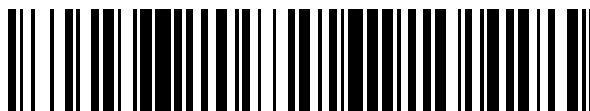


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 268**

51 Int. Cl.:

G01N 30/86 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

G01N 30/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2010** **E 10732848 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2446256**

54 Título: **Caracterización de equipo de cromatografía reutilizable**

30 Prioridad:

24.06.2009 EP 09008247

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

07.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BELOUSOV, ANTON;
DAMS, THOMAS y
GERWAT, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 535 268 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

Caracterización de equipo de cromatografía reutilizable

5 El procedimiento informado en el presente documento está en el campo de la cromatografía, en especial en el campo de la cromatografía en columna preparativa. En el presente documento se informa de un procedimiento para la determinación directa de la calidad del empaquetado de una columna de cromatografía basada en datos en proceso. Con este procedimiento se puede lograr un ahorro en el tiempo de proceso y en recursos ya que se puede eliminar la adquisición de datos adicionales únicamente con el propósito de la determinación de la integridad de la columna.

10

Antecedentes de la invención

15 Hoy en día, casi todos los polipéptidos usados en medicamentos se preparan de forma recombinante. Debido a los requisitos y directrices reguladoras estrictas, los subproductos han de retirarse de la preparación polipeptídica terapéutica tanto como sea posible. Por lo tanto, se emplea al menos una etapa de cromatografía en el procesamiento posterior del polipéptido bruto a granel después de la producción recombinante. Como la dimensión del equipo de cromatografía con respecto al campo del proceso de fermentación, en especial la capacidad de separación de las columnas de cromatografía, es limitada, se han de procesar una multitud de lotes con el fin de poder proporcionar la cantidad requerida de polipéptido terapéutico purificado.

20

25 Para garantizar que cada lote de polipéptido terapéutico purificado tenga el mismo efecto farmacéutico, se ha de cumplir para cada lote una lista de parámetros analíticos. Esto sólo se puede lograr si las etapas del proceso de purificación funcionan de forma consistente y eficaz. Pero, si una etapa del proceso de purificación no funciona de forma apropiada, el producto obtenido muy probablemente no pasará las pruebas analíticas y, en el peor caso, no se podrá usar este lote. Por lo tanto, es necesario proporcionar procedimientos para determinar el rendimiento y la eficacia de las etapas de purificación.

30

30 Teeters, M.A. y Quinones-García, I. (J. Chrom. A 1069 (2005) 53-64) informan de la evaluación y monitorización del comportamiento del empaquetado de las columnas de cromatografía en una escala de proceso usando las respuestas al pulso basado en la conductividad y las entradas de etapa derivadas de experimentos con trazadores y transiciones en proceso, en especial de las distribuciones del tiempo de residencia medido. Norling *et al.* (Norling, L., *et al.* J. Chrom. A 1069 (2005) 79-89) informan del impacto de múltiples reutilizaciones del medio de cromatografía de intercambio aniónico en la retirada de virus. Se informa del uso de datos de proceso para evaluar el rendimiento cromatográfico en columnas de purificación de proteínas en una escala de producción por Larson *et al.* (Larson, T.M., *et al.*, Biotechnol. Prog. 19 (2003) 485-492). Moscariello, J., *et al.* J. Chrom. A 908 (2001) 131-141 informan de la caracterización del rendimiento de columnas en una escala industrial. Se informa de la resolución y la eficacia de la columna en cromatografía por Vink, H., J. Chrom. 69 (1972) 237-242. Sarker, M. y Guiochon, G., J. Chrom. A 702 (1995) 27-44 informan de un estudio del comportamiento de empaquetamiento de columnas de compresión axial para cromatografía preparativa.

40

Sumario de la invención

45 Con el procedimiento como se informa en el presente documento, se puede determinar una determinación de la disminución en la eficacia de separación y/o calidad del empaquetado de un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable sin la necesidad de usar e inyectar un compuesto trazador adicional antes de la separación de la solución polipeptídica en bruto para la determinación de la integridad del material de la columna o la necesidad de datos históricos de esta etapa de purificación.

50

50 El primer aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para determinar si un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, que se usa al menos por segunda vez en una etapa de purificación de una purificación de un polipéptido, tiene una eficacia de separación reducida, por ejemplo, en comparación con la eficacia de separación cuando se usó por primera vez en la misma etapa de purificación de la misma purificación del mismo polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

- 55 a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable,
 b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso,
 c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
 60 d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,
 e) determinar la eficacia de separación reducida de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es más de 0,1,

65

en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

5

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}.$$

Otro aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en el que está comprendido al menos una etapa de cromatografía con un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, que comprende las siguientes etapas:

10

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable,
- b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso,
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,

15

20

en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

25

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!},$$

y

30

- adicionalmente usar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,05 o menor, o
- realizar una caracterización adicional del polipéptido purificado cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es más de 0,05 pero menos de 0,2, o
- cambiar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,2 o más.

