de cromatografía, se inicia una elución continua con un gradiente lineal de conductividad. La conductividad de la fase móvil que pasa por el material de cromatografía creciente de forma continua y lineal hasta al menos una conductividad de aproximadamente 62,5 mS/cm. En el gradiente lineal, se recupera primero la eritropoyetina mono-PEGilada de la columna y después se recupera la eritropoyetina no PEGilada sustancialmente homogénea. El aumento de conductividad es, en una realización, por aplicación de una solución con una concentración creciente de cloruro de sodio. En una realización, la solución aplicada para aumentar la conductividad tiene un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5. En una realización, el aumento de conductividad desde un valor de aproximadamente 21 mS/cm al valor final de al menos 62,5 mS/cm está dentro del volumen aplicado de fase móvil de 10 volúmenes de columna.

En una realización, la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución tamponada con fosfato de sodio o potasio aproximadamente 100 mM con un valor de pH de aproximadamente pH 3,0 con (concretamente que contiene) cloruro de sodio aproximadamente 120 mM.

En una realización, el gradiente lineal es un gradiente de concentración de cloruro de sodio de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 1000 mM de cloruro de sodio en una solución tamponada con fosfato de sodio o potasio aproximadamente 100 mM con un valor de pH de aproximadamente pH 3,0.

En una realización, se aplica la solución que comprende una mezcla de eritropoyetina libre y polietilenglicol libre, así como proteínas de fusión (concretamente conjugados de proteína) de eritropoyetina y polietilenglicol con uno o más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina, al material de cromatografía de modo que se aplica de 1 mg/ml hasta 4 mg/ml de proteína a 1 ml de material de cromatografía.

El término "material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR" designa un material de cromatografía de intercambio catiónico que designa también MacroCap SP (ambos disponibles en GE Healthcare). El material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR es, en una realización, un copolímero reticulado de alidextrano y N,N-metilenbisacrilamida con ácido sulfónico como grupo funcional cromatográfico y es, por tanto, un material de cromatografía de intercambio catiónico fuerte.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, cuyo verdadero alcance está expuesto en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procesos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 01 Secuencia aminoacídica de eritropoyetina humana
SEQ ID NO: 02 Secuencia aminoacídica de eritropoyetina humana.

Descripción de las figuras

Figura 1 Cromatograma de elución de una purificación de preparación de eritropoyetina PEGilada con un procedimiento como se reseña en la presente memoria .

Figura 2 Cromatogramas analíticos de SEC de las fracciones de pico 1, 2 y 3 de la Figura 1.

Figura 3 Cromatogramas analíticos de SEC de las fracciones de pico 1, 2 y 3 de una separación en la que la columna de cromatografía se ha acondicionado con una solución de alta conductividad.

Figura 4 Cromatograma de elución de una purificación de una preparación de eritropoyetina PEGilada con un procedimiento de elución por etapas.

Figura 5 Cromatogramas analíticos de SEC de las fracciones de pico 1, 2 y 3 (pico de regeneración) de la Figura 4.

Figura 6 Cromatograma de elución de una purificación de preparación de eritropoyetina PEGilada con un procedimiento como se reseña en la presente memoria con ajuste previo de la conductividad de la solución de muestra a 20 mS/cm.

Figura 7 Cromatogramas analíticos de SEC de las fracciones de pico 1, 2 y 3 de la Figura 6.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Cromatografía analítica de exclusión por tamaño:

resina: TSK 3000 (Tosohaas)

columna: 300 x 7,8 mm

caudal: 0,5 ml/min

solución de elución: fosfato de potasio 200 mM que contiene cloruro de potasio 250 mM, ajustada a pH 7,0

longitud de onda: 220 nm

Cromatografía de eritropoyetina PEGilada

resina: SP Sephacryl S 500 HR

volumen de lecho: 2,5 ml

carga de muestra: mg/ml de resina- variable (véanse los ejemplos siguientes)

caudal: 0,5 ml/min

soluciones: A: fosfato de potasio 100 mM, ajustada a pH 3,0

B: fosfato de potasio 100 mM, cloruro de sodio 1000 mM, ajustada a pH 3,0

solución de aplicación: 88 % de A y 12 % de B

solución de lavado: 88 % de A y 12 % de B

volumen de lavado: 20 ml (8 volúmenes de columna (VC))

solución de elución de gradiente lineal: 100 % de B

gradiente lineal: en 25 ml (10 volúmenes de columna) hasta 100 % de B
longitud de onda: 254 nm, 280 nm

Ejemplo 1

Cromatografía de una preparación de eritropoyetina PEGilada con un material de cromatografía SP-Sephacryl con acondicionamiento con una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm

Se efectuó la cromatografía de eritropoyetina PEGilada como se resume en la sección de Materiales y Procedimientos.

