

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 127**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 14/605** (2006.01)

**C07K 14/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2000 E 00910569 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1163261**

54 Título: **Cromatografía de intercambio iónico de proteínas y péptidos con un modificador orgánico en el paso de elución**

30 Prioridad:

**15.03.1999 DK 36099**

**19.01.2000 DK 200000083**

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

**02.03.2016**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)  
Thurgauerstrasse 36/38  
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**STABY, ARNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 562 127 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

Cromatografía de intercambio iónico de proteínas y péptidos con un modificador orgánico en el paso de elución

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio iónico para purificación de un péptido a partir de una mezcla que contiene dicho péptido e impurezas afines, y a un método industrial que incluye dicho proceso de cromatografía de intercambio iónico.

10

**Antecedentes**

Para purificación y análisis de proteínas y péptidos, la cromatografía es un método bien conocido y ampliamente utilizado. Se aplican cierto número de principios cromatográficos diferentes, entre ellos la cromatografía de intercambio iónico (IEC). El principio de la IEC incluye dos enfoques diferentes: intercambio de aniones e intercambio de cationes conforme a la carga de los ligandos en la resina de intercambio iónico. Un proceso convencional de purificación IEC consiste usualmente en uno o más de: secciones de equilibración, secciones de aplicación o carga, secciones de lavado, secciones de elución, y secciones de regeneración (cotéjese Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, o Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Edición 19ª (1995)).

15

20

El principio fundamental de la elución en los procesos de purificación industrial IEC es el gradiente del componente salino en una solución tampón acuosa a pH constante, sea como gradiente escalonado o lineal (cotéjese S. Bjørn y L. Thim, Activation of Coagulation Factor VII to VIIa, Res. Discl. No. 269, 564-565, 1986). Es posible la elución isocrática, pero se utiliza raras veces. Ocasionalmente se han añadido disolventes o modificadores orgánicos a las soluciones para mantener la proteína o péptido en la forma deseada o simplemente en solución (cotéjese K. H. Jørgensen, Process for Purifying Insulin, Patente US No. 3,907,676, Sept. 23, 1975; Patente US No. 5,101,013; Patente EP No. 0,849,277; Patente Internacional No. WO 90/00177; Patente US No. 4,129,560; y J. Brange, O. Hallund y E. Sørensen, Chemical Stability of Insulin 5, Isolation, Characterisation and Identification of Insulin Transformation Products, Acta Pharm. Nord. 4(4), 223-232, 1992). Asimismo, el cambio de pH puede emplearse ocasionalmente para eluir la proteína diana (cotéjese J. Lamy, J. Lamy, J. Weill, Arch. Biochem. Biophys. 193, 140-149, 1979).

25

30

**Descripción de la invención**

35

En contraste con las técnicas IEC arriba descritas para purificación de cualquier proteína o péptido, constituidas por uno o más pasos de equilibración, pasos de aplicación a carga, pasos de lavado, pasos de elución, y pasos de regeneración, la presente invención se refiere a una nueva técnica de elución que es la combinación de elución en una solución que comprende un modificador orgánico con la elución subsiguiente en una solución acuosa al mismo pH o a un pH diferente, seguida opcionalmente por un paso de regeneración. La solución de equilibración y la muestra para aplicación pueden contener o no el modificador orgánico. La elución del péptido ocurre en condiciones no desnaturizantes (en una solución exenta de modificador orgánico). Además, la elución del péptido se realiza en un solo pico.

40

45

De acuerdo con ello, en un aspecto general la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio de cationes para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido, y comprendiendo dicho proceso los pasos de:

50

a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquienol o C<sub>1-6</sub>-alquiniol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol, o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

55

60

b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores, mantenidos opcionalmente con un tampón.

65

En otro aspecto general, la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio de cationes para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines

constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de éstas, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- 5
- a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquino, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y
- 10 opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 15 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.

En otro aspecto general, la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines

20 constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- 25 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquino, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un
- 30 tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 35 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.

En otro aspecto general, la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines

40 constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- 45 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquino, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y
- 50 opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 55 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.

En los aspectos anteriores del presente proceso, la elución en el paso a) podría considerarse también como un paso de lavado de impurezas afines.

- 60 La elución del péptido en el paso b) ocurre en condiciones no desnaturizantes (en una solución exenta de modificador orgánico). Así, el péptido se eluye a una solución acuosa con una solución que comprende agua y opcionalmente un componente salino, un ácido o base y/o un tampón, pero sin la presencia de un modificador orgánico. El modificador orgánico en el paso a) se selecciona de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquino, urea, guanidina, o ácido C<sub>1-6</sub>-alcanoico, tal como ácido acético, C<sub>2-6</sub>-glicol, C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, preferiblemente C<sub>1-6</sub>-alcohol y C<sub>2-6</sub>-glicol, más preferiblemente metanol, etanol, propanoles y butanoles y hexil-

glicoles, muy preferiblemente etanol y 2-propanol. Cada uno de estos modificadores orgánicos constituye una realización alternativa de la presente invención.

5 En una realización de la presente invención, la ratio del modificador orgánico a agua, sobre una base de porcentaje en peso, es de 1:99 a 99:1, tal como desde 1:99 a 80:20, 20:80 a 80:20, 30:70 a 70:30, 35:50 a 50:35, ó 40:50 a 50:40, Cada uno de estos intervalos constituye una realización alternativa de la presente invención.

10 En una realización adicional de la presente invención, el componente salino en el paso a) se selecciona de cualquier sal orgánica o inorgánica y mixturas de éstas, preferiblemente NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mixturas de éstas, muy preferiblemente acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, y KCl. Cada uno de estos componentes salinos constituye una realización alternativa de la presente invención.

15 En una realización adicional de la presente invención, el gradiente del componente salino en el paso a) es un gradiente escalonado de componente salino.

20 En una realización adicional de la presente invención, el componente salino en el paso a) está presente en una concentración escalonado seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 3000 milimoles/kg, preferiblemente 1 milimol/kg a 1000 milimoles/kg, más preferiblemente 5 milimoles/kg a 500, muy preferiblemente 20 milimoles/kg a 300 milimoles/kg. Cada uno de estos intervalos constituye una realización alternativa de la presente invención.

25 En una realización adicional de la presente invención, el gradiente del componente salino en el paso a) es un gradiente lineal en el componente salino.

30 En una realización adicional de la presente invención, el componente salino en el paso a) está presente en una concentración lineal seleccionada de 0,1 milimoles/kg a 3000 milimoles/kg, preferiblemente 1 milimol/kg a 1000 milimoles/kg, más preferiblemente 5 milimoles/kg a 500, muy preferiblemente 20 milimoles/kg a 300 milimoles/kg. Cada una de estas concentraciones lineales constituye una realización alternativa de la presente invención.

En una realización adicional de la presente invención, no está presente ningún componente salino en el paso a).

35 En una realización adicional de la presente invención, el componente salino en el paso b) se selecciona de cualquier sal orgánica o inorgánica, preferiblemente NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mixturas de los mismos, muy preferiblemente acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, o KCl. Cada uno de estos componentes salinos constituye una realización alternativa de la presente invención.

40 En una realización adicional de la presente invención, el componente salino en el paso b) está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 3000 milimoles/kg, preferiblemente 1 milimol/kg a 1000 milimoles/kg, más preferiblemente 5 milimoles/kg a 500, y muy preferiblemente 20 milimoles/kg a 300 milimoles/kg. Cada uno de estos intervalos constituye una realización alternativa de la presente invención.

45 En una realización adicional de la presente invención, no está presente ningún componente salino en el paso b).

50 En una realización adicional de la presente invención, el tampón en el paso a) o b) se selecciona independientemente de tampones citrato, tampones fosfato, tampones Tris, tampones borato, tampones lactato, tampones glicil-glicina, tampones arginina, tampones carbonato, tampones acetato, tampones glutamato, tampones amonio, tampones glicina, tampones alquilamina, tampones aminoetil-alcohol, tampones etilendiamina, trietanolamina, tampones imidazol, tampones piridina y tampones barbiturato y mixturas de los mismos, preferiblemente ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de sodio, ácido fosfórico, ácido glutámico, glutamato de sodio, glicina, carbonato de sodio, citrato de potasio, fosfato de potasio, glutamato de potasio, carbonato de potasio, Tris-hidroxi-metil-amino-metano y ácido bórico y mixturas de los mismos. Cada uno de estos tampones constituye una  
55 realización alternativa de la presente invención.

60 En una realización adicional de la presente invención, el tampón en el paso a) está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 500 milimoles/kg, preferiblemente 1 milimol/kg a 200 milimoles/kg, más preferiblemente 5 milimoles/kg a 100 milimoles/kg, y muy preferiblemente 10 milimoles/kg a 50 milimoles/kg. Cada uno de estos intervalos constituye una realización alternativa de la presente invención.

65 En una realización adicional de la presente invención, el tampón en el paso b) está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 1000 milimoles/kg, preferiblemente 1 milimol/kg a 400 milimoles/kg, muy preferiblemente 50 milimoles/kg a 200 milimoles/kg. Cada uno de estos intervalos constituye una realización alternativa de la presente invención.

En una realización adicional de la presente invención, no está presente ningún tampón en el paso a).

En una realización adicional de la presente invención, no está presente ningún tampón en el paso b).

- 5 En una realización adicional de la presente invención, el péptido a purificar se selecciona de polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, receptores, virus, así como homólogos, análogos y derivados de los mismos, preferiblemente glucagón, hGH, insulina, aprotinina, Factor VII, TPA, Factor VIIa, FFR-Factor VIIa, heparinasa, ACTH, Proteína de Fijación de Heparina, factor de liberación de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín a glucagón, factor-1 de crecimiento afín a insulina, factor-2 de crecimiento
- 10 afín a insulina, factores de crecimiento de fibroblastos, péptido inhibidor gástrico, factor liberador de hormona del crecimiento, péptido activador de la adenilato-ciclasa hipofisaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores liberadores del hipotálamo, prolactina, hormonas estimulantes del tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opioides, DPP IV, interleucinas, inmunoglobulinas, inhibidores del complemento, inhibidores de serpina-proteasas, citocinas,
- 15 receptores de citocinas, PDGF, factores de necrosis tumoral, receptores de factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento y análogos así como derivados de los mismos, más preferiblemente glucagón, hGH, insulina, aprotinina, Factor VII, Factor VIIa, FFR-Factor VIIa, heparinasa, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín a glucagón, y análogos, así como derivados de los mismos, tales como Val<sup>6</sup>GLP-1(7-37), Thr<sup>6</sup>GLP-1(7-37), Met<sup>6</sup>GLP-1(7-37), Gly<sup>8</sup>GLP-1(7-37), Val<sup>8</sup>GLP-1(7-36) amida, Thr<sup>8</sup>GLP-1(7-36) amida, Met<sup>8</sup>GLP-1(7-36) amida, Gly<sup>8</sup>GLP-1(7-36) amida,
- 20 Arg<sup>34</sup>GLP-1(7-37), insulina humana, e insulina B28IsoAsp. Cada uno de estos péptidos constituye una realización alternativa de la presente invención.