35

En un modo de realización, dicho cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de dicha fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable es un cambio de señal significativo efectuado por el cambio de la concentración de una sustancia que no interacciona con el empaquetado de columna reutilizable contenido en dicha fase móvil. En otro modo de realización, dicha determinación de los datos experimentales es una determinación con el tiempo de los datos experimentales de un parámetro fisicoquímico de un cambio inerte. En otro modo de realización, dicho cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable es un cambio de la fase móvil de un 100 % de una solución que contiene un agente desnaturizante a un 100 % de una solución que no contiene dicho agente desnaturizante o de un 100 % de una solución que no contiene dicho agente desnaturizante a un 100 % de una solución que contiene un agente desnaturizante. En otro modo de realización, el agente desnaturizante se selecciona de hidróxido de sodio, cloruro de guanidinio, urea o disolvente orgánico. En un modo de realización, dicha etapa c) es determinar las diferencias entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b) para cada punto de los

50

datos experimentales. En un modo de realización, dicho cambio de señal es un cambio en la conductividad o en la adsorción a 280 nm. En otro modo de realización, dicho cambio inerte es un cambio sigmoide. Aún en otro modo de realización, dicho al menos un parámetro fisicoquímico se determina en la etapa de acondicionamiento o regeneración.

5

Descripción detallada de la invención

El primer aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para determinar si un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, que se usa al menos por segunda vez en una etapa de purificación de una purificación de un polipéptido, tiene una eficacia de separación reducida en comparación con la eficacia de separación cuando se usó por primera vez en la misma etapa de purificación de la misma purificación del mismo polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) identificar un cambio inerte y determinar con el tiempo los datos experimentales de un parámetro fisicoquímico de un cambio inerte de un 100 % de una solución que contiene un agente desnaturalizante a un 100 % de una solución que no contiene dicho agente desnaturalizante, o viceversa, de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable después del al menos primer uso del empaquetado de columna de cromatografía,
- 20 b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso obtenido en a),
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,
- 25 e) determinar la eficacia de separación reducida de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es más de 0,05,

en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

30

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}.$$

35

El término "empaquetado de columna de cromatografía reutilizable" indica un material de cromatografía que está empaquetado dentro de una columna de cromatografía por medio de la que se obtiene el material de cromatografía después de una purificación en una forma no modificada, es decir, con las mismas características que antes de la purificación. Una etapa de purificación indica, en general, un ciclo que comprende el acondicionamiento del empaquetado de columna de cromatografía, la aplicación de la solución polipeptídica en bruto, opcionalmente el lavado del material de cromatografía, la recuperación del polipéptido purificado del empaquetado de columna de cromatografía y la regeneración del empaquetado de columna de cromatografía. En un modo de realización de los aspectos como se informan en el presente documento, el cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable es un cambio de un parámetro fisicoquímico con el tiempo y/o en el acondicionamiento del empaquetado de columna de cromatografía y/o en la regeneración del empaquetado de columna de cromatografía.

La definición de un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable como se explica anteriormente requiere que todas las etapas individuales de una purificación sean perfectamente reversibles. Pero este no es el caso. Durante la etapa de purificación, por ejemplo, la naturaleza completamente homogénea del material de cromatografía empaquetado se puede llegar a alterar y el flujo a través de la matriz de separación se puede ver comprometido. En un punto en el tiempo, la eficacia de la separación y/o la recuperación y/o la calidad del empaquetado del material de cromatografía reutilizable todavía es suficiente para permitir una purificación del polipéptido de los subproductos pero no con una pureza que cumpla con los requisitos de la especificación de dicho polipéptido. Como resultado, puede que este lote del polipéptido no se pueda usar como producto terapéutico y tenga que tratarse adicionalmente o desecharse.

55

Con el procedimiento como se informa en el presente documento, es posible una determinación de la disminución en la eficacia de separación y/o calidad del empaquetado de y/o en la recuperación de un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable sin i) la necesidad de usar e inyectar un compuesto trazador adicional antes de la separación de la solución polipeptídica en bruto para la determinación de la integridad del material de la columna o ii) la necesidad de datos históricos de esta etapa de purificación. Por tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite la determinación de la calidad de un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable basada en datos que, en general, se obtienen durante la etapa de purificación de cromatografía del polipéptido, lo que hace innecesarias las etapas adicionales tales como la inyección de una sustancia trazadora.

El procedimiento como se informa en el presente documento se basa en el hallazgo de que se puede usar un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable durante la purificación de un polipéptido para determinar la eficacia de la separación del material de cromatografía y/o la calidad del empaquetado. Un cambio "cambio inerte" de este tipo es el cambio de al menos un, preferentemente un, parámetro fisicoquímico con el tiempo, tal como la concentración de una sustancia contenida en la fase móvil, o de la propia fase móvil durante la etapa de purificación. La sustancia no interacciona con la funcionalidad del material de cromatografía que efectúa la purificación del polipéptido. Los cambios inertes ejemplares de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable son i) un cambio de condiciones desnaturalizantes a condiciones no desnaturalizantes, o ii) un cambio de condiciones fuertemente alcalinas a condiciones tamponadas, o iii) un cambio de disolvente orgánico a agua. En un modo de realización, el cambio es de un 100 % de una solución de hidróxido de sodio de 0,5 a 1 M o una solución de cloruro de guanidinio 5 M o una solución de urea 8 M o disolvente orgánico a un 100 % de tampón o a un 100 % de agua, comprendiendo opcionalmente un agente ionizante tal como ácido trifluoroacético en hasta un 1 % (v/v). O viceversa, los cambios son i) de condiciones no desnaturalizantes a condiciones desnaturalizantes, o ii) de condiciones tamponadas a condiciones fuertemente alcalinas, o iii) de agua a disolvente orgánico. En otro modo de realización, el cambio es de un 100 % de tampón o un 100 % de agua, comprendiendo opcionalmente un agente ionizante tal como ácido trifluoroacético en hasta un 1 % (v/v), a un 100 % de una solución de hidróxido de sodio de 0,5 a 1 M, o a un 100 % de una solución de cloruro de guanidinio 5 M, o a un 100 % de una solución de urea 8 M o disolvente orgánico. En la figura 1 se muestra un cromatograma para un cambio inerte que no muestra reducción en la eficacia de separación/calidad del empaquetado y en la figura 4 se muestra un cromatograma para un cambio inerte que muestra una reducción en la eficacia de separación/calidad del empaquetado.

