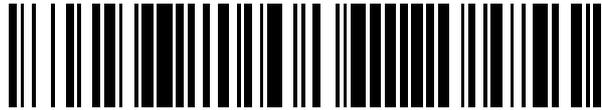


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 727**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/EP2011/054920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11711340 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2552948**

54 Título: **Procedimiento de purificación de un factor proteico de crecimiento G-CSF**

30 Prioridad:

16.04.2010 US 282894 P
30.03.2010 EP 10158522

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2017

73 Titular/es:

OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:

GILLJAM, GUSTAV;
WINGE, STEFAN y
TIEMEYER, MAYA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 596 727 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de un factor proteico de crecimiento G-CSF

La presente invención pertenece a un proceso de la purificación de G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) que emplea la cromatografía.

5 La purificación de proteínas de fuentes de origen natural es un desafío, ya que la proteína de interés a menudo solo está presente en cantidades traza y está acompañada por otros biopolímeros tales como lípidos, proteínas, o incluso fragmentos celulares. Además, las proteínas de interés están asociadas en su mayoría con una función biológica que a menudo se pierde durante las etapas del proceso de su purificación.

10 El arsenal de procedimientos para purificar biopolímeros tales como las proteínas es grande. Además de los procedimientos de precipitación, se conocen procedimientos cromatográficos en varios tipos de materiales. Frecuentemente los materiales se modifican con restos químicos tales como iones orgánicos, cationes tales como aminas protonadas o aminas completamente alquiladas. Tales materiales se utilizan como intercambiadores aniónicos. Pero también se pueden utilizar intercambiadores catiónicos para los procedimientos de purificación que dependen de las propiedades físicas de la proteína de interés tales como la forma, peso molecular y en particular su carga. De manera alternativa o en combinación se emplea la cromatografía por afinidad.

15 Se sabía en la técnica anterior que una desventaja de las resinas de cromatografía de intercambio iónico (como por ejemplo resinas de intercambio iónico de SP-, CM-, Q- o DEAE Sefarosa FF) es que la unión de una proteína a la resina solo se puede llevar a cabo con una concentración de sal relativamente baja (conductividad, osmolalidad, etc.), típicamente una concentración en el intervalo de 0,01-0,15 M de sal (NaCl, etc.). En ciertas aplicaciones existiría la demanda de que fuera capaz de utilizar las condiciones de purificación relativamente suaves que una etapa de cromatografía de intercambio iónico ejerce sobre las proteínas, también directamente (sin diluir) sobre una resina de cromatografía con algo de aumento de fuerza iónica. Un aumento de fuerza iónica puede ser una ventaja significativa para la estabilidad de la proteína en una solución proteica; especialmente en una preparación proteica en bruto como en la recolección de productos proteicos producidos de manera recombinante o en productos derivados del plasma en los que están presentes en la solución proteasas potenciales que pueden afectar negativamente a la proteína diana.

20 Las proteasas a menudo funcionan mejor en condiciones fisiológicas (como es el caso de la mayoría de sistemas celulares), es decir, con un pH de aproximadamente 7 y una concentración salina de aproximadamente 0,15 M. Las proteasas se podrían inhibir cambiando las condiciones de aislamiento por ejemplo añadiendo sal y/o cambiando el pH, sin embargo, ambos parámetros son críticos para llevar a cabo una etapa de cromatografía iónica convencional y por lo tanto a menudo es imposible utilizar en su combinación. Existe la necesidad de proporcionar un procedimiento de purificación en el curso del cual se puedan utilizar condiciones que minimicen los efectos de las proteasas.

25 El documento WO-A2-2008/073620 desvela un procedimiento de fabricación de polipéptidos que se produce en células de insecto utilizando un sistema de expresión baculovírico. En un ejemplo, el cultivo de células de insecto se suplementa con una mezcla lipídica inmediatamente antes de la infección (por ejemplo, una hora antes de la infección). Los polipéptidos se aíslan del cultivo de células de insecto utilizando un procedimiento que emplea precozmente un intercambio aniónico o una cromatografía de modo mixto en el proceso de purificación. Esta etapa del proceso es útil para retirar endoglucanasas y proteasas derivadas de las células de insecto y por lo tanto reduce la pérdida del polipéptido deseado debida a la degradación enzimática. En otro ejemplo, se combina una cromatografía de modo mixto con una cromatografía de afinidad al ligando colorante en una manera de flujo continuo para permitir el rápido procesamiento del cultivo líquido utilizando un proceso que combina la filtración en fibra hueca, cromatografía de modo mixto y de afinidad por ligando colorante en una única unidad de operación que produce una solución de polipéptidos que está esencialmente libre de endoglucanasa y actividades proteolíticas. En un ejemplo adicional, los polipéptidos aislados son glicopéptidos que tienen un patrón de glicosilación específico de insectos, que se conjugan opcionalmente con un grupo modificador, tal como un polímero (por ejemplo, PEG) utilizando un glicosilo transferasa y un azúcar de nucleótido modificado.

30 El documento WO-A2-2009/063069 desvela un proceso para purificar péptidos, en particular pero no exclusivamente, un proceso para retirar endotoxinas de una solución peptídica, un kit que comprende reactivos para dicho proceso y el péptido purificado que se obtiene por dicho proceso.

35 Dasari Venkata Krishna Rao y col. desvela un procedimiento de purificación que emplea una estrategia de control del proceso, desarrollado para mejorar el rendimiento de rhG-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinantes). Se conseguía una pureza de $\geq 99\%$ con un rendimiento total de 2,18 g/l en el presente estudio. El análisis del producto durante la purificación indicaba que los detergentes eliminaban el 72% de los LPS (lipopolisacáridos) y el 98% de las HCP (proteínas celulares del huésped) sin eliminar el ácido nucleico. La concentración de cisteína era un parámetro clave en el re-plegamiento proteico. La altura del lecho y el valor de las HETP (placas de peso teórico equivalente) en la columna de SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) se evaluó y se estudió su impacto sobre la resolución. Se encontró que la formulación durante la SEC era crucial para

aumentar los rendimientos con un ahorro del tiempo y los costes del proceso.

Quan Bai y col. estudia la re-naturalización y purificación del factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos humanos recombinantes (rhGM-CSF) que se expresa en *Escherichia coli*, con cromatografía de intercambio iónico fuerte (SAX). Se investigaron los efectos de los valores del pH, relación de concentraciones de GSH/GSSG, y concentraciones de urea en la fase móvil sobre la re-naturalización y purificación de rhGM-CSF con SAX, respectivamente. Los resultados demostraron que los tres factores anteriores tenían una influencia extraordinaria sobre la eficacia de la re-naturalización y la recuperación de masa de rhGM-CSF. La adición de GSH/GSSG en la fase móvil puede mejorar la formación de enlaces disulfuro correctos en rhGM-CSF de manera que aumenta su rendimiento de re-naturalización. Además, para aumentar la recuperación de masa de rhGM-CSF con SAX, se añadió una concentración baja de urea a la fase móvil para evitar la agregación de proteínas desnaturalizadas. En las condiciones óptimas, el rhGM-CSF se re-naturalizaba simultáneamente con la purificación en la columna de SAX en 30 minutos con solo una etapa.