Como ejemplo ilustrativo de la presente invención, la histidina tiene una carga neta positiva predominante inferior a

25 pH ~ 6,5; así, para intercambio de cationes, la sección de lavado o elución con disolvente o modificador orgánico podría realizarse a pH inferior a 6,5 para eliminar una forma truncada que carece de histidina, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por encima de pH 6,5. Como segundo ejemplo, el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal tiene una carga neta negativa predominante por encima de

30 pH 3,1; así, para intercambio de aniones, la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 3,1 para eliminar una forma extendida a una amida, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse tanto por encima como por debajo de pH 3,1. Como tercer ejemplo, el ácido aspártico tiene una carga neta negativa predominante por encima de pH ~ 4,4; así, para intercambio de aniones la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 4,4 para

35 eliminar una forma truncada que carezca de ácido aspártico, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por debajo de pH 4,4. Como cuarto ejemplo, el ácido glutámico tiene una carga neta negativa predominante por encima de pH ~ 4,4, por lo que, para intercambio de aniones, la sección de lavado o elución con un disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 4,4 para eliminar una forma trunca-

40 da que carece de ácido glutámico, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por debajo de pH 4,4. Como quinto ejemplo, el ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico tiene una carga neta negativa predominante por encima de pH ~ 4,4, por lo que para intercambio de aniones la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 4,4 para eliminar una forma que carece de uno o más grupos  $\gamma$ -carboxi de residuos específicos de ácido glutámico, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por debajo de pH 4,4. Como sexto ejemplo, el grupo amino del aminoácido N-terminal tiene una carga neta positiva predominante por debajo de pH ~ 8,0, por lo que para intercambio de cationes,

45 la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por debajo de pH 8,0 para eliminar una forma extendida con un grupo acilo, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse tanto por encima como por debajo de pH 8,0. Como séptimo ejemplo, la cisteína tiene una carga neta negativa predominante superior a pH ~ 8,5, por lo que para intercambio de aniones, la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 8,5 para eliminar una forma deficientemente plegada, dando como resultado residuos cisteína libres, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse tanto por debajo de pH 8,5. Como octavo ejemplo, la tirosina tiene una carga

50 neta negativa predominante por encima de pH ~ 10,0, por lo que para intercambio aniónico, la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por encima de pH 10,0 para eliminar una forma truncada que carezca de un residuo tirosina, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por debajo de pH 10,0. Como noveno ejemplo, la lisina tiene una carga neta positiva predominante inferior a pH ~ 10,0, por lo que, para intercambio de cationes, la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por debajo de pH 10,0 para eliminar una forma acilada en la cadena lateral del residuo lisina, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por debajo de pH 10,0. Como décimo ejemplo, la arginina tiene una carga neta positiva predominante inferior a pH ~ 12,0, por lo que, para intercambio de aniones, la sección de lavado o elución con disolvente orgánico podría realizarse por debajo de pH 12,0 para eliminar una forma truncada que carezca de un residuo arginina, y la elución subsiguiente de la proteína o péptido diana en el disolvente acuoso podría realizarse por encima de pH 12,0. (Los valores pK<sub>A</sub> utilizados en estos ejemplos son de L. Stryer. Biochemistry, 3<sup>a</sup> edición, W. H. Freeman y Company, Nueva York, Tabla 2-1 página 21).

Ejemplos específicos de péptidos del método arriba mencionado son la separación de Arg<sup>34</sup>GLP-1(7-37) y Arg<sup>34</sup>GLP-1(9/37) por cromatografía de intercambio de cationes, insulina humana y éster etílico del insulina humana B30 por

5 cromatografía de intercambio de aniones, B28IsoAsp insulina y Des B23-30 insulina por cromatografía de intercambio aniónico, protrombina y des-γ-carboxi-Glu-protrombina por cromatografía de intercambio aniónico, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(10-37)</sub> por cromatografía de intercambio de aniones, Lys<sup>B29</sup>-(N-ε(α-tetradecanoil))-desB30 insulina y DesB30 insulina por cromatografía de intercambio de cationes, Lys<sup>B29</sup>-(N-ε(α-tetradecanoil))-desB30 insulina y Lys<sup>B29</sup>-(N-ε(α-tetradecanoil))-A1-(N-ε(α-tetradecanoil))-desB30 insulina por cromatografía de intercambio de cationes, aprotinina y Des-Arg-Pro-aprotinina por cromatografía de intercambio de cationes, y Glucagon<sub>(1-29)</sub> y Glucagon<sub>(6-29)</sub> por cromatografía de intercambio de aniones.

10 Los péptidos pueden producirse por un método que comprende cultivar o fermentar una célula hospedadora que contiene una secuencia de DNA que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permitan la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante se recupera del cultivo o caldo de fermentación. En lo sucesivo, se utilizará cultivo para abarcar ambos términos de cultivo y fermentación y análogos.

15 El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para crecimiento de las células hospedadoras, tal como medios mínimos o complejos que contengan suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de suministradores comerciales o se pueden preparar conforme a recetas publicadas (v.g. en catálogos de la Americana Type Culture Collection). El péptido producido por las células puede recuperarse luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen, opcionalmente, lisis de células, 20 separación de las células hospedadoras del medio por centrifugación o filtración, precipitación de los componentes proteináceos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, v.g. sulfato de amonio, purificación por técnicas de purificación convencionales, tales como técnicas cromatográficas, en caso necesario purificación por cromatografía de intercambio iónico conforme a la presente invención, y posteriormente, sometimiento a tests analíticos, v.g., PAGE, IEF, en caso necesario, sometimiento a purificación ulterior, en caso necesario, y aislamiento del péptido 25 puro.

30 Durante la recuperación del péptido resultante del medio de cultivo, pero antes de la purificación por cromatografía de intercambio iónico conforme a la presente invención, la mixtura que comprende el péptido e impurezas afines puede modificarse opcionalmente por medios químicos convencionales, v.g. por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o análogamente.

35 La secuencia de DNA que codifica el péptido parental puede ser convenientemente de origen genómico o cDNA, por ejemplo obtenida por preparación de una biblioteca genómica o de cDNA y cribado respecto a secuencias de DNA que codifican la totalidad o parte del péptido por hibridación utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas conforme a técnicas estándar (cotéjese, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de DNA que codifica el péptido puede prepararse también sintéticamente por métodos estándar establecidos, v.g., el método del fosfoamido descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805, La secuencia de DNA puede prepararse también por reacción en cadena de 40 polimerasa utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., Science, 239 (1988), 487-491.

45 La secuencia de DNA puede insertarse en cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de DNA recombinantes, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que debe introducirse el mismo. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, v.g. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el o los cromosomas en que se ha integrado.

50 El vector es preferiblemente un vector de expresión en el cual la secuencia de DNA que codifica el péptido está unida operativamente a segmentos adicionales requeridos para transcripción del DNA, tales como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de DNA que exhiba actividad de transcripción en la célula hospedadora de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedadora. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del DNA codificante del péptido de la invención en una diversidad de células hospedadoras son bien conocidos en la técnica, cotéjese por ejemplo Sambrook *et al.*, 55 *supra*.

60 La secuencia de DNA que codifica el péptido puede también, en caso necesario, estar conectada operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias intensificadoras de la transcripción, y secuencias mejoradoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia de DNA que permita que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión.

65 El vector puede comprender también un marcador seleccionable, v.g. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedadora o uno que confiere resistencia a un fármaco, v.g., ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

Para dirigir un péptido al camino secretor de las células hospedadoras, puede proporcionarse una secuencia señal secretora (conocida también como secuencia conductora, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora está unida a la secuencia de DNA que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras están posicionadas comúnmente 5' respecto a la secuencia de DNA que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la asociada normalmente con el péptido o puede ser de un gen que codifique otra proteína secretada.

Los procedimientos utilizados para ligar las secuencias de DNA que codifican el péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertar las mismas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para replicación, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (cotéjese, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

La célula hospedadora en la cual se introduce la secuencia de DNA o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido presente e incluye bacterias, virus, v.g. baculovirus, levaduras, hongos, células de insecto y células eucariotas superiores. Ejemplos de células hospedadoras adecuadas bien conocidas y utilizadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o linajes de células BHK o CHO de mamífero.

Algunos de los péptidos, en particular los oligopéptidos, se pueden producir conforme a química convencional de síntesis de péptidos orgánicos. La mixtura sintética resultante puede modificarse luego químicamente, v.g. por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o análogas, y purificarse, o purificarse como tal y modificarse luego químicamente la misma como se ha mencionado anteriormente.

#### 25 Preparación del Factor VIIa

El factor humano purificado VIIa adecuado para uso en la presente invención se produce preferiblemente por tecnología de DNA recombinante, v.g. como ha sido descrito por Hagen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2412-2416, 1986, o como se describe en la Patente Europea No. 200,421 (ZymoGenetics). El Factor VIIa producido por tecnología recombinante puede ser Factor VIIa auténtico o un Factor VIIa más o menos modificado tal que dicho Factor VIIa tenga sustancialmente la misma actividad biológica para la coagulación de la sangre que el Factor VIIa auténtico. Dicho Factor VIIa modificado puede producirse por modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor VII sea por alteración de los codones de aminoácidos o por eliminación de algunos de los codones de aminoácidos en el ácido nucleico que codifica el FVII natural por medios conocidos, v.g. por mutagénesis orientada.

El Factor VII puede producirse también por los métodos descritos por Broze y Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983, Estos métodos producen Factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación de la sangre. Una preparación de Factor VII todavía más purificada puede obtenerse por inclusión de una filtración con gel adicional como el paso de purificación final. El Factor VII se convierte luego en el Factor VIIa activado por medios conocidos, v.g. por varias proteínas plasmáticas diferentes, tales como factor XIIa, IXa o Xa. Alternativamente, como ha sido descrito por Pjoern *et al.* (Research Disclosure, 269, septiembre 1986, pp. 564-565), el Factor VII puede activarse haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q® (Farmacia Fine Chemicals) o análogos.

45 El FVIIa modificado o desactivado (FVIIa) puede producirse por los métodos siguientes:

La Solicitud Internacional No. WO 92/15686 se refiere a Factor VIIa modificado, ácido polinucleico y linajes de células de mamífero para la producción de Factor VIIa modificado, y composiciones que comprenden Factor VIIa modificado para inhibición de la coagulación de la sangre.

El Factor VII modificado puede estar codificado por una molécula de polinucleótido que comprenda dos regiones codificantes de secuencia enlazadas operativamente que codifican, respectivamente, un péptido pre-pro y un dominio gla de una proteína plasmática dependiente de vitamina K, y una proteína Factor VII sin dominio gla, en la cual, después de la expresión, dicho polinucleótido codifica una molécula de Factor VII modificada que no activa significativamente los Factores X o IX del plasma, y es capaz de fijar el factor tisular.