En un modo de realización, el cambio inerte del al menos un parámetro fisicoquímico con el tiempo se determina por los datos experimentales registrados durante la purificación, tales como la absorción a 280 nm, o la conductividad de la fase móvil que deja la columna de cromatografía, o la concentración del disolvente orgánico que deja la columna de cromatografía.

El término "fase móvil" indica un líquido que se usa en la cromatografía en columna y que rodea el material de cromatografía del empaquetado de columna de cromatografía, que a su vez es la fase estacionaria.

Se ha descubierto que de una comparación de los datos experimentales registrados durante el cambio inerte del al menos segundo uso de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable con los datos registrados durante el cambio inerte del al menos segundo uso de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable ajustados a la función de fórmula I se puede obtener una determinación de la eficacia de separación/calidad del empaquetado del empaquetado de columna de cromatografía reutilizable. En un modo de realización, los datos experimentales se registran durante la al menos segunda purificación de dicho polipéptido con un empaquetado de columna fabricado con material de cromatografía que se ha usado una o más veces en las mismas etapas de purificación de la misma purificación del mismo polipéptido antes de este uso. La función de fórmula I es como sigue:

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

con

la amplitud P1,
el valor de partida A0,
el valor medio m,
la desviación estándar s,

y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}.$$

Los procedimientos como se informan en el presente documento emplean la forma integrada de la distribución gaussiana que proporciona atributos de calidad para el empaquetado de la columna. Con la función de fórmula I, se puede determinar la desviación de un mecanismo de distribución controlado puramente por difusión de un compuesto(s) contenido(s) en un pulso aproximadamente rectangular de dicho(s) compuesto(s) en la entrada de la columna. Esto se logra comparando la función de fórmula I ajustada a los datos experimentales registrados durante el cambio inerte identificado en la purificación del polipéptido con los propios datos experimentales registrados, de este modo la diferencia durante el cambio inerte de la función ajustada y los datos experimentales no ajustados no debe exceder un valor umbral predeterminado con el fin de proporcionar un polipéptido purificado de características deseadas.

La comparación se realiza calculando la diferencia entre los datos experimentales con los que se ha ajustado la función de fórmula I y la función ajustada de fórmula I. Con el fin de hacer comparables los resultados de purificaciones individuales entre sí, se normalizan los resultados o la diferencia, por ejemplo, dividiendo el valor entre el valor máximo de los datos experimentales de dicho parámetro fisicoquímico durante dicho cambio inerte. En un modo de realización, dicha normalización es por una división entre el valor del parámetro A0 de la función ajustada de fórmula I. En un modo de realización, se usa una función de diferencia normalizada, como se muestra en la siguiente fórmula II:

$$y_{II} = \left(x - \left(\frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0 \right) \right) / A0.$$

Por tanto, en un modo de realización, la etapa b) dice: determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y determinar con los mismos también los parámetros de una función de diferencia normalizada de fórmula II, y la etapa c) dice: determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula II con los parámetros determinados en la etapa b). En otro modo de realización, dicha normalización es en la etapa de calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada entre los datos experimentales y la función de fórmula I ajustada a dichos datos experimentales normalizando dicha diferencia dividiendo dicha diferencia entre el valor máximo de los datos experimentales de dicho parámetro fisicoquímico durante dicho cambio inerte.

En la figura 3 se muestra una función de diferencia ejemplar para un cromatograma para un cambio inerte sin reducción en la eficacia de separación y/o calidad del empaquetado y en la figura 6 se muestra para un cromatograma para un cambio inerte con una reducción en la eficacia de separación y/o calidad del empaquetado.

Para el cálculo del valor de diferencia absoluto, se determina el máximo global y el mínimo global de la diferencia entre los datos experimentales y los datos experimentales ajustados calculados para cada punto de datos experimentales. Se calcula la diferencia entre este valor máximo y este valor mínimo y proporciona un parámetro con el que se puede determinar la calidad del empaquetado del empaquetado de columna de cromatografía reutilizable. En un modo de realización, se normaliza dicha diferencia dividiendo los valores de diferencia calculados entre el valor máximo de los datos experimentales usados para el cálculo.

Dependiendo del polipéptido que se va a purificar y sus características que se van a lograr, se pueden dar los valores umbrales para la diferencia absoluta entre el valor máximo y el valor mínimo de la función de diferencia de modo que el exceso individual de cada uno de los valores umbrales da como resultado una acción que se va a realizar. En un modo de realización, se puede aceptar dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la función de diferencia normalizada y se puede usar el empaquetado adicionalmente si el valor absoluto de la diferencia calculada es menos de 0,2 o 0,1 o 0,05. En un modo de realización, se puede aceptar dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia normalizada pero se han de realizar análisis y/o evaluaciones adicionales para garantizar la conformidad de especificación del polipéptido purificado si el valor absoluto es de 0,05 o más pero menos de 0,2, o 0,1 o más pero menos de 0,2, o 0,1 o más pero menos de 0,15. En un modo de realización, no se puede aceptar dicha diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia normalizada y el empaquetado se ha de cambiar/renovar si el valor absoluto es de 0,2 o más, o 0,15 o más.