Se muestra en la figura 1 el cromatograma de elución para este procedimiento. Se muestran en la Figura 2A-C los cromatogramas analíticos de exclusión por tamaño de la fracción de pico 1 de eritropoyetina oligo-PEGilada, la fracción de pico 2 mono-PEGilada y la fracción de pico 3 no PEGilada.

TABLA 2

Especie de eritropoyetina	Pico lineal (fracción de pico 1) (%)	Pico de gradiente 1 (fracción de pico 2) (%)	Pico de gradiente 2 (fracción de pico 3) (%)
Oligo-PEGilada	92,2	12,1	0,1
Mono-PEGilada	7,8	87,7	7,3
No PEGilada	-	0,2	92,6

Ejemplo 2

Cromatografía de una preparación de eritropoyetina PEGilada con material de cromatografía SP-Sephacryl con acondicionamiento con una solución con una conductividad de aproximadamente 29 mS/cm

Se efectuó la cromatografía de eritropoyetina PEGilada como se resume en la sección de Materiales y Procedimientos con los siguientes parámetros diferentes:

- solución de aplicación: 80 % de A y 20 % de B
- solución de lavado: 80 % de A y 20 % de B
- volumen de lavado: 20 ml (8 volúmenes de columna (VC))
- tampón de elución de gradiente lineal: 100 % de B
- gradiente lineal: en 25 ml (10 volúmenes de columna) hasta 50 % de B.

Se muestran en la Figura 3A-C los cromatogramas analíticos de exclusión por tamaño de la fracción de pico 1 de eritropoyetina oligo-PEGilada, la fracción de pico 2 mono-PEGilada y la fracción de pico 3 no PEGilada.

TABLA 3

Especie de eritropoyetina	Pico lineal (fracción de pico 1) (%)	Pico de gradiente 1 (fracción de pico 2) (%)	Pico de gradiente 2 (fracción de pico 3) (%)
Oligo-PEGilada	98,0	18,5	-
Mono-PEGilada	2,0	81,5	7,0
No PEGilada	-	-	93,0

Ejemplo 3

Cromatografía de una preparación de eritropoyetina PEGilada con material de cromatografía SP-Sephacryl con acondicionamiento con una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm y elución por etapas con una solución con una conductividad de 37 mS/cm

Se efectuó la cromatografía de eritropoyetina PEGilada como se resume en los Materiales y Procedimientos.

Se muestra en la Figura 4 el cromatograma de elución para este procedimiento. Se muestran en la Figura 5A-C los cromatogramas analíticos de exclusión por tamaño de la fracción de pico 1 de eritropoyetina oligo-PEGilada, la fracción de pico 2 mono-PEGilada y la fracción de pico 3 no PEGilada. Ha de destacarse que la eritropoyetina no PEGilada podría recuperarse solo durante la regeneración de la columna y no con el procedimiento de elución por etapas.

TABLA 4

Especie de eritropoyetina	Material de partida (%)	Pico lineal (fracción de pico 1) (%)	Pico de gradiente 1 (fracción de pico 2) (%)	Pico de gradiente 2 (fracción de pico 3) (%)
Oligo-PEGilada	34,8	92,1	2,7	-
Mono-PEGilada	45,3	7,7	96,1	1,4
No PEGilada	19,9	0,2	1,2	98,6

Ejemplo 4

5 **Cromatografía de una preparación de eritropoyetina PEGilada con material de cromatografía SP-Sephacryl con acondicionamiento con una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm y la muestra ajustada a una conductividad de 20 mS/cm**

10 Se efectuó la cromatografía de eritropoyetina PEGilada como se resume en los Materiales y Procedimientos.

Se muestra en la Figura 6 el cromatograma de elución para este procedimiento. Se muestran en la Figura 7A-C los cromatogramas analíticos de exclusión por tamaño de la fracción de pico 1 de eritropoyetina oligo-PEGilada, la fracción de pico 2 de mono-PEGilada y la fracción de pico 3 de no PEGilada.

15

TABLA 5

Especie de eritropoyetina	Pico lineal (fracción de pico 1) (%)	Pico de gradiente 1 (fracción de pico 2) (%)	Pico de gradiente 2 (fracción de pico 3) (%)
Oligo-PEGilada	100	14,5	-
Mono-PEGilada	-	85,3	3,9
No PEGilada	-	0,1	96,1

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Procedimiento para purificar eritropoyetina PEGilada
 <130> 27025
 <150> EP10176616.0
 25 <151> 09-14-2010
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 165
 30 <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

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
 45 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