La actividad catalítica del Factor VIIa puede ser inhibida por derivatización química del centro catalítico, o triada. La derivatización puede realizarse por reacción del Factor VII con un inhibidor irreversible tal como un compuesto organofosforado, un fluoruro de sulfonilo, un péptido de halometil-cetona o un azapéptido, o por acilación, por ejemplo. Halometilcetonas peptídicas preferidas incluyen PPACK (D-Phe-Pro-Arg clorometilcetona; (cotéjese Patente U.S. No. 4,318,904), D-Phe-Phe-Arg y Phe-Phe-Arg clorometilcetona (FFR-cmk); y DEGRck (dansil-Glu-Gly-Arg clorometilcetona).

La actividad catalítica del Factor VIIa puede ser inhibida también por sustitución, inserción o delección de aminoácidos. En realizaciones preferidas, las sustituciones de aminoácidos se hacen en la secuencia de aminoácidos de la triada catalítica del Factor VII, definida en esta memoria como las regiones, que contienen los aminoácidos, que contribuyen al sitio catalítico del Factor VIIa. Las sustituciones, inserciones o delecciones en la triada catalítica se encuentran generalmente en o adyacentes a los aminoácidos que forman el sitio catalítico. En las proteínas del Factor VII humanas y bovinas, los aminoácidos que forman una triada "catalítica" son Ser<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub>, e His<sub>193</sub> (indicando la numeración con subíndices la posición en la secuencia). Los sitios catalíticos en el Factor VII de otras especies de mamífero pueden determinarse utilizando técnicas disponibles actualmente que incluyen, entre otras, aislamiento de proteínas y análisis de la secuencia de aminoácidos. Los sitios catalíticos pueden determinarse también por alineación de una secuencia con la secuencia de otras serina-proteasas, particularmente quimotripsina, cuyo sitio activo ha sido determinado previamente (Sigler et al, J Mol. Biol., 35: 143-164 (1968)), y determinando después de ello a partir de dicha alineación los residuos de sitio activo análogos.

En realizaciones preferidas de Factor VII humano y bovino, el residuo del sitio activo Ser<sub>344</sub>, se modifica reemplazándolo con Gly, Met, Thr, o más preferiblemente, Ala. Dicha sustitución podría hacerse por separado o en combinación con una o más sustituciones en otros sitios de la triada catalítica, que incluyen His<sub>193</sub> y Asp<sub>242</sub>.

Los aminoácidos que forman el sitio catalítico en el Factor VII, tales como Ser<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub>, e His<sub>193</sub> en el Factor VII humano y bovino, pueden sustituirse o deleccionarse. En la presente invención, se prefiere cambiar únicamente un solo aminoácido, minimizando así la probabilidad de aumento de la antigenicidad de la molécula o inhibiendo su capacidad para fijar factor tisular; sin embargo, pueden hacerse dos o más cambios de aminoácidos (sustituciones, adiciones o delecciones) y pueden hacerse también combinaciones de una o más sustituciones, adiciones o delecciones. En una realización preferida para Factor VII humano y bovino, Ser<sub>344</sub> se sustituye preferiblemente con Ala, pero pueden sustituirse Gly, Met, Thr u otros aminoácidos. Se prefiere reemplazar Asp con Glu y reemplazar His con Lys o Arg. En general, las sustituciones se eligen para romper la estructura terciaria de la proteína lo menos posible. El modelo de Dayhoff et al. (en Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), incorporado en esta memoria por referencia, puede utilizarse como guía en la selección de otras sustituciones de aminoácidos. Es posible introducir alteraciones de residuos como se han descrito arriba en el sitio catalítico de la secuencia del Factor VII apropiada de humano, bovino u otras especies y testar la proteína resultante respecto a un nivel deseado de inhibición de la actividad catalítica y la actividad anticoagulante resultante como se describe en esta memoria. Para el Factor VII modificado, la actividad catalítica se inhibirá sustancialmente, generalmente menos de aproximadamente 5% de la actividad catalítica del Factor VII de tipo salvaje de la especie correspondiente, y de modo más preferible menos de aproximadamente 1%.

El Factor VII modificado puede producirse por el uso de técnicas de DNA recombinante.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos pueden realizarse por una diversidad de técnicas. La modificación de la secuencia de DNA puede hacerse por mutagénesis orientada. Métodos para mutagénesis orientada son bien conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, por Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984). Así, utilizando las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del Factor VII, es posible introducir la o las alteraciones de elección. El Factor VII a modificar puede producirse también por métodos químicos. FFR-FVIIa (es decir, D-Phe-Phe-Arg-FVIIa).

#### EJEMPLO FFR clorometilcetona

Bloqueo del sitio activo de FVIIa con FFR-clorometilcetona.

El bloqueo del sitio activo serina e histidina con clorometilcetona es un método bien conocido para desactivación irreversible de serina-proteasas. A fin de optimizar el bloqueo de una proteasa dada es importante seleccionar un derivado de clorometilcetona, que reacciona específicamente con el sitio activo y con una tasa de asociación rápida. Tales derivados pueden desarrollarse por fijación al grupo clorometilcetona de un oligopéptido, que interacciona, con la bolsa de fijación de sustrato de la serina-proteasa particular de interés.

Glutamil-glicil-arginina-clorometilcetona (EGR-ck o su derivado Dansilo, DEGR-ck) (S. Higashi, H. Nishimura, S. Fujii, K. Takada, S. Iwanaga, (1992) J. Biol. Chem. 267, 17990) o prolil-fenil-arginina (PFR-ck) (J. H. Lawson, S. Butenas, K. Mann, (1992) J. Biol. Chem. 267, 4834; J. Contrino, G. A. Hair, M. A. Schmeizl, F.

R. Rickles, D. L. Kreutzer (1994) Am. J. Pathol. 145, 1315) se han aplicado como inhibidores del sitio activo de FVIIa. Comparada con estas clorometilcetonas, la aplicación de FFRck representa un aumento de velocidad de 10-70 veces.

La especificidad de la reacción con el derivado FFR-clorometilcetona de FVIIa se comprobó por HPLC y mapeado de péptidos, que demostraron que FVIIa había reaccionado con FFR-clorometilcetona en una ratio 1:1 de tal modo que podía recuperarse > 98% como el producto esperado derivatizado en histidina 193.



*Desactivación de FVIIa por diversas clorometilcetonas:*

Se incubó FVIIa 3  $\mu$ M con 12  $\mu$ M de derivado de clorometilcetona en TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,01% Tween-80, pH 7,4. Se extrajeron muestras a diversos intervalos de tiempo como se indica y se diluyeron 20 veces para medidas de actividad en TrisHCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,01% Tween-80, pH 7,4 que contenía Ile-Pro-Arg-pNA 1 mM. La actividad residual de FVIIa se midió por aumento de absorbancia a 405 nm.

Usualmente, la mezcla que comprende el péptido y las impurezas afines a purificar por cromatografía de intercambio iónico conforme a la presente invención, contendrá también aminoácidos, péptidos pequeños, péptidos grandes, proteínas no afines, sustancias reaccionantes, residuos celulares, HCP, endotoxinas, y/o virus dependiendo de si se han utilizado técnicas de DNA recombinante y/o técnicas de modificación química, o de si se han utilizado técnicas de química orgánica de síntesis de péptidos.

Así, cualquier método, tal como un método industrial, para producción de un péptido puro, que incluye un proceso IEC conforme a la presente invención, es también un aspecto de la presente solicitud.

Conforme a ello, la presente invención se refiere en un aspecto adicional a un método industrial para producción de un péptido puro, incluyendo el método un proceso de cromatografía de intercambio de cationes para purificar un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, y comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- a) elución de dichas impurezas peptídicas rotativas de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquenoil o C<sub>1-6</sub>-alquinoil, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanóico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.

La presente invención se refiere en un aspecto adicional a un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método la purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de éstas, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de cationes, comprendiendo el proceso de cromatografía de intercambio de cationes los pasos de:

- a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquenoil o C<sub>1-6</sub>-alquinoil, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanóico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón;

y posteriormente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

La presente invención se refiere en un aspecto adicional a un método para producción de un péptido puro, incluyendo el método un proceso de cromatografía de intercambio de aniones para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

5 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

10 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón;

y posteriormente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

15 La presente invención se refiere en un aspecto adicional a un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método la purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, y mezclas de éstas, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de cationes, comprendiendo el proceso los pasos de:

25 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

30 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.

35 La presente invención se refiere en otro aspecto adicional a un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método la purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, y mezclas de éstas, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de cationes, comprendiendo el proceso los pasos de:

45 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global, y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

50 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón;

55 y subsiguientemente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

60 La presente invención se refiere en otro aspecto adicional a un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, y mezclas de éstas, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente

comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de aniones, comprendiendo el proceso de cromatografía de intercambio de aniones los pasos de:

- 5 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquínol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho
- 10 péptido tiene una carga neta negativa local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 15 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón;

y subsiguientemente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

- 20 Cualquier combinación posible de dos o más de las realizaciones descritas en esta memoria, está comprendida dentro del alcance de la presente invención.

El término "un modificador orgánico" como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto inducir una selectividad favorable y modificada entre la impureza o impurezas afines no deseadas y el péptido y el cambiador de iones. Si un modificador seleccionado induce o no dicha selectividad dependerá usualmente de la impureza o impurezas en cuestión, y puede ser testado por tanteos. El modificador orgánico se selecciona de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquínol, urea, guanidina-HCl, o ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico, tal como ácido acético, C<sub>2-6</sub>-glicol, C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares o mixturas de los mismos.

30 Los términos "C<sub>1-6</sub>-alcanol", "C<sub>1-6</sub>-alquenol" o "C<sub>1-6</sub>-alquínol" como se utilizan en esta memoria, solos o en combinación, debe entenderse que incluyen aquellos grupos C<sub>1-6</sub>-alcano, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquino de la longitud deseada en una configuración lineal, ramificada o cíclica, a la que está unido un hidroxilo (-OH) (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición). Ejemplos de alcoholes lineales son metanol, etanol, n-propanol, alcohol alílico, n-butanol, n-pentanol y n-hexanol. Ejemplos de alcoholes ramificados son 2-propanol y alcohol terc-butílico.

35 Ejemplos de alcoholes cíclicos son alcohol ciclopropílico y 2-ciclohexen-1-ol.

El término "ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir un grupo de la fórmula R'-COOH en la cual R' es H o C<sub>1-5</sub>-alquilo, tal como los ácidos acético, propiónico, butírico, metilbutírico, o valérico (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición).

40 El término "C<sub>1-5</sub>-alquilo", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. Grupos C<sub>1-5</sub>-alquilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, y análogos (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición).