Por lo tanto, otro aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en el que está contenido al menos una etapa de cromatografía que emplea un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, caracterizado por que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable,
 b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso,
 c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
 d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,

en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!},$$

y

- adicionalmente usar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,05 o menos, o
- realizar una evaluación y/o caracterización adicional del polipéptido purificado cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,05 o más pero menos de 0,2, o
- cambiar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,2 o más.

Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya se produzcan de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos se pueden denominar como "péptido", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos aminoácidos se pueden denominar como "proteína". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácidos carboxílicos. Los componentes no aminoácidos se pueden añadir por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de esqueleto aminoácido o del ácido nucleico que codifica los mismos. En general, no se especifican adiciones tales como grupos carbohidrato, pero de todos modos pueden estar presentes.

En un modo de realización, dicho polipéptido se produce de forma recombinante. En otro modo de realización, dicho polipéptido es una inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina. El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante así como miríadas de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab, y F(ab)₂ así como cadenas sencillas (scFv) o diacuerpos (por ejemplo Huston, J.S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., *et al.*, Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood, L.E., *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984); y Hunkapiller, T. y Hood, L.E., Nature 323 (1986) 15-16). El término "conjugado de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina conjugado por medio de un enlace peptídico a otro polipéptido. El otro polipéptido es un péptido no inmunoglobulínico, tal como una hormona, o receptor del crecimiento, o péptido antifusogénico, o factor de complemento, o similares, o un fragmento de inmunoglobulina, tal como Fv, Fab, y F(ab)₂ así como un anticuerpo monocatenario (scFv) o diacuerpo.

Los procedimientos para purificar polipéptidos e inmunoglobulinas están bien establecidos y se usan generalmente y se emplean solos o en combinación. Dichos procedimientos son, por ejemplo y en determinados modos de realización, cromatografía de afinidad usando proteínas derivadas de microbios (por ejemplo cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio en modo mezclado), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos de SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con Phenyl-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía

de afinidad por quelato metálico (por ejemplo con material con afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño, y procedimientos electroforéticos preparativos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102). En un modo de realización, dicho empaquetado de columna de cromatografía es un material de cromatografía seleccionado de un material de cromatografía de afinidad, o un material de cromatografía de intercambio iónico, o un material de cromatografía de adsorción tiofílica, o un material de cromatografía de interacción hidrófoba, o un material de cromatografía de adsorción aromática, o un material de cromatografía de afinidad por quelato metálico, o un material de cromatografía de exclusión por tamaño.

En otro modo de realización, el procedimiento como se informa en el presente documento se usa para la determinación si el soporte físico del proceso excepto el material de cromatografía tiene una eficacia de separación reducida.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas. Puesto que el polipéptido eritropoyetina estaba disponible en cantidades suficientes en nuestro laboratorio en el momento de la invención, se ejemplifica con este polipéptido. Esto no debe entenderse como una limitación sino sólo como un ejemplo de la invención.

Figura 1 Datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable sin eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos); eje X: tiempo [min]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 2 Datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable sin eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos) y la función ajustada de acuerdo con una función de fórmula I; eje X: tiempo [min]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 3 Diferencia absoluta entre los datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable sin eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos) y la función ajustada de acuerdo con la fórmula I; eje X: tiempo; eje Y: diferencia.

Figura 4 Datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable con eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos); eje X: tiempo [min]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 5 Datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable con eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos) y la función ajustada de acuerdo con una función de fórmula I; eje X: tiempo [min]; eje Y: conductividad [mS/cm].

Figura 6 Diferencia absoluta entre los datos experimentales para un cambio inerte ejemplar de la conductividad para un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable con eficacia de separación reducida/calidad del empaquetado (círculos vacíos) y la función ajustada de acuerdo con una función de fórmula I; eje X: tiempo [min]; eje Y: diferencia [mS/cm].

Figura 7 Monitorización de la integridad de la columna con un procedimiento como se informa en el presente documento sobre 50 ciclos cromatográficos usando la fórmula II.

Figura 8 Monitorización de la integridad de la columna con un procedimiento como se informa en el presente documento usando la fórmula II.

Círculos llenos: parámetro derivado para la regeneración de la columna sin cambios en el empaquetado de columna.

Círculos abiertos: parámetro derivado para la regeneración de la columna con un lecho agrietado durante el ciclo de regeneración n.º 9.

Ejemplo 1

Fermentación y purificación de eritropoyetina

La eritropoyetina se puede producir y purificar, por ejemplo, de acuerdo con el documento WO 01/87329.

La purificación comprende algunas etapas de cromatografía. Una de estas es una cromatografía de Blue Sepharose. Blue Sepharose consiste en perlas de Sepharose en cuya superficie se une de forma covalente el colorante Cibacron azul. Puesto que la eritropoyetina se une más fuertemente a Blue Sepharose que a la mayoría de los contaminantes no proteínicos, algunas impurezas proteínicas y PVA, en esta etapa se puede enriquecer la eritropoyetina. La elución de la columna de Blue Sepharose se realiza incrementando la concentración salina así como el pH. La columna se llena con Blue Sepharose, se regenera con NaOH y se equilibra con tampón de equilibrio (cloruro de sodio/calcio y acetato de sodio). Se carga el sobrenadante de fermentados acidificado y filtrado. Después de la finalización de la

carga, la columna se lava en primer lugar con un tampón similar al tampón de equilibrio que contiene una mayor concentración de cloruro de sodio y consecutivamente con un tampón TRIS-base. El producto se eluye con un tampón TRIS-base y se recoge en una única fracción de acuerdo con el perfil de elución maestro.