Shelly A. Pizarro informa acerca de un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF165) que es un potente mitógeno que induce angiogénesis y permeabilidad vascular in vivo y ha demostrado un potencial en aplicaciones terapéuticas acelerando la cicatrización de heridas. El proceso descrito en el presente informe implica un sistema bacteriano de expresión capaz de producir aproximadamente 9 g de rhVEGF por litro de caldo y un proceso de purificación con re-plegamiento proteico corriente abajo y tres etapas cromatográficas antes de la formulación de la sustancia farmacológica. Se utilizó un proceso de fermentación de alimentación discontinua de alta densidad celular (HCD) para producir rhVEGF en cuerpos de inclusión periplásmicos. Los cuerpos de inclusión se recolectaron del lisado celular y se sometieron a una operación de solubilización proteica de una etapa y re-plegamiento para extraer el rhVEGF por purificación. Los rendimientos totales de recuperación que se observaban durante el desarrollo, incluyendo el re-plegamiento y la cromatografía eran de $30 \pm 6\%$. Las impurezas celulares del huésped estaban consistentemente aclaradas bajo los niveles diana y se demostró la robustez del proceso tanto en laboratorio como a gran escala. La estructura del rhVEGF re-plegado y purificado se confirmó por espectrometría de masas, secuenciación del extremo N, y mapeo peptídico triptico mientras que las variantes del producto se analizaron por múltiples ensayos HPLC.

Kimberly A. Kaleas desvelan que las resinas de cromatografía de modo mixto están ganando popularidad como herramientas de purificación por las materias primas desafiantes, y desvela el desarrollo de una aplicación industrial para capturar selectivamente el factor de crecimiento endotelial vascular humano recombinante (rhVEGF) en Capto MMC a partir de una materia prima alcalina. La resina Capto MMC contiene un ligando que tiene el potencial para participar en interacciones iónicas, hidrófobas y de enlaces de hidrógeno con proteínas y se acopla a una matriz de perlas de agarosa altamente reticulada. El VEGF es un factor de crecimiento clave implicado en angiogénesis y tiene aplicaciones terapéuticas en la cicatrización de heridas. Se expresa en *Escherichia coli* como cuerpos de inclusión. Los sólidos se recolectan a partir del lisado celular, y el rhVEGF se solubiliza y se re-plega a un pH de 9,8 en presencia de urea y agentes redox. La característica única de modo mixto de Capto MMC la capacita para la captura de esta proteína básica con mínima carga de condicionamiento y suministra un agrupamiento concentrado para el procesamiento corriente abajo con rendimientos de $> 95\%$ mientras que se recude el contenido proteico de la célula huésped hasta $< 1,2\%$. Este estudio explora el impacto de las condiciones de carga y el tiempo de residencia en la capacidad de unión dinámica así como el desarrollo de las condiciones de elución para llevar a cabo una purificación óptima. Después de evaluar varios tampones de elución, se demostró que la L-arginina HCl era un agente de elución eficaz para la desorción de rhVEGF de la resina de modo mixto Capto MMC ya que destruye satisfactoriamente las múltiples interacciones entre la resina y el rhVEGF. El intento a escala de laboratorio producía una robusta etapa de cromatografía que se implementaba satisfactoriamente a escala de fabricación comercial.

El documento CN-A-101260145 desvela un proceso para el aislamiento y purificación de una proteína de fusión que consiste en seroalbúmina humana y G-CSF. La purificación se consigue por cromatografía de afinidad que emplea Capto MMC.

El documento WO-A1-2009/156430 desvela un proceso de purificación o enriquecimiento de factores de coagulación con una resina cromatográfica que incluye Capto MMC.

Un objetivo de la invención era evitar los inconvenientes en los procesos de purificación de un factor proteico de crecimiento de la técnica anterior proporcionando un nuevo proceso. De acuerdo con la invención, el objetivo se consigue por un proceso de purificación de G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) con una secuencia de purificación empleando una cromatografía en el que

- al menos una cromatografía se lleva a cabo utilizando una resina multimodal que contiene un ligando del ácido 2-(benzoilamino) butanoico cargado negativamente
- el G-CSF se une a la resina multimodal a un pH entre 4 a 6,2, y
- el G-CSF se eluye de la resina multimodal a un pH $> 6,3$ y

en el que la elución se lleva a cabo con un agente de elución que comprende arginina a una concentración en el intervalo de 0,1 M a 2,0 M.

- La invención proporciona un proceso en el que ventajosamente se pueden minimizar los efectos de las proteasas, haciendo posible añadir una sal y/o cambiar el pH en la muestra de proteína en bruto con proteasas potencialmente presentes que podrían degradar la proteína diana y procesar la solución proteica sin que se midieron adicionales y unir la proteína diana a una resina de cromatografía de modo mixto y proporcionar de esta manera una etapa optimizada para la concentración y purificación de la proteína diana en una muestra bruta, haciéndola adecuada para una purificación corriente abajo adicional utilizando una etapa de cromatografía por afinidad dirigida a la proteína diana, con reducción de proteasas y/o contenido en ADN durante el procesamiento corriente abajo. Tiene una importancia específica, para evitar la degradación de la proteína diana durante la purificación, hacer que la combinación de cromatografía multimodal sea una etapa de captura en una solución proteica bruta.
- En una realización, la cromatografía en resinas multimodales se combina con una etapa de cromatografía de afinidad con un ligando derivado de levaduras. La etapa cromatográfica emplea un fragmento Fab derivado de levaduras contra el G-CSF, que es especialmente adecuado para la purificación de la proteína diana con un alto rendimiento y una integridad molecular sin cambios (degradación, etc.).
- El G-CSF es un miembro de las glucoproteínas hematopoyéticas reguladoras que están implicadas en el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas a partir de las células madre.
- En una realización adicional de la invención la etapa de la resina multimodal se procesa para capturar el G-CSF a partir de una solución proteica bruta en cuyo eluido resultante de la cromatografía de resina multimodal se somete a una etapa de cromatografía por afinidad de ligando de un fragmento Fab derivado de levaduras dirigido contra el G-CSF. Tras la elución del G-CSF de dicha etapa de cromatografía por afinidad, se consigue una pureza de más de aproximadamente un 90% en relación con las proteínas y ADN. En otra realización adicional de la invención la etapa de resina multimodal y la etapa de cromatografía por afinidad de ligando de un fragmento Fab dirigido contra G-CSF se combinan con otra etapa(s) de purificación cromatográfica para dar un rendimiento de pureza de más del 99% en el producto de G-CSF final.
- En otra realización de la invención el G-CSF es un G-CSF recombinante. En otra realización más de la invención el G-CSF está en una solución proteica bruta que potencialmente incluye proteasas que pueden degradar el producto.
- En la invención el G-CSF se eluye por un cambio de pH a pH > 6,3.
- El cambio de pH se lleva a cabo ajustando el pH del tampón de elución con por ejemplo hidróxido sódico o ácido acético al pH deseado y aplicando el tampón a la resina multimodal y se puede llevar a cabo el ajuste de fuerza iónica añadiendo una sal en la composición del tampón de elución, antes de aplicarlo a la resina multimodal, por ejemplo las sales incluidas en la serie de Hofmeister, por ejemplo, cloruro sódico y cloruro potásico.
- De acuerdo con la invención, la concentración de arginina en el agente de elución está en el intervalo de desde 0,1 M a 2 M.
- De acuerdo con otra realización de la invención el G-CSF se une a la resina multimodal a un pH de aproximadamente 6,0 mientras que se eluye el G-CSF de la resina multimodal a un pH de 6,5 o mayor en particular a aproximadamente 7,0.
- En una realización adicional de la invención se utiliza una sustancia tampón que comprende preferentemente al menos una de las sustancias que se selecciona de entre el grupo que consiste en citrato sódico, histidina, ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperacil)-etano sulfónico (HEPES), ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico (MES), base Tris y acetato sódico en particular en un intervalo de pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 8.
- En el proceso de la invención puede estar presente un detergente no iónico en cualquiera de los tampones que se utilizan, dicho detergente no iónico se selecciona en particular de entre el grupo que consiste en Polisorbatos tales como el Polisorbato 20, 40, 60, 80 y Pluronic F68.
- En otra realización de la invención se lleva a cabo una etapa de lavado a un pH en el intervalo de aproximadamente un pH 4 a aproximadamente pH 6, antes de eluir el G-CSF de la resina multimodal, que se caracteriza porque el tampón de lavado incluye agentes de lavado que comprenden un aminoácido que tiene una cadena lateral básica y/o una sal que se escoge de acuerdo con la serie de Hofmeister, por ejemplo, cloruro sódico y cloruro potásico. Se desvela que los agentes de lavado pueden presentar una fuerza iónica alta, el ajuste de la fuerza iónica se puede llevar a cabo añadiendo una sal, en la composición de tampón de lavado antes de aplicarla a la resina multimodal.
- De acuerdo con una realización de la invención la concentración del agente de lavado está en el intervalo de desde 0,1 M a 2 M.
- En una realización adicional, puede ser ventajoso aplicar el tampón de lavado a la resina multimodal, para eliminar contaminantes (proteasas, ADN, etc.) y retener el G-CSF, antes de que se libere el G-CSF.
- Particularmente, la concentración del aminoácido que está cargado positivamente a un pH 6-8 está presente en una concentración de hasta 2 M en el tampón de lavado a un pH < 6,3. Típicamente, la cantidad de arginina está en el