45 El término "C<sub>2-6</sub>-glicol", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir un alcano C<sub>2-6</sub>, que contiene dos grupos hidroxilo en átomos de carbono diferentes que pueden ser adyacentes o no. Un C<sub>2-6</sub>-glicol típico incluye, pero sin carácter limitante, 1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, 2-metil-2,4-pentanodiol (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición).

50 El término "C<sub>2-6</sub>-alcano", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye un grupo alcano ramificado o lineal que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. Grupos C<sub>2-6</sub>-alcano típicos incluyen, pero sin carácter limitante, etano, propano, isopropano, butano, isobutano, pentano, hexano y análogos (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición).

55 El término "C<sub>3-7</sub>-polialcohol que incluye azúcares", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye un grupo de la fórmula HOCH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OH, en donde n es un número entero de 1 a 5, y monosacáridos tales como manosa, glucosa (cotéjese Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª edición).

60 El término "péptido" o "péptidos", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye tales polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, así como homólogos, análogos y derivados de los mismos, que son susceptibles de ser producidos por técnicas convencionales de DNA recombinante así como por métodos convencionales de síntesis. Tales péptidos incluyen, pero sin carácter limitante, glucagón, hGH, insulina, aprotinina, Factor VII, TPA, Factor VIIa (NovoSeven®, disponible de Novo Nord-isk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), Factor VIIai, FFR-Factor VIIa, heparinasa,

65 ACTH, factor liberador de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín

a glucagón, factor-1 de crecimiento afín a insulina, factor-2 de crecimiento afín a insulina, péptido inhibidor gástrico, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptidos activadores de la adenilato-ciclasa hipofisaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores liberadores hipotalámicos, prolactina, hormonas estimulantes del tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opioides, GIP, exendinas, péptido histidina-metionina-amida, helospectinas, helodermina, péptido afín al péptido activador de la adenilato-ciclasa hipofisaria, polipéptido intestinal vasoactivo y análogos de los mismos, en donde el término análogo se utiliza para designar un péptido en el cual uno o más residuos de aminoácido del péptido parental han sido sustituidos por otro residuo de aminoácido y/o en el cual uno o más residuos de aminoácido del péptido parental han sido delecionados y/o en el cual uno o más residuos del aminoácido han sido añadidos al péptido parental. Dicha adición puede tener lugar sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del péptido parental o en ambos. El término derivados se utiliza en el presente texto para designar un péptido en el cual uno o más de los residuos de aminoácido del péptido parental ha sido modificado químicamente, v.g. por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o procedimientos análogos.

El término "componente salino" como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto incluir cualquier sal orgánica o inorgánica, con inclusión pero sin carácter limitante de NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mixturas de los mismos (cotéjese Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, o Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19<sup>a</sup> (1995), o manuales de Amersham-Pharmacia Biotech).

El término "un tampón" como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye cualquier tampón con inclusión pero sin carácter limitante de: tampones citrato, tampones fosfato, tampones Tris, tampones borato, tampones lactato, tampones glicil-glicina, tampones arginina, tampones carbonato, tampones acetato, tampones glutamato, tampones amonio, tampones glicina, tampones alquilamina, tampones aminoetil-alcohol, tampones etilendiamina, trietanolamina, tampones imidazol, tampones piridina y tampones barbiturato y mixturas de los mismos (cotéjese Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, o Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19<sup>a</sup> (1995), o manuales de Amersham-Pharmacia Biotech).

La elección del pH inicial, el tampón y la concentración iónica se realizan conforme a técnicas bien conocidas tales como métodos convencionales en tubo de ensayo, cotéjense p.ej. los manuales de Amersham-Pharmacia Biotech. La resina cromatográfica de intercambio iónico se selecciona dependiendo del péptido específico a purificar y las condiciones empleadas, tales como pH, tampón, concentración iónica, etc., que son conocidas por las personas expertas en la técnica (es decir, típicamente, pH inferior al punto isoeléctrico (pI) del péptido para las resinas de intercambio de cationes y el pH por encima del pI del péptido para resinas de intercambio de aniones, una concentración de tampón suficiente para mantener el pH deseado, y una concentración iónica suficientemente baja inducida posiblemente por la concentración de sal), e incluye pero sin carácter limitante resinas Sepharose, resinas Sephadex, resinas Streamline, resinas Source de Amersham-Pharmacia Biotech, resinas HyperD, resinas Trisacryl, y resinas Spherosil de BioSeptra, resinas TSKgel y resinas Toyopearl de TosoHaas, resinas Fractogel EMD de Merck, resinas Poros de Perseptive Biosystems, resinas Macro-Prep de BioRAD, resinas Expression de Whatman etc.

El término "una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón" como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto significar una solución que contiene uno o más modificadores orgánicos, agua, uno o más componentes salinos o ningún componente salino y uno o más tampones o ningún tampón, y opcionalmente uno o más componentes convencionales adicionales que la persona experta en la técnica podría considerar añadir, conforme a procesos de cromatografía de intercambio iónico convencionales.

El término "impurezas afines", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que significa una o más impurezas con una carga neta global diferente del péptido, constituida(s) por formas truncadas, toda clase de formas extendidas (aminoácidos suplementarios, diversos derivados con inclusión de ésteres, etc.), formas desamidadas, formas plegadas incorrectamente, formas con glicosilación no deseada que incluyen sialilación, "falta de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico", y otras, con tal que las mismas se eluyan antes del péptido.

El término "valores de pH", como se utiliza en esta memoria en conexión con "a valores de pH", "a los mismos o inferiores valores de pH" y "a los mismos o superiores valores de pH", debe entenderse que significa que el valor del pH en el paso a) puede ser constante o puede variar, típicamente, dentro de 3 unidades de pH, y posteriormente, el valor de pH en el paso b) puede ser el mismo valor constante o variable de pH que en el paso a), o puede encontrarse a un valor de pH diferente, que puede ser constante o puede variar, típicamente, dentro de 3 unidades de pH. Tales valores de pH pueden mantenerse típicamente o modificarse por adición de un tampón y/o un ácido o base inorgánico u orgánico, v.g. HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O, ácido acético, NH<sub>3</sub>, KOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y ácido cítrico.

El término "inferior", como se utiliza en esta memoria, en conexión con impurezas afines que tienen una carga neta negativa local o global (o positiva) que es más bajo que la carga neta negativa (o positiva) del péptido, debe

entenderse que significa que el valor numérico de la carga neta local o global de las impurezas afines es menor que el valor numérico de la carga neta local o global de dicho péptido.

La presente invención se refiere también a los aspectos siguientes:

5 Aspecto 1, Un proceso de cromatografía de intercambio de cationes para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico y mezclas de las mismas con tal que éstas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- 15 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de  $C_{1-6}$ -alcohol,  $C_{1-6}$ -alquenol o  $C_{1-6}$ -alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido  $C_{1-6}$  alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 20 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.

25 Aspecto 2, Un proceso de cromatografía de intercambio de aniones para purificación de un péptido a partir de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico y mezclas de las mismas con tal que éstas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:

- 35 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de  $C_{1-6}$ -alcohol,  $C_{1-6}$ -alquenol o  $C_{1-6}$ -alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido  $C_{1-6}$  alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón, en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.
- 40 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.

45 Aspecto 3, El proceso conforme al aspecto 1 ó 2 en el cual la ratio de modificador orgánico a agua sobre una base de porcentaje en peso es de 1:99 a 99:1.

50 Aspecto 4, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-3 en el cual dicho componente salino en el paso a) se selecciona de cualquier sal orgánica o inorgánica.

55 Aspecto 5, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-4 en el cual dicho componente salino en el paso a) es preferiblemente NaCl, KCl,  $NH_4Cl$ ,  $CaCl_2$ , acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mezclas de los mismos.

Aspecto 6, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-4, en el cual no está presente ningún componente salino en el paso a).

60 Aspecto 7, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-6 en el cual dicho gradiente del componente salino en el paso a) es un gradiente escalonado o lineal del componente salino.

65 Aspecto 8, El proceso conforme al aspecto 7 en el cual dicho componente salino está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 3000 milimoles/kg.

Aspecto 9, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-8 en el cual dicho componente salino en el paso b) se selecciona de cualquier sal orgánica o inorgánica, preferiblemente NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mezclas de los mismos.

5 Aspecto 10, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-9, en donde en el paso b) dicho componente salino está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 3000 milimoles/kg.

10 Aspecto 11, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-8, en el cual no está presente ningún componente salino en el paso b).

15 Aspecto 12, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-11, en el cual dicho tampón en el paso a) o b) se selecciona independientemente de tampones citrato, tampones fosfato, tampones Tris, tampones borato, tampones lactato, tampones glicil-glicina, tampones arginina, tampones carbonato, tampones acetato, tampones glutamato, tampones amonio, tampones glicina, tampones alquilamina, tampones aminoetil-alcohol, tampones etilendiamina, trietanolamina, tampones imidazol, tampones piridina y tampones barbiturato y mezclas de los mismos.

20 Aspecto 13, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-12, en el cual dicho tampón en el paso a) está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 500 milimoles/kg.

25 Aspecto 14, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-13, en el cual dicho tampón en el paso b) está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0,1 milimoles/kg a 1000 milimoles/kg.

Aspecto 15, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-11, en el cual no está presente ningún tampón en el paso a).

30 Aspecto 16, El proceso conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-11, en el cual no está presente ningún tampón en el paso b).

35 Aspecto 17, Un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método la purificación de un péptido a partir de una mezcla que contiene dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma trunca, forma extendida, forma desamada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de cationes, comprendiendo dicho proceso de cromatografía de intercambio de cationes los pasos de:

40 a) eluir dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquilo, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub>-alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol, o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mezclas de los mismos; agua, opcionalmente componente salino, y opcionalmente un tampón, a un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

45 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón;

50 y posteriormente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

55 Aspecto 18, Un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método purificación de un péptido a partir de una mezcla que contiene dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma trunca, forma extendida, forma desamada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico y mezclas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparada con dicho péptido, por un proceso de cromatografía de intercambio de aniones, comprendiendo el proceso de cromatografía de intercambio de aniones los pasos de:

60 a) eluir dichas impurezas peptídicas afines de dicha mezcla en una solución constituida esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alqueno o C<sub>1-6</sub>-alquilo, urea,

guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub>-alcanoico (con inclusión de ácido acético), C<sub>2-6</sub>-glicol, o C<sub>3-7</sub>-polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos; agua, opcionalmente componente salino, y opcionalmente un tampón, a un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón de tal modo que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido para eliminar dichas impurezas peptídicas afines.

b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón;

y posteriormente, en caso necesario, sometimiento a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.