- 5 Durante la etapa de equilibrio, separación y regeneración del ciclo de cromatografía, se determina la conductividad de la fase móvil en la salida de la columna y se registra con un dispositivo de medida de conductividad estándar.

Ejemplo 2

- 10 Cambio en las propiedades de la columna

La columna se puede monitorizar a lo largo del proceso de forma continua usando el procedimiento como se informa en el presente documento. Los cambios sutiles se vuelven detectables independientemente de los cambios de otros parámetros del proceso. En la figura 7 se muestra un cambio en el empaquetado de columna que da como resultado un cambio en las propiedades de separación. El cambio se produjo después del ciclo 40.

- 15 En el caso de una columna con un lecho roto, la calidad del ajuste disminuye drásticamente, como se observa en la diferencia de residuales de parámetros derivados como se muestra en el ciclo 9 de la figura 8 (círculos vacíos).

- 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar si un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, que se usa al menos por segunda vez en una etapa de purificación de una purificación de un polipéptido, tiene una eficacia de separación reducida en dicha etapa de purificación de dicha purificación de dicho polipéptido, **caracterizado por que** dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable del al menos segundo uso,
 - b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso,
 - c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
 - d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,
 - e) determinar la eficacia de separación reducida de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es más de 0,1,
- en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!}.$$

2. Procedimiento para la purificación cromatográfica de un polipéptido, en el que está contenido al menos una etapa de cromatografía que usa un empaquetado de columna de cromatografía reutilizable, **caracterizado por que** dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) identificar y determinar los datos experimentales de un cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable del al menos segundo uso,
- b) determinar los parámetros de una función de fórmula I ajustando los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso,
- c) determinar la diferencia entre los datos experimentales del cambio inerte del parámetro fisicoquímico del al menos segundo uso y la función de fórmula I con los parámetros determinados en la etapa b),
- d) calcular la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de la diferencia determinada en la etapa c) y normalizar dicha diferencia,

en el que la función de fórmula I es

$$yI = \frac{1}{2} P1 \cdot \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - m}{s \cdot \sqrt{2}} \right) \right) + A0,$$

con la amplitud P1, el valor de partida A0, el valor medio m, la desviación estándar s, y con

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sum_0^{\infty} \frac{(-1)^n x^{2n+1}}{(2n+1)n!},$$

y

- adicionalmente usar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,05 o menos, o
- realizar una caracterización y/o evaluación adicional del polipéptido purificado cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es más de 0,05 pero menos de 0,2, o
- cambiar el empaquetado de columna de cromatografía reutilizable cuando el valor absoluto de la diferencia calculada en la etapa d) es de 0,2 o más.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** dicho cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable es un cambio efectuado por el cambio de la concentración de una sustancia en la fase móvil que no interacciona con el empaquetado de columna reutilizable.
 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho cambio inerte es un cambio en la conductividad o en la adsorción a 280 nm.
 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho cambio inerte de al menos un parámetro fisicoquímico de una fase móvil que pasa a través de dicho empaquetado de columna de cromatografía reutilizable es un cambio de desde un 100 % de una solución que contiene un agente desnaturalizante a un 100 % de una solución que no contiene dicho agente desnaturalizante, o viceversa.
 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** dicho agente desnaturalizante está seleccionado de hidróxido de sodio, cloruro de guanidinio, urea o disolvente orgánico.
 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho cambio inerte es un cambio sigmoide.
 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho cambio inerte es un cambio con el tiempo.