<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

- 5 1. Un procedimiento para la obtención de una proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) aplicar una solución que comprende una mezcla de eritropoyetina y conjugados de eritropoyetina y polietilenglicol con uno o más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina a una columna que comprende material de cromatografía SP Sephacryl S 500 HR, a la que se ha aplicado una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm,
- 15 b) aplicar una solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm a la columna y recuperar así el polietilenglicol libre y las proteínas que comprenden dos o más residuos de polietilenglicol,
- c) aplicar una solución de conductividad creciente de forma continua y lineal hasta un valor final de al menos 62,5 mS/cm a la columna y recuperar así separadamente la proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de polietilenglicol y eritropoyetina, mediante lo cual se obtiene en primer lugar la proteína que comprende eritropoyetina y un solo residuo de etilenglicol,
- en el que la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5.
- 20 2. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la solución con una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm es una solución tamponada con fosfato con un valor de pH de pH 2,5 a pH 3,5.
- 25 3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la solución que comprende una mezcla de eritropoyetina y conjugados de eritropoyetina y polietilenglicol con uno más residuos de polietilenglicol por molécula de eritropoyetina no está ajustada a una conductividad de aproximadamente 21 mS/cm.
- 30 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la solución con conductividad creciente de forma lineal es una solución de concentración de cloruro de sodio creciente de forma lineal.
- 35 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la solución con conductividad creciente de forma lineal tiene un valor de pH de pH 2,3 a pH 3,5.
- 40 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la eritropoyetina es eritropoyetina humana.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la eritropoyetina humana tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 01 o SEQ ID NO: 02.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el único residuo de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20 a 40 kDa.

Fig. 1

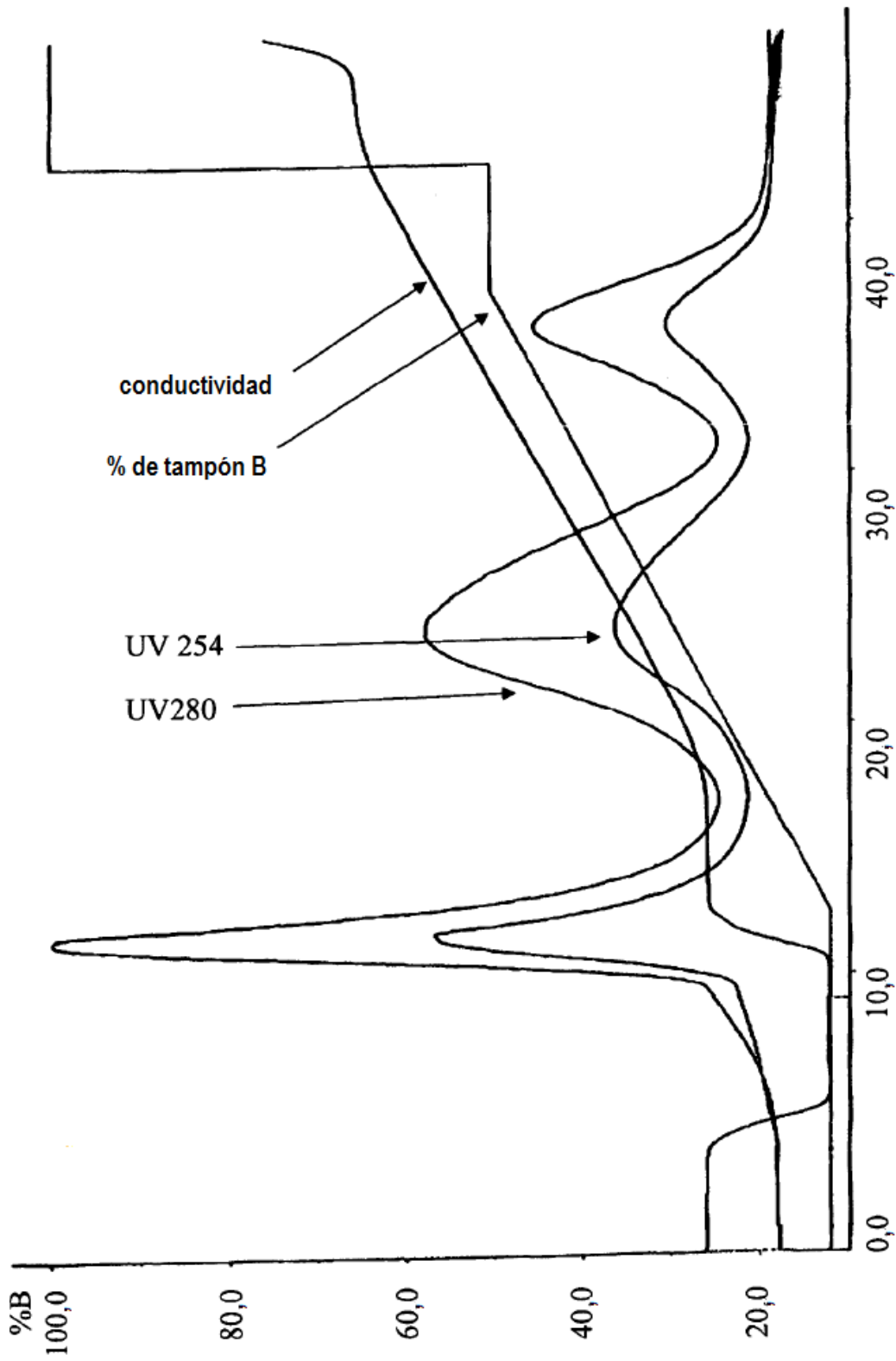
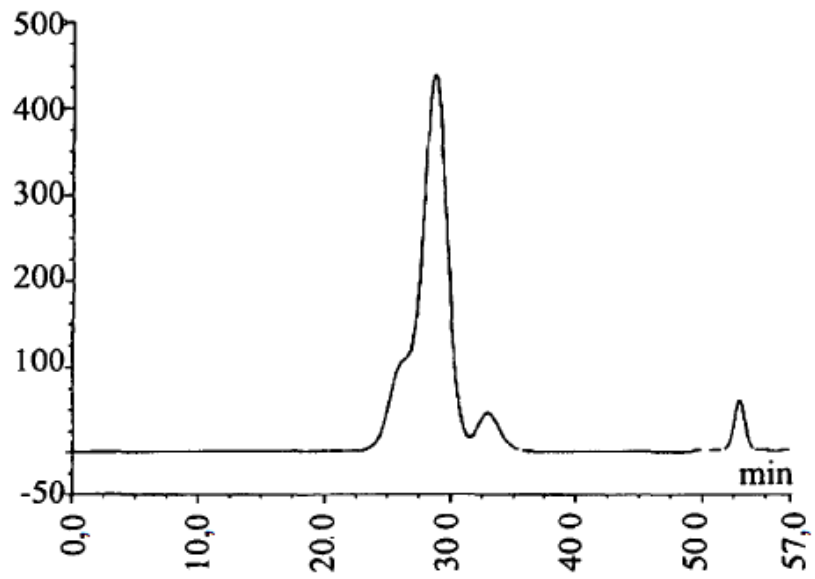
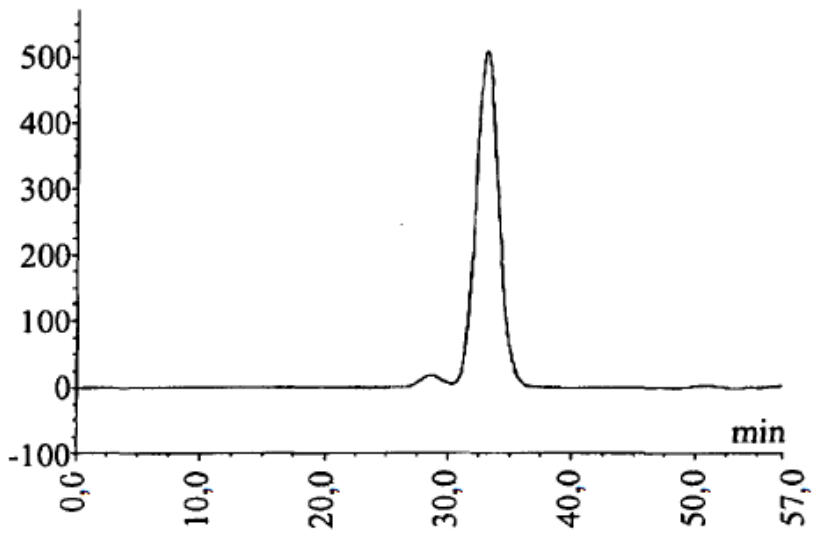