Aspecto 19, El proceso o método conforme a uno cualquiera de los aspectos 1-18, en el cual dicho péptido a purificar se selecciona de polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, receptores, virus, así como homólogos, análogos y derivados de los mismos, preferiblemente glucagón, hGH, insulina, aprotinina, FVII, TPA, FVIIa, FFR-VIIa, heparinasa, ACTH, Proteína de Fijación de Heparina, factor de liberación de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín a glucagón, factor-1 de crecimiento afín a insulina, factor-2 de crecimiento afín a insulina, factores de crecimiento de fibroblastos, péptido inhibidor gástrico, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptidos activadores de la adenilato-ciclasa hipofisaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotalámicos, prolactina, hormonas estimulantes del tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opioides, DPP IV, interleucinas, inmunoglobulinas, inhibidores del complemento, inhibidores de serpin-proteasa, citocinas, receptores de citocinas, PDGF, factores de necrosis tumoral, receptores de factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento, GIP, exendinas, péptido histidina-metionina-amida, helospectinas, helodermina, péptido activador de la adenilato-ciclasa hipofisaria-péptido afín, polipéptido vasoactivo intestinal y análogos, así como derivados de los mismos, más preferiblemente glucagón, hGH, insulina, aprotinina, FVII, FVIIa, FFR-FVIIa, heparinasa, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín a glucagón y análogos así como derivados de los mismos, tales como Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, insulina humana, e insulina B28Iso Asp.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra ulteriormente por los ejemplos siguientes que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de protección. Las características expuestas en la descripción que antecede y en los ejemplos que siguen pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, ser importantes para la realización de la invención en diversas formas de la misma.

#### Ejemplo 1:

Se expresó Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por tecnología convencional de DNA recombinante v.g. como se describe en WO 98/08871, El caldo de fermentación de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> se purificó por un paso de captura cromatográfica convencional en fase inversa, y se precipitó subsiguientemente al pI (punto isoelectrico) de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>. 2 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada que carecía de un residuo histidina y un residuo alanina, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 100 ml de agua y se disolvieron por ajuste de pH a 8,2, La mixtura resultante se ajustó a pH 3,4 y se filtró. Se aplicaron 21 ml del filtrado a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml de ácido cítrico de 20 milimoles/kg, 75 milimoles/kg KCl, 45% p/p etanol, y pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente escalonado de 60 ml de ácido cítrico de 20 milimoles/kg, 87,5 milimoles/kg de KCl, 45% p/p etanol, pH 3,5, El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml de Tris-hidroximetil-aminometano de 200 milimoles/kg, pH 8,5. Se muestra Un cromatograma en la Figura 1.

El análisis RP-HPLC para identificación-verificación de los picos recogidos se llevó a cabo en una columna sustituida C<sub>18</sub> de sílice 120 Å (YMC) de 4,0 x 250 ml con partículas de 5 µm. El tampón A consistía en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 M en acetonitrilo al 7,8%, pH 2,5, y el tampón B contenía 63,4% acetonitrilo. Se hicieron pasar gradientes lineales de 37-41% B en 12 min seguido por 41-100% B en 15 min a un caudal de 1 ml/min. La temperatura cromatográfica se mantuvo a 60°C y la detección UV se realizó a 214 nm. Los resultados analíticos fueron:

	Contenido de Arg <sup>34</sup> GLP-1 <sub>(7-37)</sub>	Contenido de Arg <sup>34</sup> GLP-1 <sub>(9-37)</sub>
Muestra para aplicación	48%	18%
Lavado que contiene etanol	1%	76%
Eluato acuoso	65%	1%

Los cromatogramas de la muestra para aplicación y el eluato se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente. Los resultados analíticos muestran una eliminación selectiva de la forma truncada por el paso de lavado que contenía etanol y una fuerte reducción de la forma truncada en el eluato acuoso por empleo del método cromatográfico de intercambio de cationes.

Ejemplo 2:

Se purificó un caldo de fermentación Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> por cromatografía de intercambio de cationes y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

2 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como impureza se suspendieron y disolvieron en 100 ml de glicina de 20 milimoles/kg, pH 9,0 dando como resultado un pH final de 8,4. La mixtura resultante se ajustó a pH 3,5 y se filtró. Se aplicaron 52 ml del filtrado a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 20 milimoles/kg, 75 milimoles/kg de KCl, 45% p/p etanol, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente escalonado de 60 ml de ácido cítrico de 20 milimoles/kg, KCl 87,5 milimoles/kg, 45% p/p etanol, pH 3,5. El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,0. El análisis RP-HPLC para identificación/verificación de los picos recogidos se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados analíticos muestran una eliminación selectiva de la forma truncada por el paso de lavado que contenía etanol y una fuerte reducción de la forma truncada en el eluato acuoso por empleo del método cromatográfico de intercambio de cationes.

Ejemplo 3:

Se purificó un caldo de fermentación Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> por un paso de captura por cromatografía convencional de intercambio de cationes seguido por un paso de purificación convencional RP-HPLC.

Se añadieron 4 volúmenes de agua al depósito de RP-HPLC que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como impureza. Se ajustaron 175 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml de ácido cítrico de 20 mmol/kg, KCl 75 mmol/kg, 45% p/p etanol, y pH 3,5. La columna se lavó con 20 ml de solución de equilibración, y la forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de KCl 75 a 100 mmol/kg (ácido cítrico 20 mmol/kg, 45% p/p etanol, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 100 mmol/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 4.

Ejemplo 4:

Se expresó Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se capturó por intercambio de cationes, y se purificó por RP-HPLC como se describe en el Ejemplo 3.

Se añadió 1 volumen de agua al depósito de RP-HPLC que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como impureza. Se ajustaron 86 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml de ácido cítrico de 20 mmol/kg, KCl de 75 mmol/kg, 45% p/p etanol, pH 3,5. La columna se lavó con 20 ml de solución de equilibración, y la forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de KCl 75 a 100 mmol/kg (ácido cítrico de 20 mmol/kg, 45% p/p etanol, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> se eluyó con un gradiente escalonado de 100 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> de 100 mmol/kg, NaCl de 100 mmol/kg, pH 9,5.

Ejemplo 5:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas, se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, 34% p/p etanol, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,29% p/p KCl (ácido cítrico 0,42% p/p, etanol 34% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 5.

Ejemplo 6:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.



10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,2 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, 29% p/p etanol, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,96% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 29% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó con un gradiente escalonado de 100 ml de glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5.

10 Ejemplo 7:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

15 10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 a una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante se ajustaron a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 51% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,00% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol 51% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó con un gradiente escalonado de 100 ml de glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5.

Ejemplo 8:

25 Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

30 10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 71% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 0,48% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 71% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó con un gradiente escalonado de 100 ml de glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5.

35 Ejemplo 9:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

40 10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, 2-propanol de 40% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 0,61% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, 2-propanol de 40% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 6.

50 Ejemplo 10:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> a partir del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

55 10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 8 ml Poros 50 HS (PE Biosystems) equilibrada con 24 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 51% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,34% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, etanol de 51% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó con un gradiente escalonado de 40 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 7.

60 Ejemplo 11:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

65

10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 8 ml Poros 50 HS (PE Biosystems) equilibrada con 24 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, propanol de 40% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,34% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, 2-propanol de 40% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó con un gradiente escalonado de 40 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 8.

10 Ejemplo 12:

Se aisló Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> del caldo de fermentación por cromatografía convencional en fase inversa y se precipitó como se describe en el Ejemplo 1.

15 10 g del precipitado que contenía Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> y la forma truncada, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(9-37)</sub>, como una de varias impurezas se suspendieron en 500 ml de agua y se disolvieron por ajuste del pH a 8,3 hasta una concentración de Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub> de aproximadamente 1,6 mg/ml. Se ajustaron 5 ml de la solución resultante a pH 3,5 y se aplicaron a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml de ácido cítrico de 0,42% p/p, 2-metil-2,4-pentanodiol de 40% p/p, pH 3,5. La forma truncada se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 0,60% p/p KCl (ácido cítrico de 0,42% p/p, 2-metil-2,4-pentanodiol de 40% p/p, pH 3,5). El péptido diana, Arg<sup>34</sup>GLP-1<sub>(7-37)</sub>, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 100 ml glicina de 200 milimoles/kg, pH 9,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 9.

25 Ejemplo 13:

Se obtuvo una mezcla de 7,7 miligramos/ml de insulina humana y 0,8 miligramos/ml de éster etílico de insulina humana (B30) por métodos convencionales como se describe en otro lugar (cf. I. Møllerup, S.W. Jensen, P. Larsen, O. Schou, L. Snel: Insulin, Purification, in M.C. Flickinger, S.W. Drew: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, John Wiley & Sons, 1999). La mezcla contenía 4 milimoles/l de EDTA, 16% p/p etanol, pH 7,5. Se aplicaron 2 ml de la mezcla a una columna de 20 ml TSK-Gel Q-5PW (TosoHaas) equilibrada con 40 ml de trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 42,5% p/p, pH 7,5. La impureza éster etílico de insulina humana se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,14% p/p de citrato de sodio trihidratado (trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 42,5% p/p, pH 7,5). La proteína diana, insulina humana, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 60 ml de solución de citrato de sodio trihidratado de 2,72% p/p, trietanolamina de 0,15% p/p, pH 7,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 10.

Ejemplo 14:

40 Se obtuvo una mezcla de insulina humana y éster etílico de insulina humana (B30) se obtuvo como se describe en el Ejemplo 13. Se aplicaron 2 ml de la mezcla a una columna de 20 ml TSK-Gel Q-5PW (TosoHaas) equilibrada con 40 ml de 0,15% p/p trietanolamina, 42,5% p/p etanol, pH 7,5. La impureza éster etílico de insulina humana se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 0,90% p/p citrato de sodio trihidratado (trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 42,5% p/p, pH 7,5). La proteína diana insulina humana, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 60 ml ácido cítrico de 100 milimoles/l, pH 3. Se muestra un cromatograma en la Figura 11.

45 Ejemplo 15:

Una mezcla de insulina humana y éster etílico de insulina humana (B30) se obtuvo como se describe en el Ejemplo 13. Se aplicaron 2 ml de la mezcla a una columna de 20 ml TSK-Gel Q-5PW (TosoHaas) equilibrada con 40 ml de trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 71% p/p, pH 7,5. La impureza éster etílico de insulina humana se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 1,63% p/p citrato de sodio trihidratado (0,15% p/p trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 71% p/p, pH 7,5). La proteína diana insulina humana, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 60 ml de 2,72% p/p citrato de sodio trihidratado, trietanolamina de 0,15% p/p, pH 7,5.

55 Ejemplo 16:

60 Una mezcla de 9,0 mg/ml de insulina humana y 0,6 mg/ml de éster etílico de insulina humana (B30) se obtuvo como se describe en el Ejemplo 13. La mezcla contenía 4 milimoles/l EDTA, pH 7,5 con una concentración de insulina humana de 9 mg/ml. Se aplicaron 2 ml de la mezcla a una columna de 20 ml TSK-Gel Q-5PW (TosoHaas) equilibrada con 40 ml de trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 81% p/p, pH 7,5. La impureza éster etílico de insulina humana se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal de 0 a 2,18% p/p citrato de sodio trihidratado (trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 81% p/p, pH 7,5). La proteína diana, insulina humana, se eluyó en un solo pico con un gradiente escalonado de 60 ml de citrato de sodio trihidratado de 2,72% p/p, trietanolamina de 0,15% p/p, pH 7,5. Se muestra un cromatograma en la Figura 12.