Fig. 1

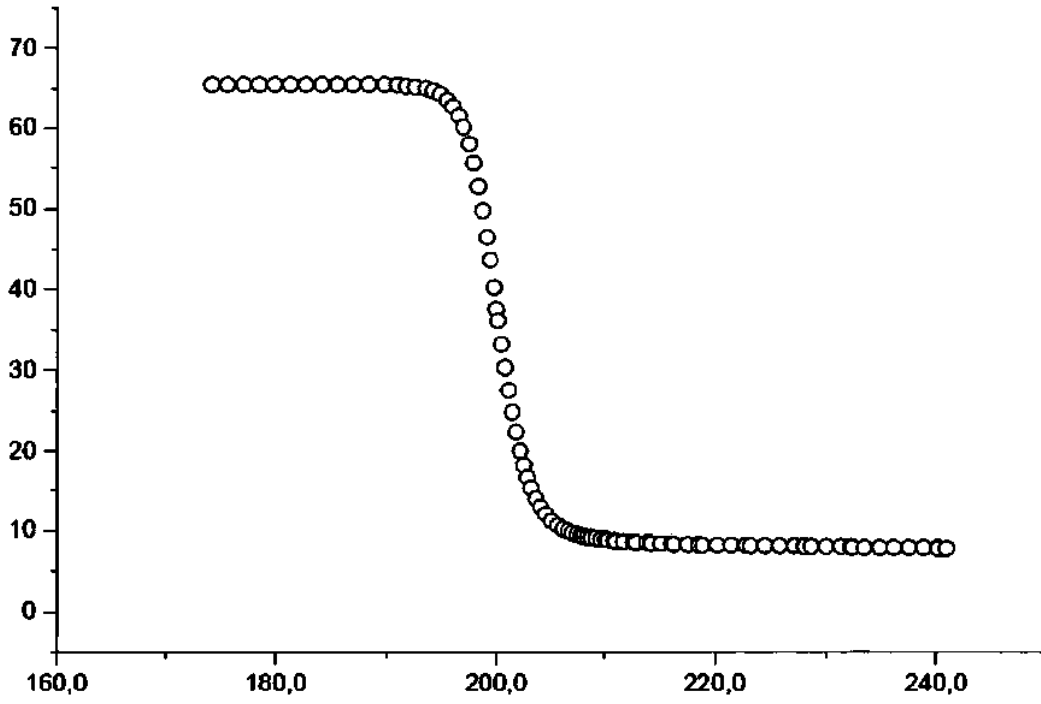


Fig. 2

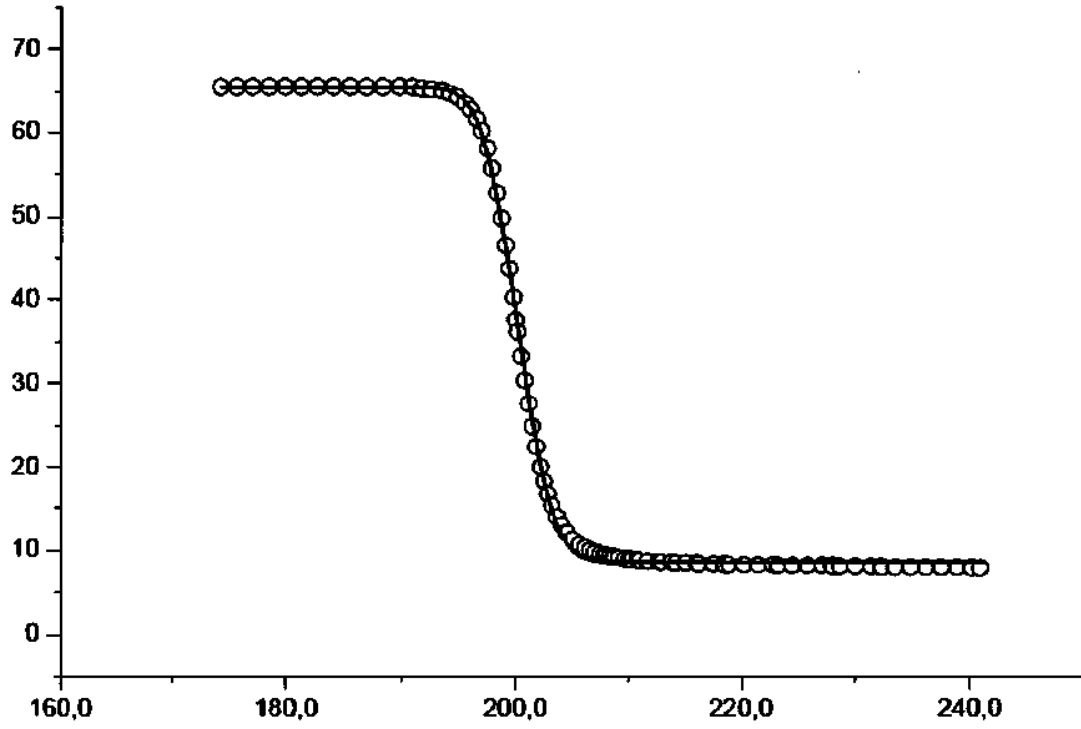


Fig. 3