Fig. 2

A



B



C

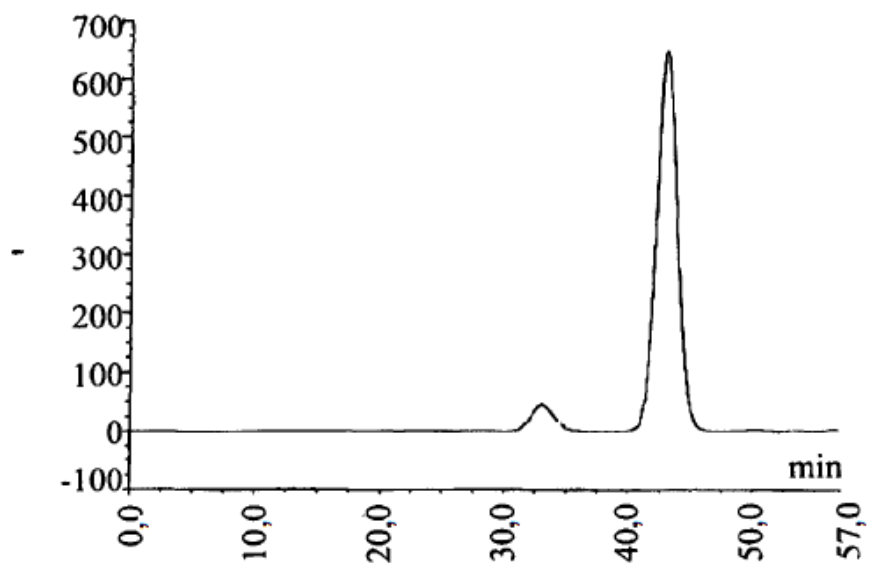
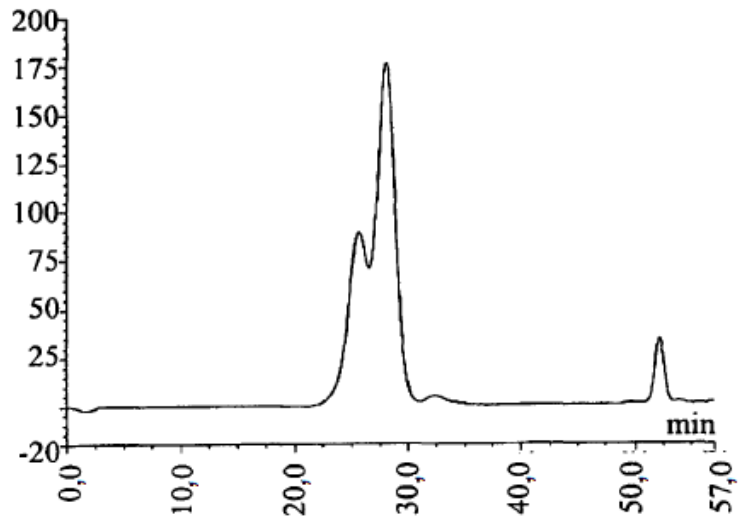
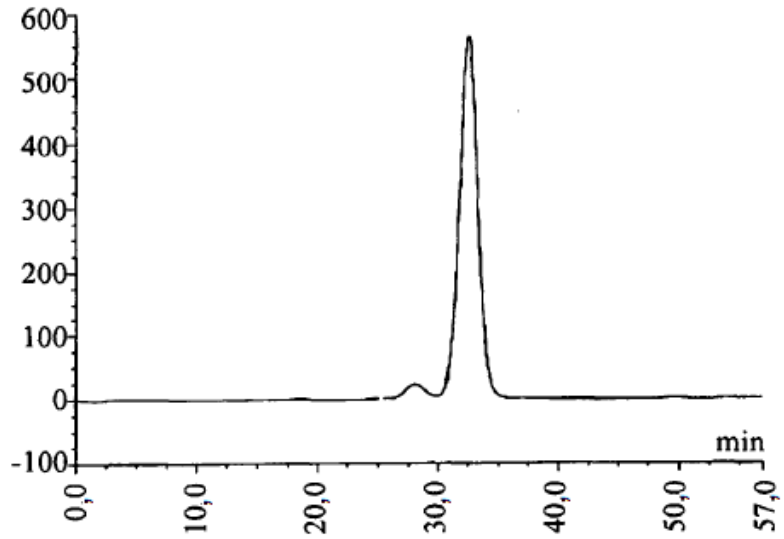