intervalo de 0,1-1,0 M, en particular 0,5 M, en el tampón de lavado.

En el tampón de elución con un pH > 6,3 la cantidad de arginina está típicamente en el intervalo de 0,1 a 2 M, en particular 0,5 M.

5 En el tampón de elución con un pH ≥ 6,3, se incluye cloruro sódico en un intervalo de 0,1-2,0 M, en particular en un intervalo de 0,1 a 1 M.

En el tampón de lavado con un pH < 6,3, se incluye cloruro sódico en un intervalo de 0,1-2,0 M, en particular en un intervalo de 0,1 a 1 M.

La cantidad de detergente no iónico está típicamente en el intervalo de 0,001 al 1%, en particular en los tampones para la cromatografía multimodal es del 0,02%.

10 La resina de cromatografía multimodal que se puede emplear de acuerdo con la divulgación puede contener al menos uno de los siguientes restos:

- a. un ligando N-Bencil-N-metil etanolamina cargado positivamente,
- b. un ligando fenilpropilo,
- c. un ligando N-hexilo,
- 15 d. un ligando 4-mercapto-etil-piridina,
- e. un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)-amino)-fenil)-benzoico o combinaciones de los mismos.

20 En particular, una resina multimodal de cromatografía para su uso de acuerdo con la presente divulgación se selecciona de entre las siguientes resinas disponibles en el mercado HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; MEP Hypercel™.

25 En otra realización de la presente invención la secuencia de purificación puede comprender adicionalmente las etapas de eliminación/inactivación de agentes patógenos que comprenden una etapa de inactivación de base química, una etapa de eliminación basada en el tamaño, etapas de cromatografía o combinaciones de las mismas cuyas etapas están basadas en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al agente patógeno que se va a eliminar.

En una realización particular del proceso de la invención, la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:

- 1. una resina multimodal que contiene un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico tal como Capto MMC;
- 2. una etapa de inactivación de base química para los virus encapsulados
- 30 3. una resina de afinidad basada en un ligando expresado por una levadura;
- 4. un intercambiador de cationes tales como SP Sefarosa o Resource S;
- 5. una etapa de eliminación de agente patógeno por filtración con un tamaño medio de poro de aproximadamente 20 nm tal como Planova 20N;
- 35 6. un intercambio de tampón y/o etapa de concentración tal como ultrafiltración con un corte aproximado de 1-5 kDa;
- 7. una resina de cromatografía de exclusión por tamaño tal como Superdex 75.

Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico.

La Figura 2 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico.

La Figura 3 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico.

45 La Figura 4 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 4,0 del material de partida utilizando un tampón de acetato sódico.

La Figura 5 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 4,0 utilizando un tampón de citrato sódico.

La Figura 6 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 5,0 utilizando un tampón de citrato sódico.

50 La Figura 7 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 5,5 utilizando un tampón de citrato sódico.

La Figura 8 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 6,0 utilizando un tampón de citrato sódico.

55 La Figura 9 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna de Capto MMC a un pH de 6,5 utilizando un tampón de citrato sódico.

Las Figuras 10A y 10B muestran una SDS-PAGE teñida con plata y la separación de las proteínas de partida y

del eluido a partir de Capto MMC.

La Figura 11 muestra un cromatograma de la purificación de G-CSF a partir de un sobrenadante libre de células.

La Figura 12 muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra el eluido tras la etapa de cromatografía por afinidad.

- 5 La Figura 13 muestra una SDS-PAGE teñida con plata que muestra el material de partida, el flujo continuo y los eluidos tras la etapa de cromatografía por afinidad.

La invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes que se han ejemplificado para la purificación de G-CSF.

Ejemplos

10 Descripción de los procedimientos analíticos

Determinación del contenido en G-CSF por ELISA específico de G-CSF

- El principio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es la cuantificación de una proteína (antígeno) por su unión específica a anticuerpos contra dicha proteína. La cuantificación de G-CSF se llevó a cabo utilizando un ELISA sándwich, basándose en el ELISA G-CSF Duo Set (R&D Systems, N° de cat. DY214). Se aplicó como referencia de calibración un G-CSF humano recombinante derivado de *E. coli* (R&D Systems, N° de cat. 214-CS-005, 0,015 - 1 ng/ml). El anticuerpo de captura (anti- G-CSF humano de ratón) se unió a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Tras la captura del antígeno G-CSF y una etapa de lavado, se unió el anticuerpo de detección biotinilado (anti-G-CSF humano de cabra) al antígeno G-CSF. Tras una segunda etapa de lavado, se aplicó una peroxidasa de rábano rusticano conjugada con estreptavidina (estreptavidina-HRP), que se unió al anticuerpo de detección biotinilado. Para la cuantificación, se añadió el sustrato Tetrametilbencidina (TMB) de la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno y se desarrolló un color azul. Tras parar la reacción con ácido sulfúrico, se desarrolló establemente un color amarillo. La concentración del colorante se midió fotométricamente a 450 nm. La concentración de G-CSF en las muestras desconocidas se calculó a partir de la curva de referencia de G-CSF humano recombinante, que siempre daba un coeficiente de correlación lineal (r) > 0,99.