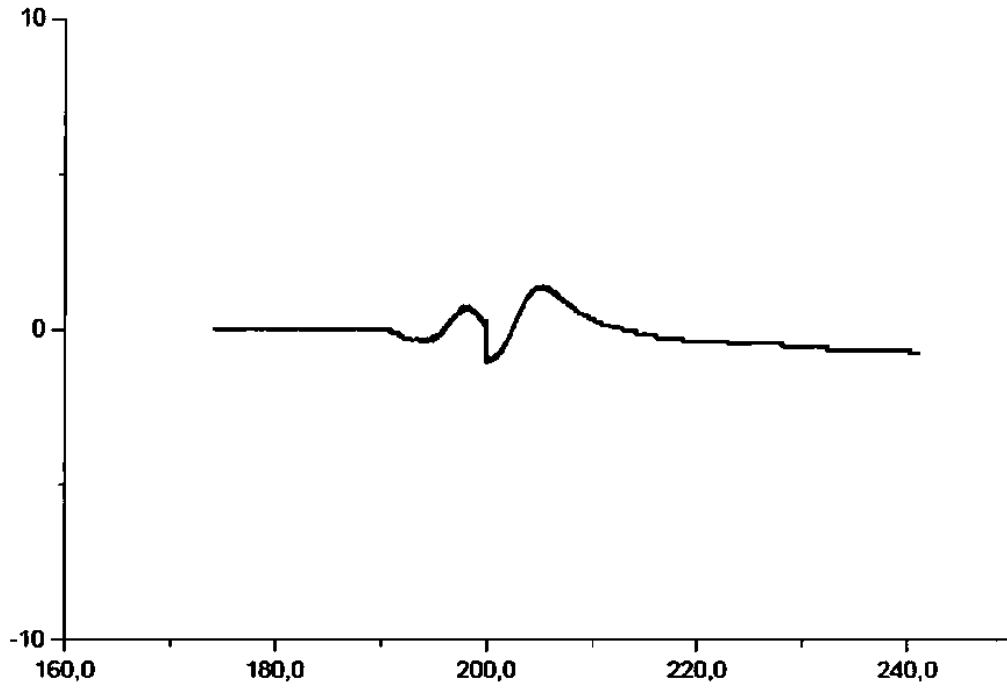


Fig. 4

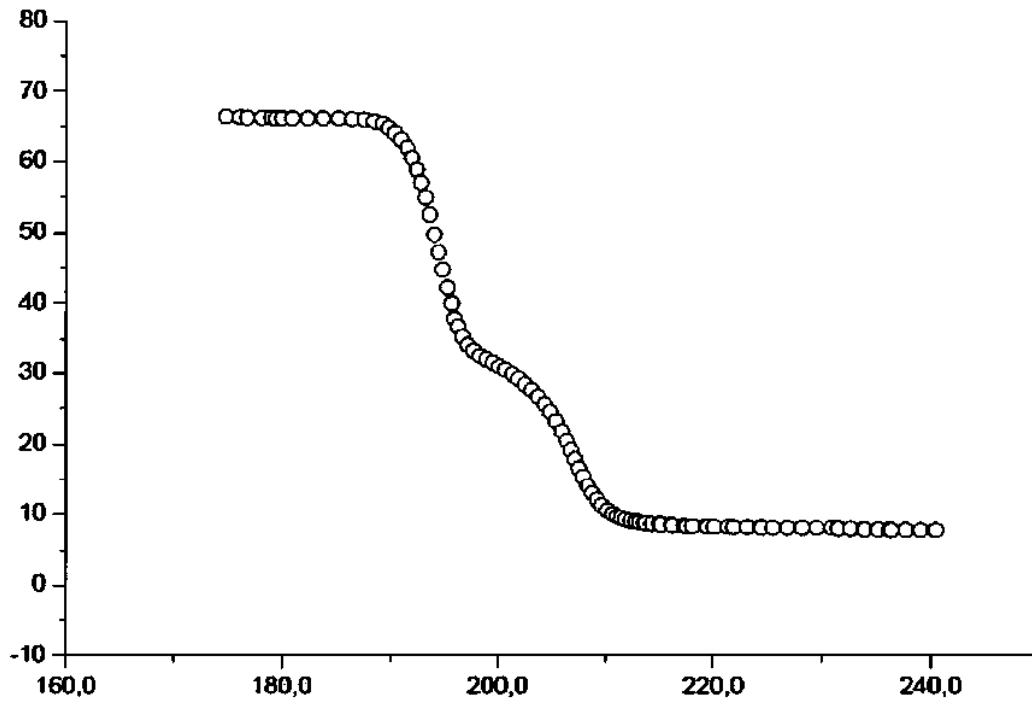


Fig. 5

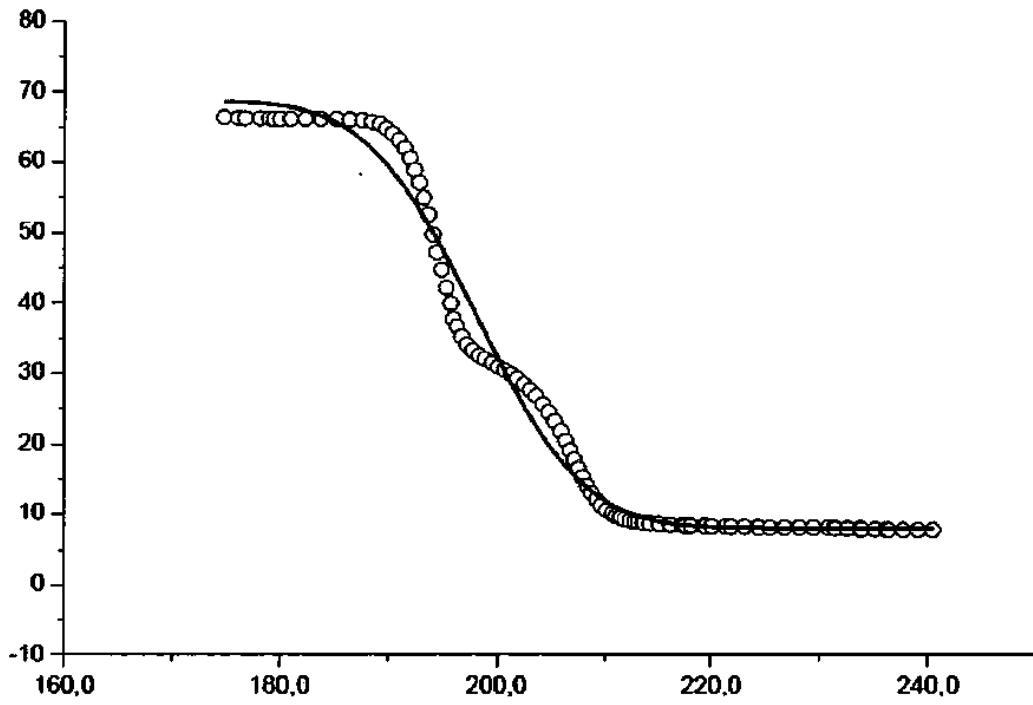