65

Ejemplo 17:

5 Una mezcla de insulina humana y éster etílico de insulina humana (B30) se obtuvo como se describe en el Ejemplo 16. Se aplicaron 2 ml de la mezcla a una columna de 20 ml TSK-Gel Q-5PW (TosoHaas) equilibrada con 40 ml de trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 51% p/p, pH 7,5. La impureza éster etílico de insulina humana se eluyó/eliminó por lavado con un gradiente lineal desde 0 a 1,09% p/p citrato de sodio tri-hidratado (trietanolamina de 0,15% p/p, etanol de 51% p/p, pH 7,5). La proteína diana, insulina humana, se eluyó en un solo pico con un  
10 gradiente escalonado de 60 ml de citrato de sodio trihidratado de 2,72% p/p, trietanolamina de 0,15% p/p, pH 7,5.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso de cromatografía de intercambio de cationes para purificación de un péptido a partir de una  
 5 mixtura que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma  
 extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que  
 carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido,  
 teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido, y  
 comprendiendo dicho proceso los pasos de:
- 10 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución que comprende un  
 modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-  
 HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-polialcohol con inclusión de  
 15 azúcares, y mixturas de los mismos;  
 agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón;  
 en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino;  
 y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una  
 carga neta positiva local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o  
 global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas  
 20 afines; y  
 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso  
 exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o  
 mayores  
 mantenidos opcionalmente con un tampón.
- 25 2. Un proceso de cromatografía de intercambio de aniones para purificación de un péptido a partir de una  
 mixtura que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma  
 extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que  
 carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido,  
 30 teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido,  
 comprendiendo dicho proceso los pasos de:
- a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución que comprende un  
 modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-  
 35 HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-polialcohol con inclusión de  
 azúcares, y mixturas de los mismos;  
 agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón;  
 en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos  
 opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o  
 global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la  
 40 carga neta negativa de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas afines; y  
 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente  
 acuoso exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o  
 mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.
- 45 3. Un método industrial para producción de un péptido puro, incluyendo el método un proceso de cromatografía  
 de intercambio de aniones para purificación de un péptido a partir de una mixtura que comprende dicho péptido e  
 impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma  
 plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y  
 50 mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga  
 neta local o global diferente comparadas con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:
- a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución constituida  
 esencialmente por un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcohol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea,  
 55 guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-  
 polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos;  
 agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón;  
 en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos  
 opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global  
 60 y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga  
 neta positiva de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas afines; y  
 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente  
 acuoso exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o  
 mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.

4. Un método industrial para producción de un péptido puro, incluyendo el método un proceso de cromatografía de intercambio de aniones para purificación de un péptido a partir de una mixtura que comprende dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido, comprendiendo dicho proceso los pasos de:
- 5 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón; en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas afines; y
- 10 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.
- 15
5. Un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método purificación de un péptido a partir de una mixtura que contiene dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido por un proceso de cromatografía de intercambio de cationes, comprendiendo el proceso de cromatografía de intercambio de cationes los pasos de:
- 25 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón; en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una carga neta positiva local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta positiva local o global que es menor que la carga neta positiva de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas afines; y
- 30 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o mayores mantenidos opcionalmente con un tampón.
- 35
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que incluye adicionalmente sometimiento de dicho péptido eluido a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislamiento de dicho péptido de manera convencional.
- 45
7. Un método para aislamiento de un péptido, incluyendo el método la purificación de un péptido a partir de una mixtura que contiene dicho péptido e impurezas peptídicas afines constituidas por una forma truncada, forma extendida, forma desamidada, forma plegada incorrectamente, una forma con glicosilación no deseada, forma que carece de ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, y mixturas de ellas con tal que las mismas se eluyan antes del péptido, teniendo dichas impurezas afines una carga neta local o global diferente comparadas con dicho péptido por un proceso de cromatografía de intercambio de aniones, comprendiendo el proceso de cromatografía de intercambio de aniones los pasos de:
- 50 a) elución de dichas impurezas peptídicas afines de dicha mixtura en una solución que comprende un modificador orgánico seleccionado de C<sub>1-6</sub>-alcanol, C<sub>1-6</sub>-alquenol o C<sub>1-6</sub>-alquinol, urea, guanidina, guanidina-HCl, ácido C<sub>1-6</sub> alcanoico (con inclusión de ácido acético), C2-6-glicol, o C3-7-polialcohol con inclusión de azúcares, y mixturas de los mismos; agua, opcionalmente un componente salino, y opcionalmente un tampón; en un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente de componente salino, y a valores de pH mantenidos opcionalmente con un tampón en el intervalo en que dicho péptido tiene una carga neta negativa local o global y dichas impurezas peptídicas afines tienen una carga neta negativa local o global que es menor que la carga neta negativa de dicho péptido, para eliminar dichas impurezas peptídicas afines; y
- 55 b) subsiguientemente, elución de dicho péptido por un cambio escalonado o lineal en un disolvente acuoso exento de modificador orgánico, opcionalmente con un componente salino, a valores de pH iguales o menores mantenidos opcionalmente con un tampón.
- 60
- 65

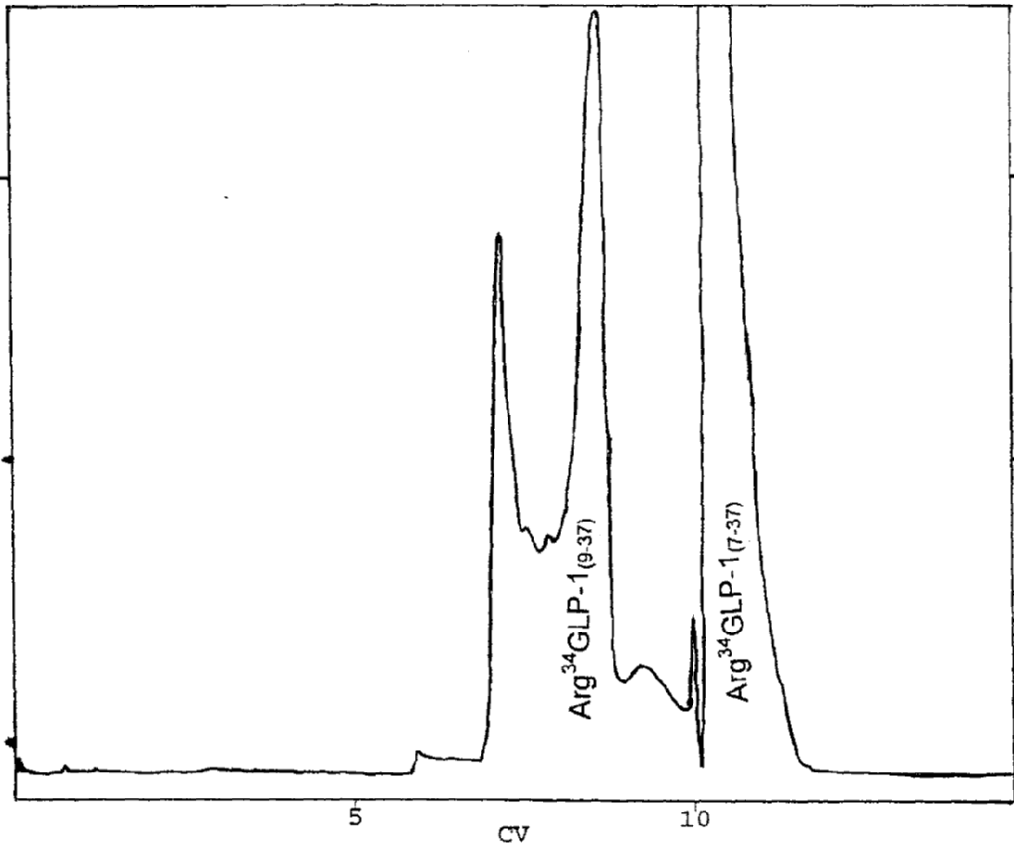
8. Un método conforme a la reivindicación 7, que incluye adicionalmente someter dicho péptido eluido a tests analíticos y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido de manera convencional.

5 9. El proceso o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el cual dicho péptido a purificar se selecciona de polipéptidos, oligopéptidos, proteínas, receptores, virus, así como homólogos, análogos y derivados de los mismos.

10 10. El proceso o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el cual dicho péptido a purificar se selecciona de glucagón, hGH, insulina, Factor VII, Factor VIIa, Factor VIIai, FFR-Factor VIIa, péptido-1 afín a glucagón, péptido-2 afín a glucagón, y análogos así como derivados de los mismos.

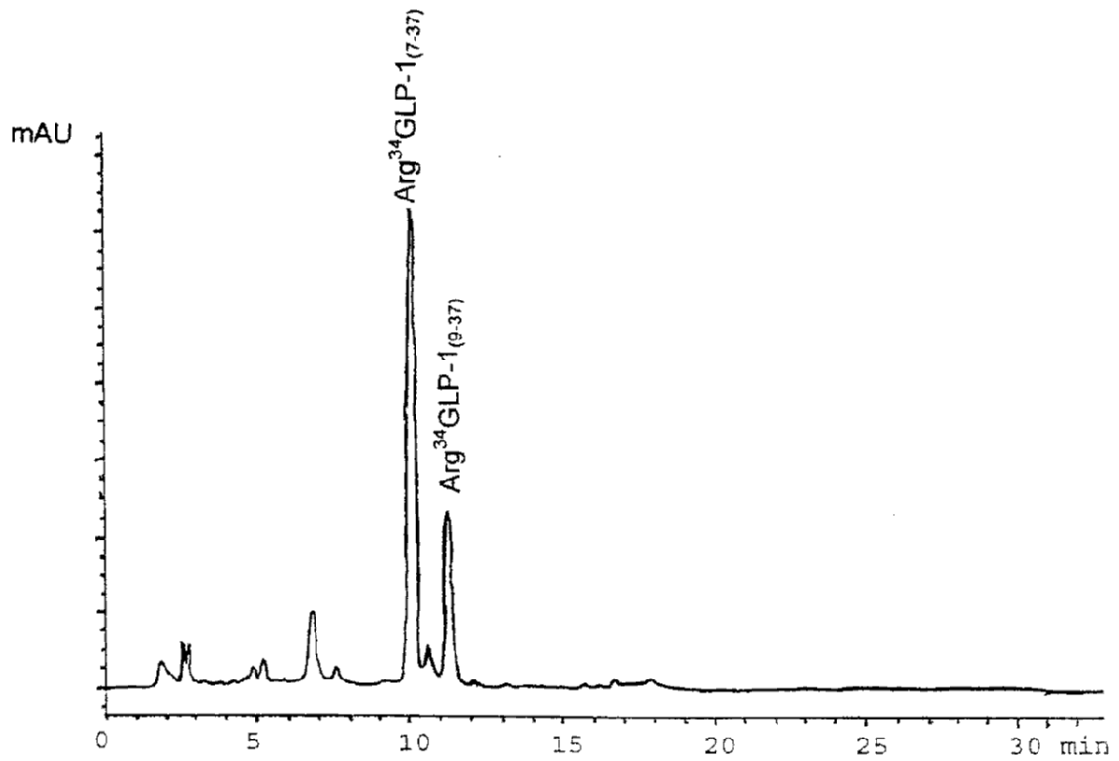
11. El proceso o método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el cual la ratio de modificador orgánico a agua sobre una base de porcentaje en peso es de 1:99 a 99:1.