25 Determinación del contenido en G-CSF por (RP) HPLC de fase inversa

- La RP-HPLC implica la separación de las proteínas basándose en su polaridad; la retención de las moléculas proteicas se gobierna por las interacciones hidrófobas entre el resto no polar de las moléculas de soluto y la fase estacionaria no polar de la columna de HPLC. Se utilizó un sistema HPLC (Dionex Ultimate 3000), equipado con un detector UV y una columna Jupiter C18, 300A, 5 mm, 4,6 x 150 mm (Phenomenex, Cat. n° 00F-4053-EO) para la determinación proteica. La columna, que funcionaba a 20 ± 5 °C, se equilibró con un 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en agua (fase móvil A). Para la elución, se utilizó un 0,1% (v/v) de TFA en acetonitrilo (fase móvil B) se utilizó en el gradiente lineal (0-5 min 5% B, 5-12 min 55% B, 12-17 min 100% B, 17-22 min 5% B) con un caudal de 1,0 ml/min. La carga de muestra era de 30 mg por inyección con un volumen de inyección total de un máximo de 100 µl. La detección se llevó a cabo midiendo la absorbancia de UV a 214 nm. Se utilizó el Filgrastim CRS de Ph. Eur. 2,5-40 mg (2,5-5-10-20-40 mg) para la curva de referencia. El Filgrastim CRS de referencia se pre-diluyó en agua para uso de laboratorio (WFL) a una concentración de 0,4 mg/ml. Se llevó a cabo una pre-dilución de las muestras en WFL para una cantidad de inyección de 30 µg, si era necesario. El contenido en G-CSF de las muestras desconocidas se calculó a partir de la curva de referencia de Filgrastim CRS, que siempre daba un coeficiente de correlación lineal (r) > 0,99.

40 Determinación de la pureza por (RP) HPLC de fase inversa

El procedimiento y dispositivos que se utilizan para la determinación de la pureza por RP-HPLC son equivalentes al procedimiento para la determinación del contenido en G-CSF. La pureza de la solución que contiene G-CSF [%] se calculó fijando el área del pico del pico de G-CSF en relación con el área del pico total.

Determinación de la pureza y distribución de peso molecular por SDS-PAGE

- 45 La electroforesis en SDS poliacrilamida (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas basándose en su tamaño. Se llevó a cabo la determinación de la pureza y el análisis de distribución del peso molecular para las muestras que contenían G-CSF en condiciones reducidas. Con este fin, se utilizaron gradientes de gel de Tris-Tricina (10-20%, de Anamed, N° de cat. TR12012) y gradientes de gel de Tris-HCl (10-20%, de Biorad, N° de cat. 345-0043). Para los gradientes de gel de Tris-Tricina se utilizó el polipéptido con un peso molecular de referencia para SDS-PAGE de BioRad (N° de cat. 161-0326; 1,4 – 26,6 kDa) como referencia de peso molecular; para los gradientes de gel de Tris-HCl se aplicó la referencia Precision Plus Protein All Blue de Biorad (N° de cat. 161-0373, 10-250 kDa). Las bandas de proteína que se separaban por la electroforesis se visualizaron por tinción con plata y Coomassie. Se utilizó un G-CSF humano recombinante derivado de *E. coli* (no glicosilado, R&D systems, N° de cat. 214-CS-005) y el producto comercial Granocyte (Chugai) derivado de CHO como referencias de G-CSF (muestras de control). La evaluación del peso molecular y pureza se hizo visualmente juzgando las apariencias de las referencias, la referencia (muestra de control) y las muestras analizadas.

G-CSF recombinante

Producción de una suspensión celular que contiene G-CSF y purificación

Células

5 La línea celular que se utilizó se derivaba de células renales embrionarias 293 humanas (HEK293), que se habían adaptado al cultivo libre de suero. Este huésped, HEK 293, se transfectó establemente con un casete de expresión que tenía el ADNc que codificaba la secuencia de G-CSF. Se utilizó el promotor fuerte para el casete. El proceso general se describe también en el documento EP 1739179 (Schröder y col).

Procedimiento de cultivo

10 Las células se cultivaron en medio libre de suero con un equipamiento general y de acuerdo con los procedimientos generales bien conocidos en la técnica, por ejemplo de cultivos removidos o agitados en matraces t, matraces agitadores y biorreactores (sistemas desechables y depósitos de removido convencionales) que se ejecutaron como cultivos por lotes, semicontinuos, perfusión o continuos quimioestáticos (Freshney, R I (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4ª ed, Wiley- Liss; Spier, R E ed (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, New York; Enfors, S-O and Häggström, L (2000), Bioprocess technology: fundamentals and applications, Högskoletyckeriet, Royal Institute of Technology, Stockholm; Vinci, V A and Parekh, S R (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, USA). Típicamente, se utilizó la perfusión del medio para aumentar el número de células y los títulos de producto más allá de los niveles de cultivo por lotes convencional. El rendimiento del producto y la cantidad de proteínas de las células huésped diferían dependiendo del modo de cultivo:

- 20 • el título de producto típicamente aumentará con el número de células
- el contenido en proteínas totales y el contenido en ADN aumentará típicamente con el número de células
- el contenido en proteínas totales y el contenido en ADN puede aumentar también con la longevidad del cultivo
- los cultivos por lotes acumulan proteínas y ADN; no se añade nada externamente, nada se retira
- 25 • los procesos de perfusión aclaran los cultivos celulares de metabolitos, proteínas, ADN y otras impurezas; se utilizan típicamente filtros o centrifugas celulares para la retención de células.

El producto recombinante se libera de las células, y se recolecta la suspensión celular o el sobrenadante de la suspensión celular. Las propiedades de la recolección (títulos de producto e impurezas que se han mencionado anteriormente) difieren dependiendo del modo de cultivo que se utilice.

La suspensión celular se ha utilizado en algunos de los ejemplos de G-CSF descritos posteriormente.

30 Procedimiento de purificación

El producto recombinante se liberaba de las células y se recolectaba la suspensión celular o el sobrenadante de la suspensión. La purificación que se aplicó comprendía una purificación en 4 etapas. Se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico (SP Sefarosa de Flujo rápido (FF)) para la etapa de captura de G-CSF del sobrenadante del cultivo celular, seguida por una etapa de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado basada en zinc (IMAC) (Sefarosa de Flujo rápido (FF) quelante de Zn-IDA), una segunda cromatografía de intercambio catiónico (Resource S) para pulir y una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75) como etapa final.

Preparación del sobrenadante del cultivo celular que contiene G-CSF

40 Antes de la etapa de captura se determinó la concentración de G-CSF de los lotes de sobrenadante [mg/l] por un ELISA específico de G-CSF con el fin de verificar la cantidad total de G-CSF [mg]. Se descongeló el sobrenadante congelado (a -80 °C) en un baño de agua ajustado a 20 ± 5 °C. A continuación el sobrenadante se centrifugó a 9000 x g durante 15 minutos a 4 °C y luego se filtró además utilizando unidades de filtro de 0,2 µg. El pH del sobrenadante filtrado se ajustó a un pH 4,0 utilizando ácido acético.

Etapas de captura (SP Sefarosa FF)

45 Se empaquetó una columna XK 16/20 con 10 ml de material de SP Sefarosa FF (1 volumen de columna (VC) = 10 ml). La resina de SP Sefarosa FF se obtuvo en GE Healthcare (Nº de cat. 17-0729-01).

El equilibrado se llevó a cabo con 3 VC del tampón de equilibrado (20 mM de acetato sódico, 100 mM de cloruro sódico, un 0,02% Tween 20, pH 4,0) seguido por la carga del material de partida con un caudal de 2,5 ml/min. Se llevó a cabo a continuación la etapa de lavado con el mismo tampón y caudal, utilizando 5 VC.

50 Se llevó a cabo la elución con un tampón de elución que contenía 20 mM de acetato sódico, 1 M de cloruro sódico, un 0,02% de Tween 20, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal desde un 0% a un 40% de tampón de elución con 8 VC con un caudal de 2,5 ml/min, seguido por una etapa de elución con un 100% de tampón de elución con 5 VC.

La concentración del agrupamiento eluido, que se recolectó del gradiente de elución lineal, se analizó por ELISA específico de G-CSF.