Fig. 6

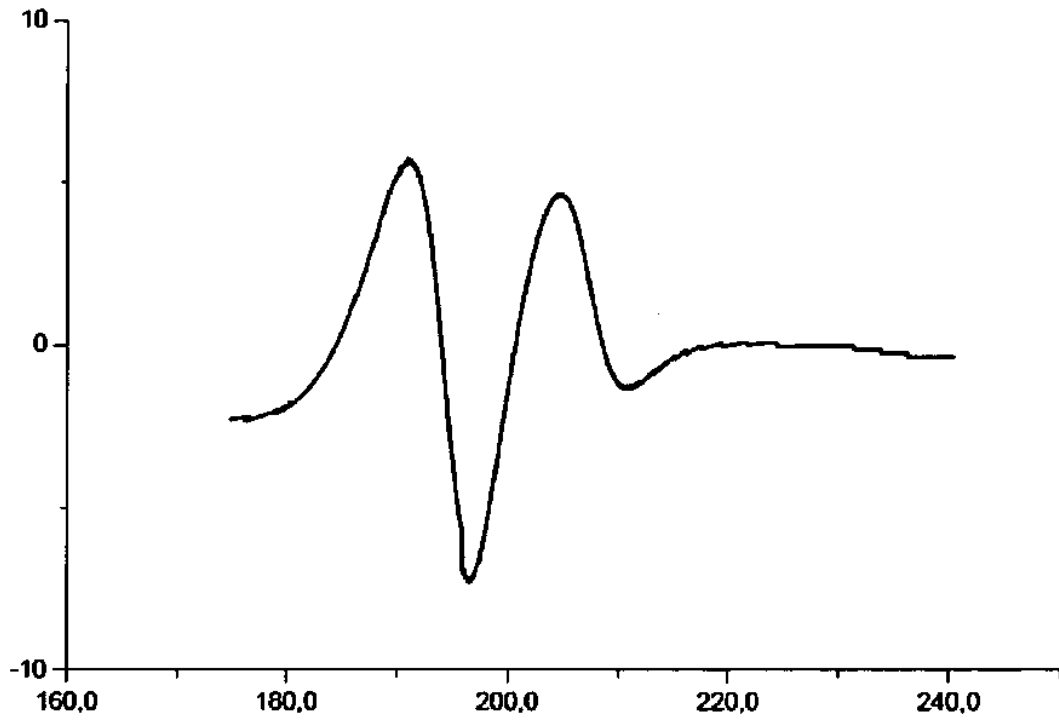


Fig. 7

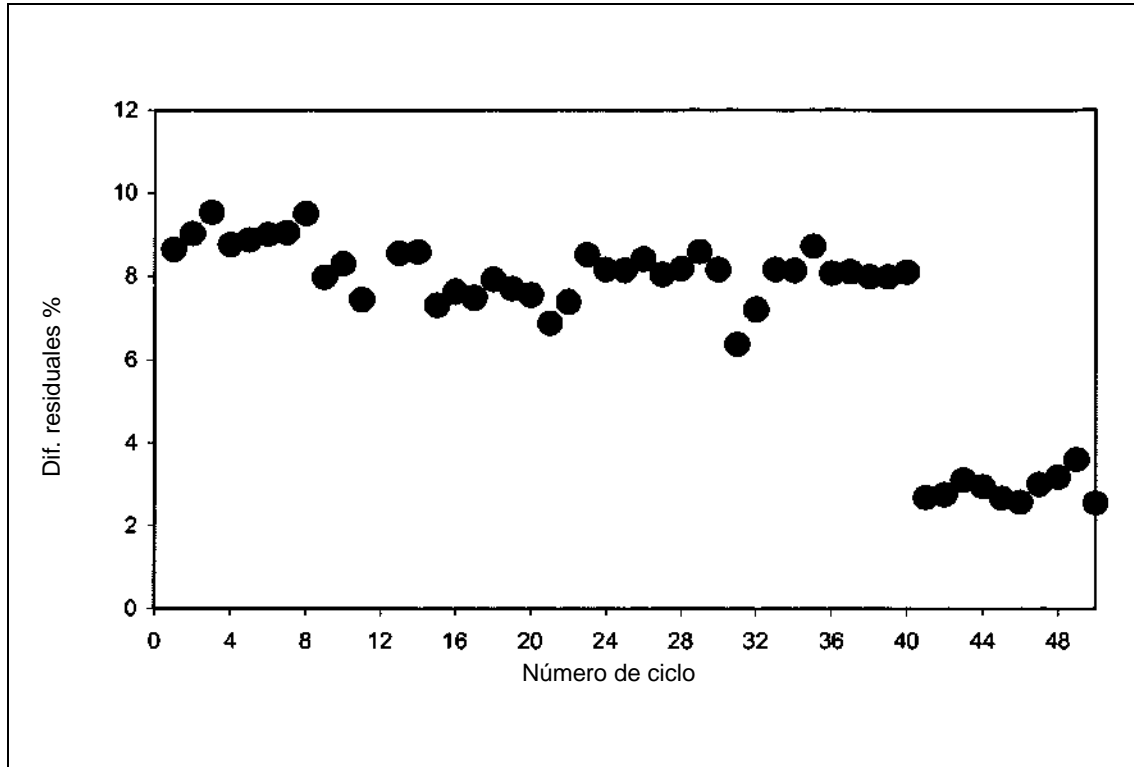


Fig. 8