15 12. El proceso o método conforme a la reivindicación 11, en el cual la ratio de modificador orgánico a agua, sobre una base de porcentaje en peso es de 1:99 a 80:20, tal como 20:80 a 80:20, 30:70 a 70:30, 35:50 a 50:35 ó 40:50 a 50:40.



Cromatograma del ejemplo 1.

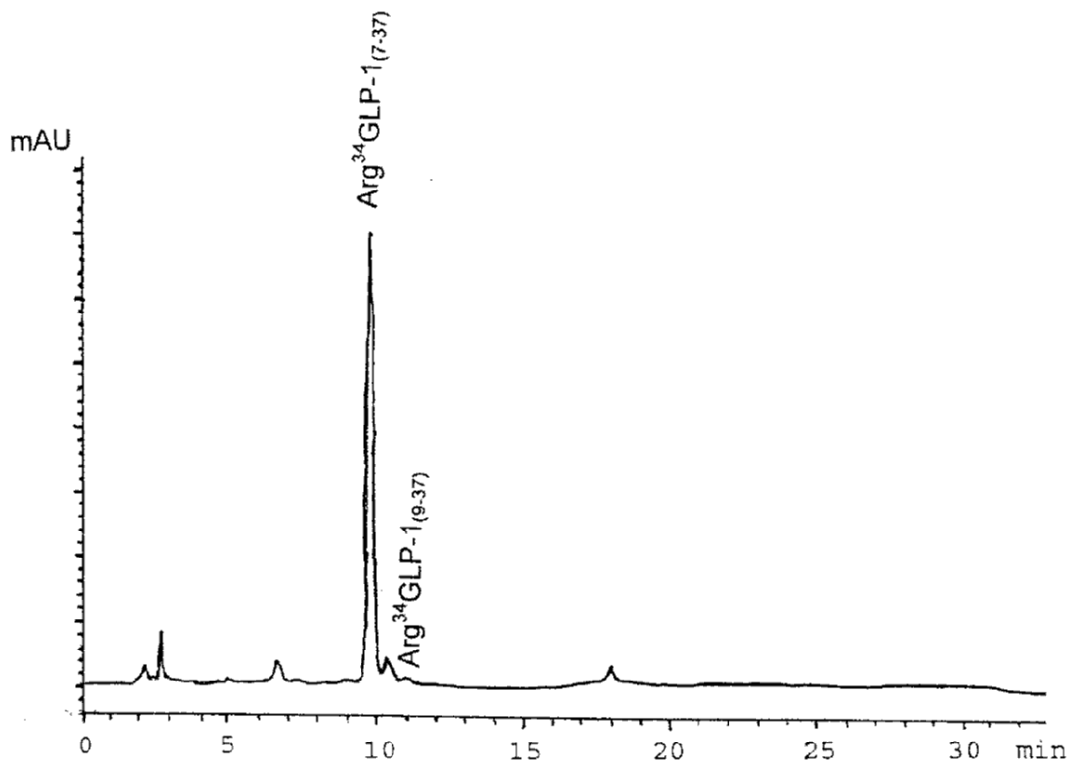
**Fig. 1.**



Cromatograma analítico del ejemplo 1. Muestra para aplicación.

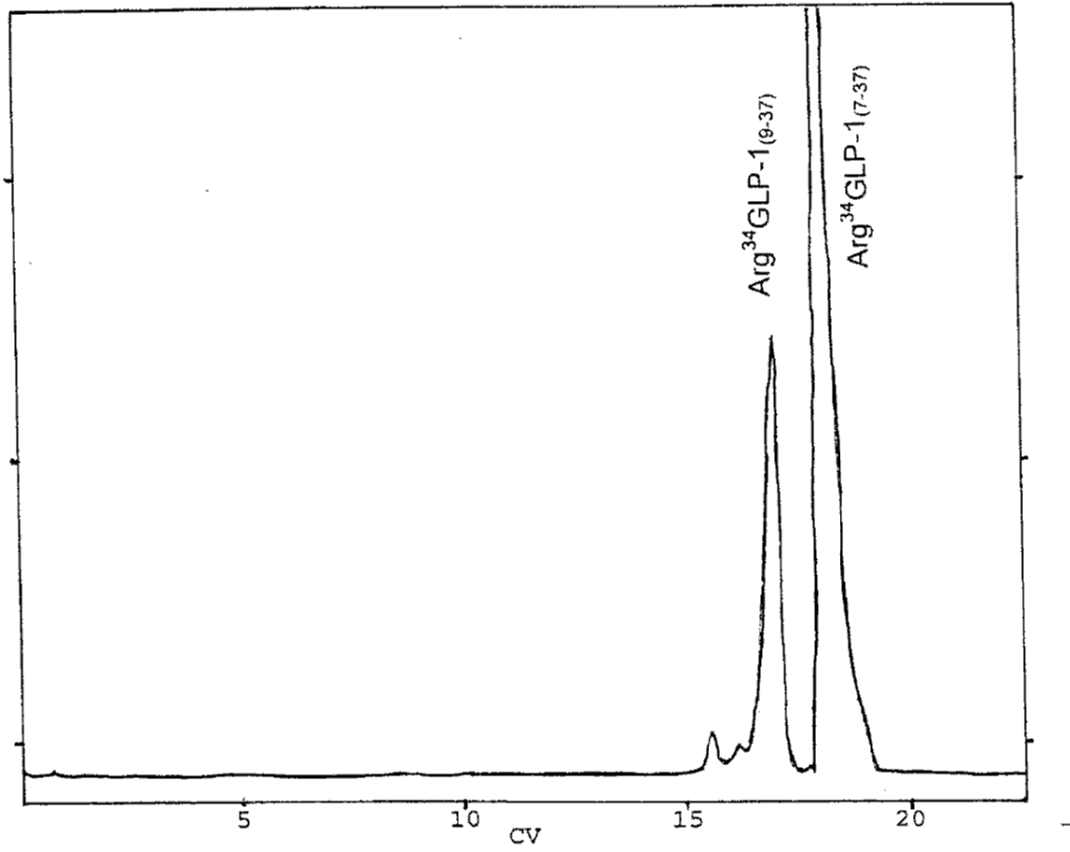
**Fig. 2**





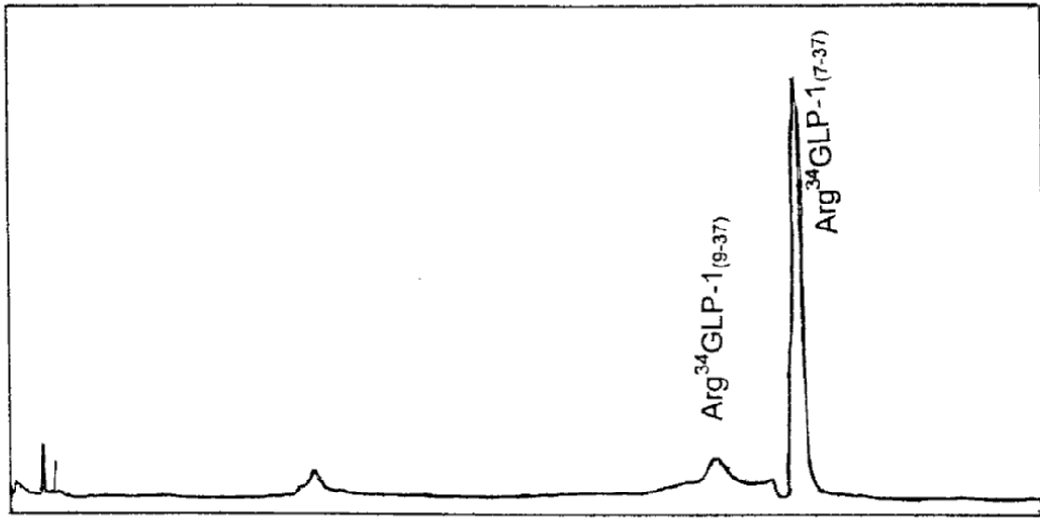
Cromatograma analítico del ejemplo 1. Eluato.

**Fig. 3**



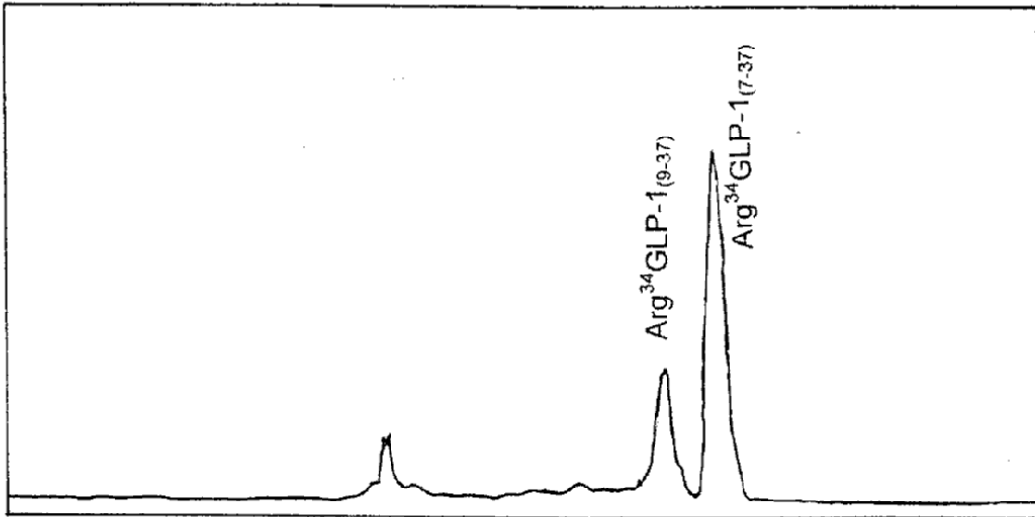
Cromatograma del ejemplo 3.