Etapas IMAC (Sefarosa FF quelante Zn-IDA)

5 Se empaquetó una columna XK 16/20 con 10 ml de Sefarosa FF quelante que se cargó con 2 ml de $ZnCl_2$ 0,2 M (1 volumen de columna (VC) = 10 ml). La resina Sefarosa FF quelante se obtuvo en GE Healthcare (Cat. N° 17-0575-01). Antes de la carga se ajustó el pH de la carga de la columna IMAC (eluido SP Sefarosa FF) a un pH 8,0 con NaOH.

10 Se llevó a cabo el equilibrado con 3 VC de tampón de equilibrado (20 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl, pH 8,0) seguida por la carga del eluido de la SP Sefarosa FF con un caudal de 2 ml/min. Se llevó a cabo la siguiente etapa de lavado con el mismo tampón y caudal, utilizando 2 VC.

La elución se llevó a cabo con un tampón de elución que contenía 20 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal de un 0% a un 100% de tampón de elución con 3 VC con un caudal de 1 ml/min. Después se aplicó un retraso de gradiente con tampón de elución al 100% con 4 VC.

15 La concentración de G-CSF en el agrupamiento de eluido, que se recolectó de la elución con un tampón de elución al 100%, se analizó por un ELISA específico de G-CSF.

Etapas de pulido (Resource S)

20 Se equilibró una columna Resource S pre-empaquetada (VC = 6 ml) de GE Healthcare (N° de cat. 17-1180-01) con 5 VC de tampón de equilibrado (20 mM de acetato sódico, un 0,02% de Tween-20, pH 4,0) con un caudal de 4 ml/min. Antes de la purificación, el pH del eluido IMAC se debe ajustar a 4,0 con ácido acético y se diluye 5 veces utilizando el tampón de equilibrado.

La etapa de lavado se llevó a cabo con 10 VC del tampón de equilibrado con un caudal de 4 ml/min.

La elución se llevó a cabo con un tampón de elución que contenía 20 mM de acetato sódico, 1 M de NaCl, un 0,02% de Tween-20, pH 4,0, aplicando un gradiente lineal de tampón de elución del 0% al 100% con 20 VC con un caudal de 2 ml/min.

25 La concentración de G-CSF en el agrupamiento de eluido, que se recolectaba del gradiente de elución lineal con un 50-85% de tampón de elución, se analizó con un ELISA específico de G-CSF.

Etapas de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75)

30 Para la etapa de exclusión por tamaño se utilizó una columna Hiloal 26/60 Superdex 75 Prep Grade pre-empaquetada (GE Healthcare N° de cat. 17-1044-01, VC = 320 ml). La columna se equilibró con 1 VC de tampón (20 mM de acetato sódico, 200 mM de NaCl, un 0,02% de Tween-20, pH 6,5) seguido por la carga del eluido de Resource S con un caudal de 2,5 ml/min y un volumen máximo de carga de un 4% del VC.

La concentración de G-CSF del agrupamiento del eluido se analizó por ELISA específico de G-CSF y por (RP)-HPLC de fase inversa. La pureza de la fracción de purificación final se analizó utilizando RP-HPLC, (SE)-HPLC y SDS-PAGE y era típicamente > 95%.

35 El eluido de la exclusión por tamaño se utilizó en alguno de los ejemplos de G-CSF que se describen posteriormente.

Purificación de rhG-CSP utilizando resina Capto MMC como etapa de captura.

Ejemplo 1 (Experimento 1)

Material de partida

40 Se diluyó el rhG-CSP en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración total de proteína y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. El rhG-CSP estaba disuelto antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,5 M de NaCl, un 0,02% de Tween-20, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

45 Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n° de cat. 17-5317) como etapa de captura para la molécula de rhG-CSP. La Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (VC) de Capto MMC era de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, 0,5 M de monoclorhidrato de arginina, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

5 Sistema experimental

Se equilibró la columna con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. Como se aprecia en la Tabla 1 no se encontró G-CSF en la fracción del flujo continuo. El tampón de elución contenía 0,5 M de monoclorhidrato de arginina, y el pH se modificó a 7,0. La recuperación de G-CSF era del 89%, y el perfil de elución era un pico más concentrado. La columna se limpió tras la elución en el mismo lugar con una solución de NaOH 1 M. Se visualizó un pico muy pequeño del lavado con NaOH 1 M de la columna. El cromatograma se muestra en la Figura 1.

Tabla 1.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	% Rendimiento
Material de partida	8,71	111	966,8	100
Flujo continuo y lavado equil.	18	0	0	0
Eluído	12	72	864	89

15

Conclusión

Todo el G-CSF cargado se unía a Capto MMC a pH 4,0. Se obtuvo un alto rendimiento (del 89%) en la fracción de elución que se recolectó en tres volúmenes de columna. El tampón de elución tenía un pH de 7,0, y estaba incluido 0,5 M de monoclorhidrato de arginina.

20 Leyenda de la Figura 1.

Experimento 1; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH de 7,0 que contenía 0,5 M de monoclorhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico de la elución. El doble pico se recolectó como una fracción.

25 Ejemplo 2 (Experimento 2)**Material de partida**

Se diluyó el rhG-CSF purificado en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. El rhG-CSF se disolvió antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,5 M de NaCl, un 0,02% de Tween 20, pH 4,0.

30 Resina y columna cromatográficas

Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. La capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de la columna (VC) de Capto MMC era de 3 ml.

35 Tampones

Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Sistema experimental

40 Se equilibró la columna con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. Como se aprecia en la Tabla 2 no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución tenía un pH de 7,0. Se encontró más del 90% del rhG-CSF cargado en la columna Capto MMC en la fracción eluída. El pico de elución era más amplio que en el experimento 1, en el que se incluía arginina en el tampón de elución. Se dobló el

volumen de elución.

Tabla 2.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	% Rendimiento
Material de partida	8,92	77,47	691	100
Flujo continuo y lavado equil.	30	0	0	0
Eluído	24	26,07	626	90,5

Conclusión

- 5 El G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) se une a la resina Capto MMC a pH 4 y se podía eluir a pH 7 en una solución tampón con citrato sódico.

Ejemplo 3 (Experimento 3)

Material de partida

- 10 Se diluyó el rhG-CSF purificado en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración total de proteína y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. El rhG-CSF se diluyó antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,5 M de NaCl, un 0,02% de Tween 20, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

- 15 Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces de hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (VC) de Capto MMC era de 3 ml.

Tampones

Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato de sodio, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0
Tampón de elución: 20 mM de HEPES, 0,3 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

20 Sistema experimental

- La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. Como se aprecia en la tabla 3 no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución tenía un pH de 7,0, y la concentración de NaCl se elevó a 0,3 M en comparación con el experimento 2. Todo el rhG-CSF cargado en la columna de Capto MMC se encontraba en la fracción eluída. El perfil de cromatografía se muestra en la Figura 2. Se obtuvo un amplio pico de elución, y el pico de elución completo se recolectó en una fracción de elución.

Tabla 3.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	% Rendimiento
Material de partida	8,8	71,2	627	100
Flujo continuo y lavado equil.	30	0	0	0
Eluído	24	27,1	650	103,7

30 Conclusión

El rhG-CSF se unía a la resina Capto MMC a pH 7 y se eluyó al 100% a pH 7 cuando se incluía el NaCl 0,3 M en el tampón de elución. El volumen de elución era grande, el doble de volumen comparado con el que incluía arginina en el tampón de elución. Esto significa que el NaCl 0,3 M no tenía el mismo efecto sobre la elución de G-CSF en una resina Capto MMC como la arginina 0,5 M.