Fig. 3

A



B



C

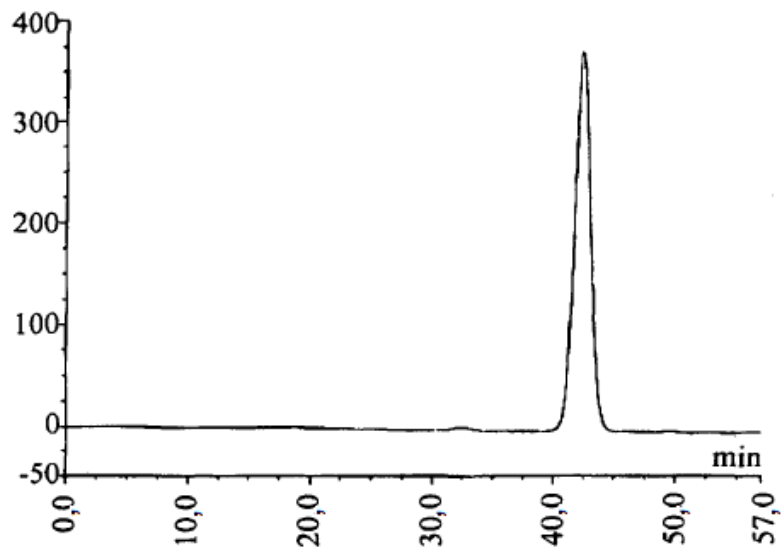


Fig. 4

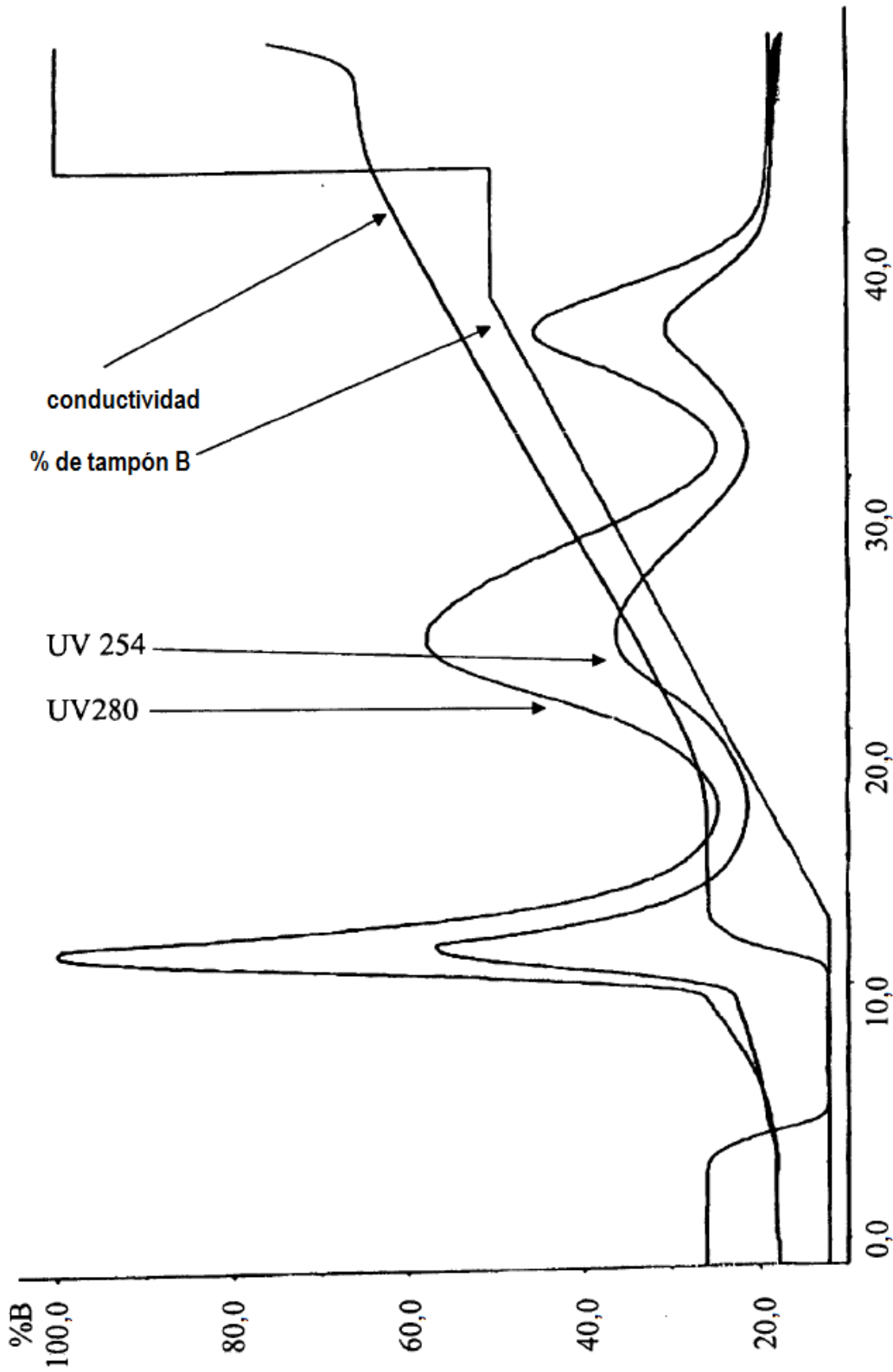
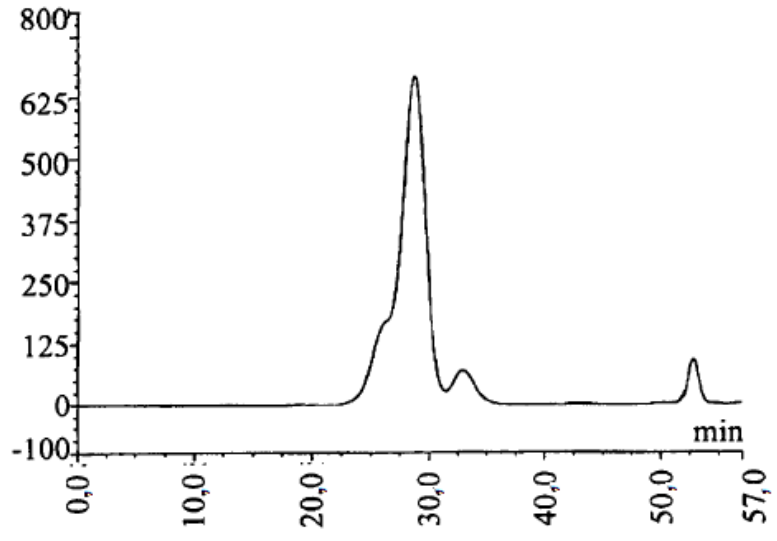
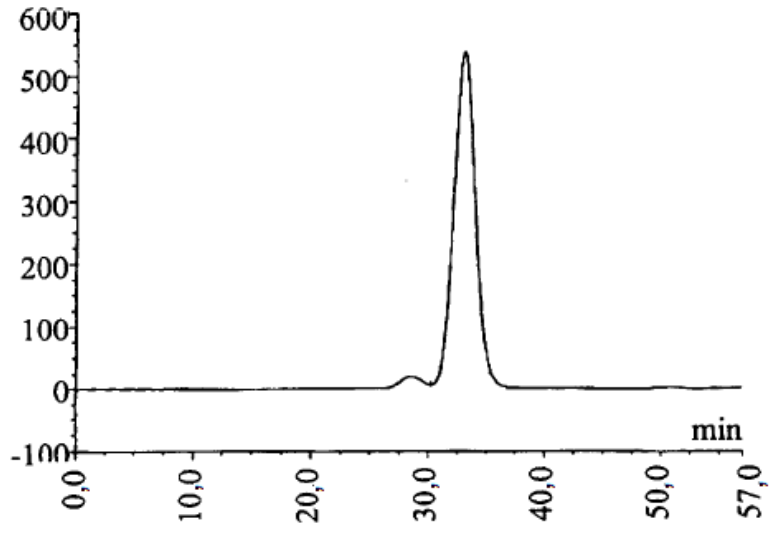