**Fig. 4**



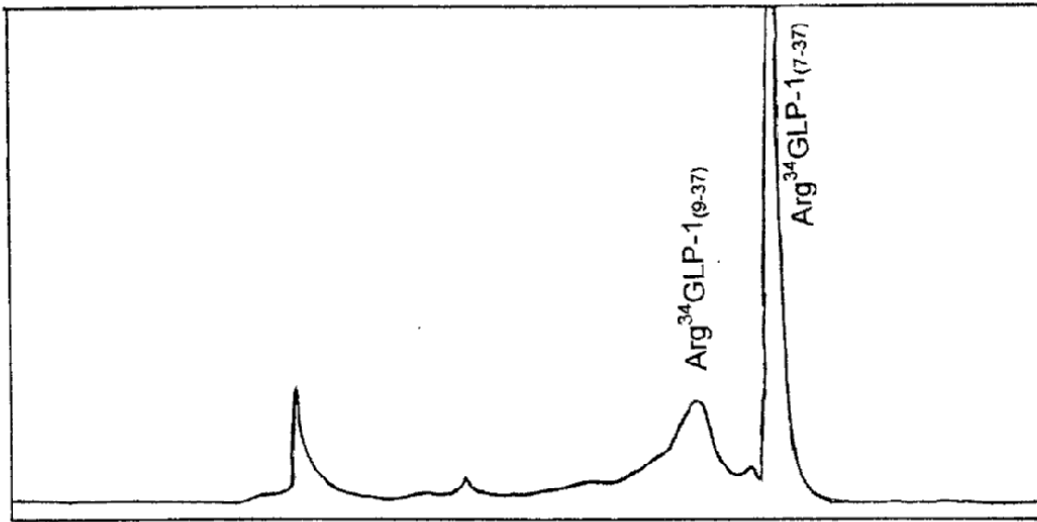
Cromatograma del ejemplo 5.

**Fig. 5**



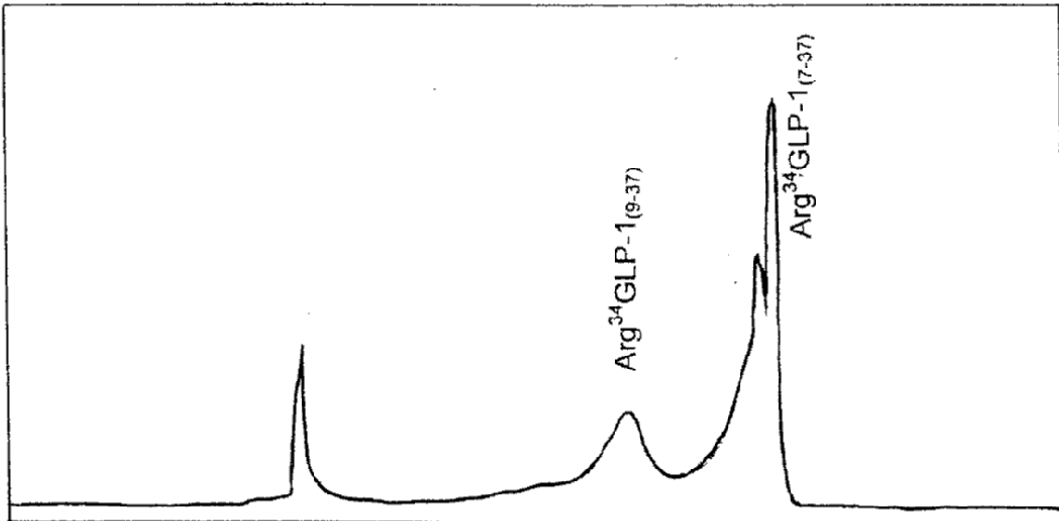
Cromatograma del ejemplo 9.

**Fig. 6**



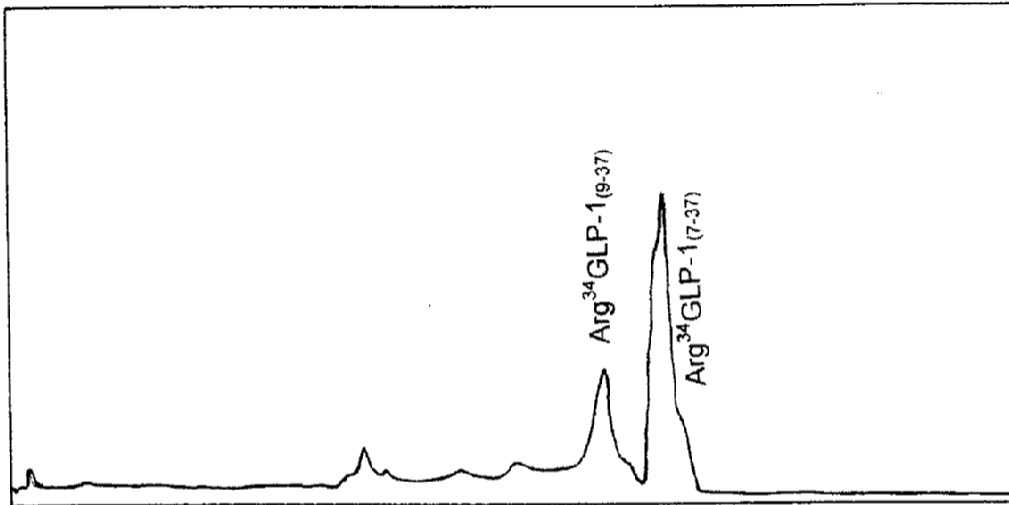
Cromatograma del ejemplo 10.

**Fig. 7**



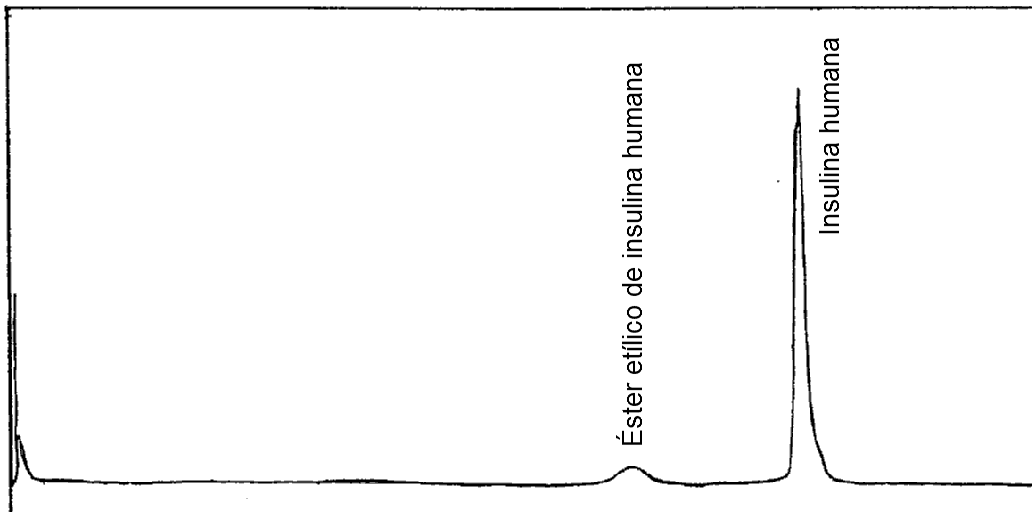
Cromatograma del ejemplo 11.

**Fig. 8**



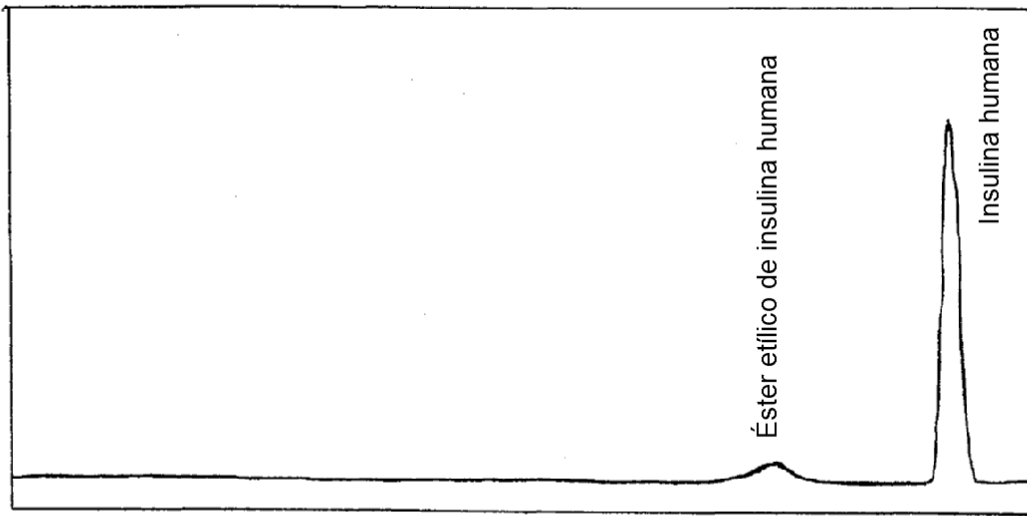
Cromatograma del ejemplo 12.

**Fig. 9**



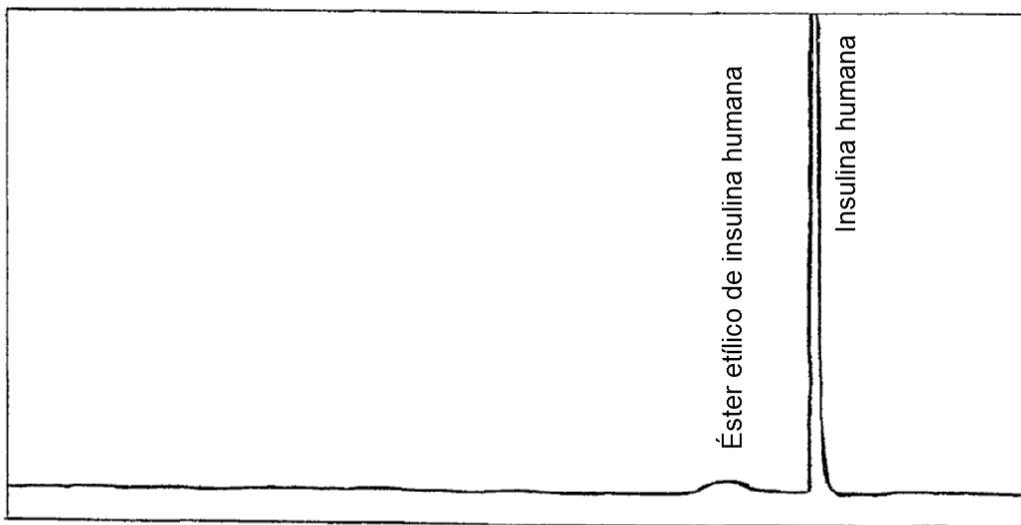
Cromatograma del ejemplo 13

**Fig. 10**



Cromatograma del ejemplo 14.

**Fig. 11**



Cromatograma del ejemplo 16.

**Fig. 12**