35 Leyenda de la Figura 2.

Experimento 3; Un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que

se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía NaCl 0,3 M. Se obtuvo un doble pico por la elución. El doble pico amplio se recolectó como una fracción.

Ejemplo 4 (Experimento 4)

Material de partida

- 5 El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. El rhG-CSF se disolvió antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,5 M de NaCl, un 0,02% de Tween 20, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

- 10 Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces de hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (VC) era de 3 ml.

Tampones

- 15 Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0
Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M monoclóhidrato de arginina, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Sistema experimental

- 20 Se equilibró la columna con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. Como se aprecia en la Tabla 4 no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución se cambió por un tampón que contenía arginina y no cloruro sódico, y el pH era de 4,0. No se encontró rhG-CSF en la fracción eluída.

Tabla 4.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	% Rendimiento
Material de partida	9	69,4	625	100
Flujo continuo y lavado equil.	27	0	0	0
Eluído	27	0	0	0

25 Conclusión

El rhG-CSF no podía eluirse de la resina Capto MMC añadiendo solo 0,5 M de monoclóhidrato de arginina al tampón, sin cambiar el pH. Esto puede funcionar como una etapa de lavado.

Ejemplo 5 (Experimento 5)

Material de partida

- 30 El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. El rhG-CSF se disolvió antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,5 M de NaCl, un 0,02% de Tween 20, pH 4,0.

Resina y columna cromatográficas

- 35 Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces de hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (VC) de Capto MMC era de 3 ml.

Tampones

- 40 Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0
Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, 1 M de monoclóhidrato de arginina, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0.

Sistema experimental

Se equilibró la columna con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. El análisis demostraba que el rhG-CSF se unía a la resina Capto MMC con estas condiciones de tampón. Como se aprecia en la Tabla 5 no se encontró rhG-CSF en el flujo continuo. El tampón de elución se cambió por un tampón que contenía arginina y no cloruro sódico, y el pH era de 4,0, el mismo que en el tampón de equilibrado. No se encontró rhG-CSF en la fracción eluída. Esto significa que una concentración de arginina más alta (1 M) no tenía ningún efecto sobre la elución de rhG-CSF de la columna de Capto MMC. Pero como se aprecia en la Figura 3 se obtuvo un pico cuando se eluyó la columna por el tampón de elución que contenía 1 M de arginina y pH 4. El segundo gran pico era resultado del lavado con NaOH 1 M.

Tabla 5.

Muestra	Volumen ml	rhG-CSF µg/ml	Total rhG-CSF µg	% Rendimiento
Material de partida	9,04	79,98	723	100
Flujo continuo y lavado equil.	18	0	0	0
Eluído	9	0	0	0

Conclusión

El rhG-CSF no se podía eluir de la resina Capto MMC añadiendo solo 1 M de monoclóhidrato de arginina al tampón, sin cambiar el pH. Esto puede funcionar como una etapa de lavado.

Leyenda de la Figura 3.

Experimento 5; Un cromatograma de la purificación de G-CSF en una columna Capto MMC a pH 4,0 utilizando un tampón de acetato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con pH 4,0 que contenía 1 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico de la elución. Un único pico se obtuvo de la fracción eluída. Un gran pico se obtuvo con el lavado con NaOH 1 M.

Ejemplo 6 (Experimentos 6, 7, 8, 9, 10, 11)

Material de partida

El rhG-CSF purificado se diluyó en un tampón de equilibrado para disminuir la concentración de proteína total y para conseguir un volumen más conveniente antes de cargarse en una columna Capto MMC. Y también para conseguir el pH que se necesitaba para cada experimento. El rhG-CSF se disolvió antes de la dilución en 20 mM de acetato sódico, 0,2 M de NaCl, un 0,02% de Tween 20, pH 6,5.

Resina y columna cromatográficas

Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces de hidrógeno. Se empaquetó una columna Tricorn 5/150 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 15 cm. El volumen de columna (VC) de Capto MMC era de 3 ml.

Tampones

Experimento 6

Tampón de equilibrado: 20 mM de acetato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de lavado: 20 mM de NaAc, 1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 7

Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% Polisorbato 80, pH 5,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 8

Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 6,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0

5 **Experimento 9**

Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 6,5

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0

Experimento 10

10 Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 5,5

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Experimento 11

15 Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 4,0

Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Sistema experimental

20 Cada experimento se llevó a cabo de la siguiente manera. El rhG-CSF purificado se diluyó aproximadamente 1 en 20 con el tampón de equilibrado que se iba a utilizar. El pH del material de partida se controló y era el mismo en todos los experimentos que el del tampón de equilibrado sin ajustarse. La columna se equilibró con el tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego la columna se eluyó utilizando el tampón de elución. En el experimento 6 la columna también se lavó con un tampón que contenía 1 M de NaCl antes de la elución. Las muestras se retiraron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC.

25 Como se ve en la Figura 4 en el Experimento 6 no se obtuvo ningún pico en el lavado con 1 M de NaCl, lo que indicaba que no se lavó nada de rhG-CSF de la columna Capto MMC. El mismo perfil de elución se obtuvo cuando el G-CSF se purificó en una columna Capto MMC independientemente de si se utilizaba un tampón de acetato sódico o un tampón de citrato sódico a un pH de 4 (Experimento 6 y Experimento 11).

30 Los resultados del análisis para demostrar a qué nivel se unía el rhG-CSF al Capto MMC y qué rendimiento se obtenía se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6.

Nº de Experimento	pH en la muestra de carga	G-CSF en el flujo continuo %	G-CSF en el eluido %	Figura
6	4,0	0	105	4
11	4,0	0	100	5
7	5,0	0	98	6
10	5,5	0	97	7
8	6,0	0	97	8
9	6,5	26,8	25,7	9

35 Los datos de la tabla 6 muestran que el G-CSF que se une a la resina Capto MMC a pH 4 o 6 sin ninguna pérdida de material en el flujo continuo. Pero con pH 6,5 en el material de partida, la mayoría del G-CSF detectado se encontró en la fracción del flujo continuo.

La columna de Capto MMC se eluyó con un tampón a un pH fijado en 7 y contenía 0,5 M de arginina. La recuperación de G-CSF era alta cuando el material se cargaba en la columna a un pH de 4 a 6, mientras que cuando se utilizaba un pH de 6,5 en el material de partida el rendimiento en el eluido era bajo.

40 En los cromatogramas posteriores (Figura 4, 5 y 6) se muestra que cuando el rhG-CSF estaba en un tampón con un pH de 4 o 5, se eluía de la columna de Capto MMC como un pico doble. Mientras que se obtenía un único pico

cuando el pH del material de partida estaba a 5,5, 6,0 o 6,5 (Figura 7, 8 y 9). Como se muestra en la SDS PAGE teñida con plata (Figura 10A) el eluido del Experimento 8 (pH 6,0), Experimento 9 (pH 6,5) y Experimento 10 (pH 5,5) tiene una clara banda única mientras que los eluidos del Experimento 6 (pH 4,0) y el Experimento 7 (pH 5,0) mostraban más bandas en la SDS-PAGE teñida con plata (Figura 10B).

5 Conclusión

Los resultados de estos experimentos muestran que rhG-CSF puede unirse a Capto MMC a un pH de 4,0, 5,0, 5,5, 6,0. La unión de rhG-CSF a Capto MMC a pH 6,5 es menos fuerte y el rhG-CSF se encontraba en la fracción de flujo continuo lo cual no es el caso cuando el pH es de 4 a 6.