Fig. 5

A



B



C

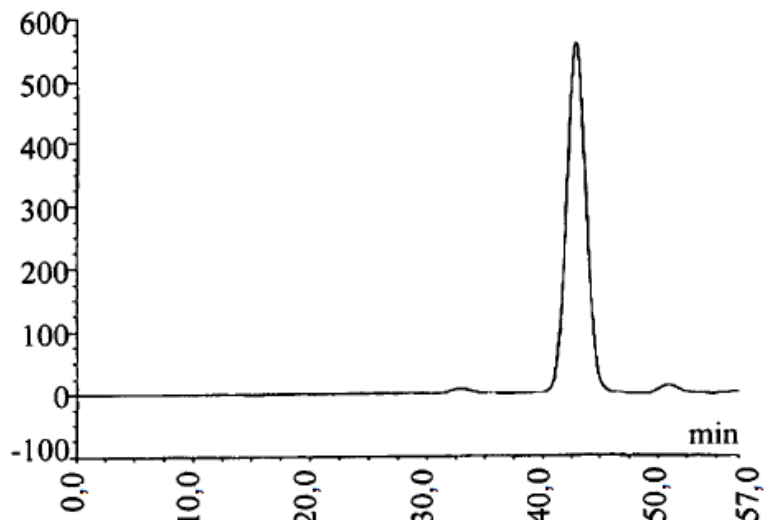


Fig. 6

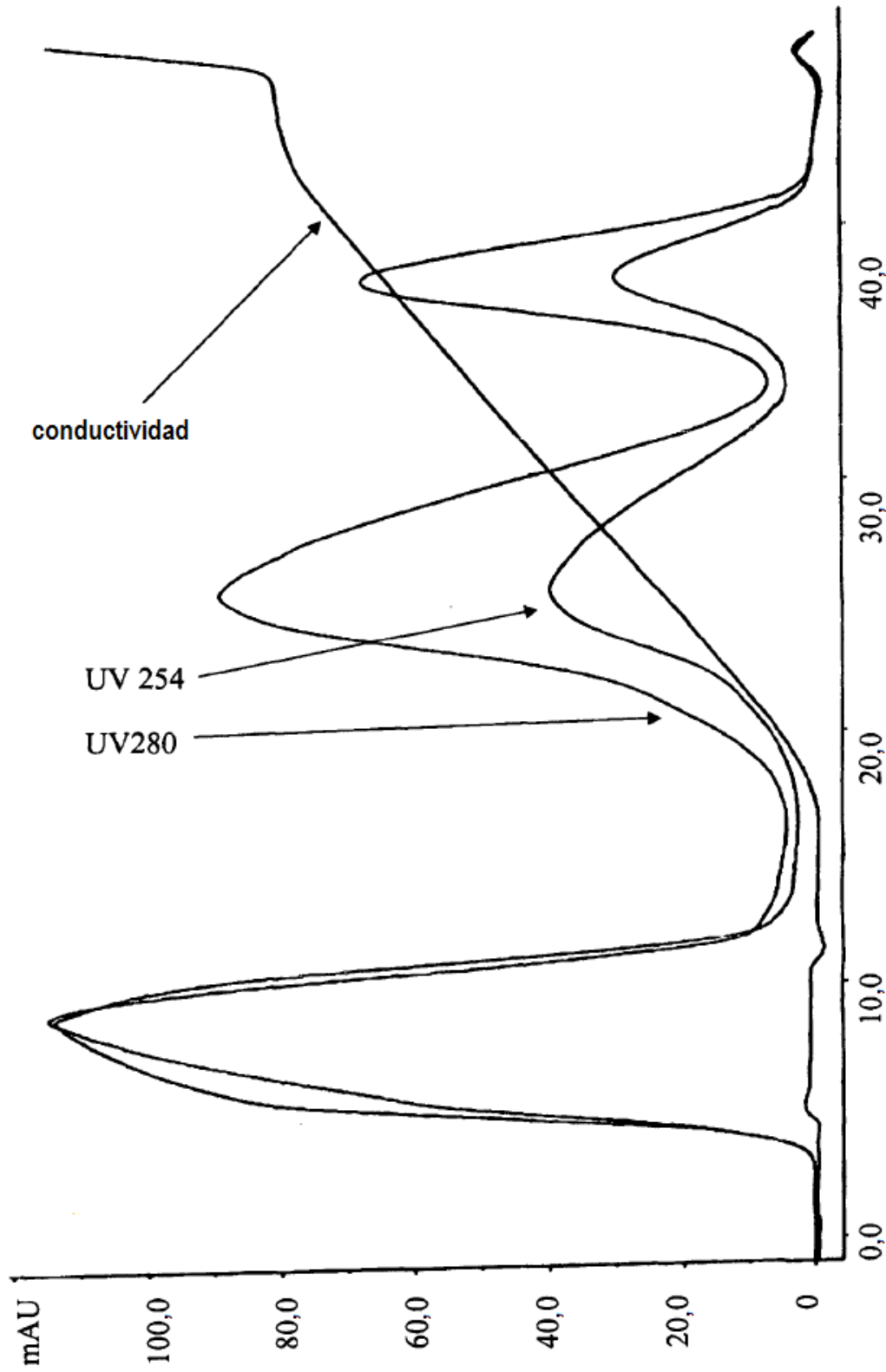