10 El perfil de elución es mejor cuando se utilizó un pH de 5,5 a 6,5 y el producto se ve mejor en una SDS-PAGE cuando se utilizaban estos pH en el material de carga.

Debido al escape de G-CSF en la columna Capto MMC cuando se utilizaba el pH 6,5, se usaba preferentemente un pH de 5,5 a 6,0 en el material de carga.

15 El material unido se eluía a pH 7 en todos los experimentos, y el pico era más concentrado cuando se incluía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina en el tampón de elución. Un lavado con 1 M de NaCl se llevó a cabo a pH 4 sin ninguna pérdida de G-CSF.

Leyenda de las figuras 4-10

Figura 4

20 Experimento 6; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 4,0 del material de inicio utilizando un tampón de acetato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico de la elución. El doble pico se recolectó como una fracción.

Figura 5

25 Experimento 11; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 4,0 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico de la elución. El doble pico se recolectó como una fracción.

Figura 6

30 Experimento 7; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 5,0 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico de la elución. El doble pico se recolectó como una fracción.

Figura 7

35 Experimento 10; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 5,5 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un pico ligeramente no uniforme de la elución.

Figura 8

40 Experimento 8; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 6,0 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un pico uniforme concentrado.

Figura 9

45 Experimento 9; un cromatograma de la purificación de G-CSF sobre una columna Capto MMC a pH 6,5 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un pico uniforme concentrado.

Figura 10A y Figura 10B

50 Experimento 6, 7, 8, 9, 10; Separación de las proteínas en el material de partida y el eluido de los experimentos Capto MMC en los que se utilizaron diferentes valores del pH en el material de partida. Las muestras se redujeron

(se trataron con SDS) y se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se visualizaron entonces por tinción con plata.

Ejemplo 7 (Experimento 12)

Material de partida

- 5 G-CSF humano recombinante producido en células HEK 293. Se retiraron las células, y el sobrenadante libre de células era el material de partida que se cargaba en la columna Capto MMC.

Resina y columna cromatográficas

- 10 Se utilizó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (nº de cat. 17-5317), como etapa de captura para la molécula de rhG-CSF. Capto MMC es una resina catiónica débil que tiene interacciones hidrófobas y tiófilas y enlaces de hidrógeno. Se empaquetó una columna XK16 (GE Healthcare) con resina Capto MMC hasta una altura de lecho de 13,5 cm. El volumen de columna (VC) de Capto MMC era de 27 ml.

Tampones

- 15 Tampón de equilibrado: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 6,0
Tampón de elución: 20 mM de citrato sódico, 0,1 M de NaCl, 0,5 M de monoclóhidrato de arginina, un 0,02% de Polisorbato 80, pH 7,0.

Sistema experimental

- 20 El pH del sobrenadante libre de células se ajustó a 6,0. La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido por la carga del material de partida con pH ajustado con un caudal de 13,5 ml/min. Se continuó con una etapa de lavado con el tampón de equilibrado, y luego se eluyó la columna utilizando el tampón de elución. Las muestras se extrajeron y se analizaron en cuanto a rhG-CSF por un procedimiento HPLC. El análisis demostraba que todo el rhG-CSF cargado en la columna se unía a la resina Capto MMC con estas condiciones de tampón, no se encontró ningún G-CSF en la fracción de flujo continuo. El tampón de elución contenía 20 mM de NaCitrato, 0,5 M de arginina, 0,1 M de NaCl y un 0,02% de Polisorbato 80, y el pH era 7,0. La elución de las proteínas unidas a la resina Capto MMC daba como resultado un pico principal y un pico secundario pequeño. Todo el G-CSF cargado en la columna Capto MMC se encontraba en el pico principal, y no se detectó G-CSF en el segundo pequeño pico (Figura 11).

Conclusión

- G-CSF humano recombinante en medio de cultivo libre de células unido a una resina Capto MMC a pH 6,0.
No se encontró G-CSF en la fracción de flujo continuo.
30 El material unido se eluyó de la resina Capto MMC cambiando el pH a 7 y añadiendo 0,5 M de arginina para concentrar el pico de elución.

Leyenda de la Figura 11

- 35 Experimento 12; un cromatograma de la purificación de G-CSF a partir de un sobrenadante libre de células sobre una columna Capto MMC a pH 6,0 utilizando un tampón de citrato sódico. Se presentan en la figura la absorbancia a 280 nm (mAU) y la conductividad (mS/cm) que se midieron. La columna se eluyó utilizando un tampón con un pH 7,0 que contenía 0,5 M de monoclóhidrato de arginina. Se obtuvo un doble pico pero solo se encontró G-CSF en el pico principal.

Ejemplo 8

Columna y resina

- 40 Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un ligando de afinidad basada en un fragmento Fab derivado de levadura acoplado a una matriz con base de Capto MP. La altura del lecho era aproximadamente de 2 cm, dando un volumen de resina de aproximadamente 0,4 ml. Se obtuvo el prototipo de resina de afinidad (G-CSF8) en BAC BV.

Material de partida

- 45 El material de partida que se utilizó era G-CSF contenido en el sobrenadante celular producido por células HEK293F.

Composiciones de tampón:

Tampón A (Tampón de equilibrado)

0,3 M NaCl, 0,02 M de Na-citrato, un 0,02% Tween 20, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C.

Tampón B (Tampón de elución I)

0,3 M NaCl, 0,02 M Na-citrato, un 0,02% de Tween 20, pH 3,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C.

5 La columna se equilibró con tampón de equilibrado A seguido por la carga con el material de partida. La resina se lavó a continuación con tampón de equilibrado A y el G-CSF se eluyó posteriormente con el tampón de elución B. Se analizó el contenido en G-CSF en el material de partida y el eluido (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del experimento de G-CSF con la resina de afinidad, elución con un pH 3

Muestra	Volumen (ml)	G-CSF (ug/ml)	Cantidad total G-CSF (ug)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	2	200	100
Eluido (Tampón B)	1,5	111	170	83

10 **La Figura 12 muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie que muestra el eluido después de la etapa de cromatografía de afinidad.**

Calle de muestra

- 1 Peso molecular de referencia
- 2 Eluido (Ejemplo 8)

Conclusión del Ejemplo 8

15 Se consiguió una pureza y recuperación excelentes cuando se utilizaba un tampón de pH bajo (pH 3) para la elución de G-CSF.

Ejemplo 9

Columna y resina

20 Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un ligando de afinidad basado en un fragmento Fab derivado de una levadura dirigido contra G-CSF acoplado a una matriz con base de Capto MP. La altura del lecho era aproximadamente de 2 cm, dando un volumen de resina de aproximadamente 0,4 ml. Se obtuvo el prototipo (G-CSF8) de la resina de afinidad en BAC BV.

Material de partida

25 El material de partida que se utilizó era el G-CSF que estaba contenido en un sobrenadante celular de células HEK293F.

Composiciones tampón

Tampón A (tampón de equilibrado)

0,3 M de NaCl, 0,02 M de Na-citrato, un 0,02% de Tween 20, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C

Tampón C (tampón de elución II)

30 1,0 M de NaCl, 0,02 M de Na-citrato, 0,8 M de Arg, un 0,02% de Tween 20, pH 6,0, conductividad 89 mS/cm a +25 °C.

Los tampones de equilibrado y elución no se limitan al pH, concentraciones, y el tipo de tampón, sales o detergente establecidos.