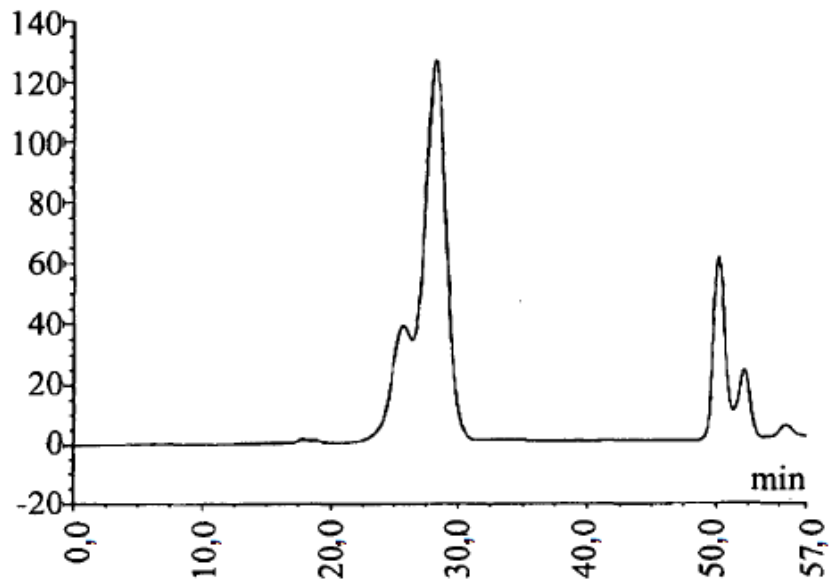
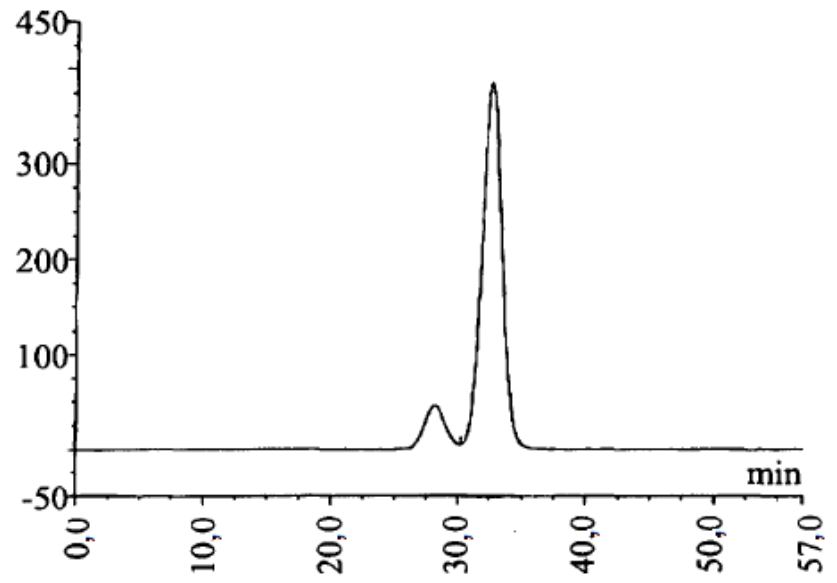


Fig. 7

A



B



C