35 La columna se equilibró con tampón de equilibrado A seguido por la carga del material de partida. La resina se lavó a continuación con tampón de equilibrado A, y el G-CSF unido se eluyó con el tampón de elución C. Se analizó el contenido de G-CSF en el material de partida y el eluido (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados del experimento de G-CSF en resina de afinidad, elución con arginina

Muestra	Volumen (ml)	G-CSF (ug/ml)	Cantidad total G-CSF (ug)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	2	200	100
Eluido (Tampón B)	3,7	30	110	56

Conclusión del ejemplo 9

Es posible eluir el G-CSF de la columna de afinidad utilizando una mezcla de cloruro sódico y arginina.

Ejemplo 10Columna y resina

- 5 Se empaquetó una columna Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con un ligando de afinidad basado en un fragmento Fab derivado de una levadura dirigido contra G-CSF acoplado a una matriz con base de Capto MP. La altura del lecho era aproximadamente de 2 cm, dando un volumen de resina de aproximadamente 0,4 ml. Se obtuvo el prototipo (G-CSF8) de la resina de afinidad en BAC BV.

Material de partida

- 10 El material de partida que se utilizó era el G-CSF que estaba contenido en un sobrenadante celular de células HEK293F.

Composiciones tampónTampón A (tampón de equilibrado)

0,3 M de NaCl, 0,02 M de Na-citrato, un 0,02% de Tween 20, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C

- 15 Tampón D (tampón de elución III)

2,0 M de MgCl₂, 0,02 M de Tris, un 0,02% de Tween 20, pH 7,5, conductividad 144 mS/cm a +25 °C.

Los tampones de equilibrado y elución no se limitan al pH, concentraciones, y el tipo de tampón, sales o detergente establecidos.

- 20 La columna se equilibró con tampón de equilibrado A seguido por la carga con el material de partida. La resina se lavó entonces con tampón de equilibrado A, y el G-CSF unido se eluyó con el tampón de elución D. Se analizó el contenido de G-CSF en el material de partida y el eluido (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del experimento de G-CSF con resina de afinidad, elución con MgCl₂

Muestra	Volumen (ml)	G-CSF (ug/ml)	Cantidad total G-CSF (ug)	Rendimiento (%)
Material de partida (carga)	100	12	1200	100
Eluido (Tampón B)	2,5	390	970	81

Conclusión del ejemplo 10

- 25 Es posible eluir el G-CSF a partir de la columna de afinidad utilizando 2 M de MgCl₂ como eluyente.

Ejemplo 11Columna y resina

- 30 Se empaquetaron columnas Tricorn 5/50 (GE Healthcare) con 3 prototipos diferentes de ligandos de afinidad basados en un fragmento Fab derivado de una levadura dirigido contra G-CSF acoplados a una matriz con base de Capto MP. La altura del lecho era aproximadamente de 2 cm, dando un volumen de resina de aproximadamente 0,4 ml. Se obtuvieron los prototipos (G-CSF2, G-CSF3 y G-CSF6) de la resina de afinidad en BAC BV.

Material de partida

El material de partida que se utilizó era un G-CSF que estaba contenido en un sobrenadante celular de células HEK293F.

- 35 Composiciones tampón:

Tampón A (tampón de equilibrado)

0,3 M de NaCl, 0,02 M de Na-citrato, un 0,02% de Tween 20, pH 6,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C

Tampón B (tampón de elución I)

0,3 M de NaCl, 0,02 M de Na-citrato, un 0,02% de Tween 20, pH 3,0, conductividad 32 mS/cm a +25 °C.

Las columnas se equilibraron con tampón de equilibrado A seguido por la carga del material de partida. La resina se lavó entonces con tampón de equilibrado A, y se eluyó el G-CSF unido con el tampón de elución B. Se analizaron los contenidos de G-CSF en el material de partida, las fracciones de flujo continuo y los eluidos (Tabla 10).

5

Tabla 10. Resultados del experimento de G-CSF con resina de afinidad, ensayo de diferentes prototipos de ligandos de afinidad, elución con un pH de 3

Muestra	Volumen (ml)	G-CSF (ug/ml)	Cantidad total G-CSF (ug)	Rendimiento (%)
<i>Ligando G-CSF2</i>				
Material de partida (carga)	100	10	1100	100
Fracción de flujo continuo	112,5	4	500	45
Eluido (Tampón B)	2	290	570	57
<i>Ligando G-CSF3</i>				
Material de partida (carga)	100	11	1100	100
Fracción de flujo continuo	112,5	0	0	0
Eluido (Tampón B)	2	510	1020	93
<i>Ligando G-CSF6</i>				
Material de partida (carga)	100	12	1200	100
Fracción de flujo continuo	112,5	2	200	19
Eluido (Tampón B)	1,5	450	670	56

La Figura 13 muestra una SDS-PAGE teñida con plata que muestra el material de partida, el flujo continuo y los eluidos después de la etapa de cromatografía de afinidad.

Leyenda:

10 **Calle de la muestra**

1 G-CSF2 inicio; 2 G-CSF2 flujo continuo; 3 en blanco; 4 G-CSF2 eluido; 5. en blanco; 6 G-CSF3 flujo continuo; 7 en blanco; 8 G-CSF3 eluido; 9. en blanco; 10 G-CSF6 flujo continuo; 11 en blanco; 12 G-CSF6 eluido

Conclusión del ejemplo 11

15 Los diferentes prototipos de ligandos de afinidad tienen diferentes capacidades de unión al G-CSF, como se muestra por la detección de G-CSF en el flujo continuo y la variada recuperación en la fracción de elución utilizando el pH como eluyente. Sin embargo, como se muestra en la figura 13, todos los ligandos de afinidad tienen el mismo perfil de pureza excelente en el eluido.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) en una secuencia de purificación que emplea cromatografía, **caracterizado porque**
 - 5 - al menos una cromatografía se lleva a cabo utilizando una resina multimodal que contiene un ligando ácido 2-(benzoilamino) butanoico cargado negativamente
 - el G-CSF se une a la resina multimodal a un pH entre 4 y 6,2, y
 - el G-CSF se eluye a un pH > 6,3 y en el que la elución se lleva a cabo con un agente de elución que comprende arginina a una concentración en el intervalo de 0,1 M a 2,0 M,
 - 10 - opcionalmente en combinación con una etapa de cromatografía de afinidad con un ligando que emplea un fragmento F_{ab} derivado de levaduras dirigido hacia el G-CSF.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el G-CSF es un G-CSF recombinante.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el G-CSF se une a la resina multimodal a pH 4,0 hasta pH 6,0, y el G-CSF se eluye de la resina multimodal a un pH de 6,5 o mayor, en particular a un pH de 7,0.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se utiliza una sustancia tampón que comprende citrato sódico, histidina, ácido 2-(4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacil)-etano sulfónico (HEPES), ácido 2-(N-Morfolino) etano sulfónico (MES), base Tris y acetato sódico en particular en un intervalo de pH 4 a pH 8.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que está presente un detergente no iónico en cualquiera de los tampones utilizados, detergente no iónico que se selecciona en particular de entre el grupo que consiste en Polisorbatos tales como Polisorbato 20, 40, 60, 80 y Pluronic F68.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los tampones que comprenden cloruro sódico 0,1 M – 2 M o monoclóhidrato de arginina 0,1 M – 2 M, se utilizan en una etapa de lavado con un intervalo de pH de 4,0-6,0 antes de la elución del G-CSF.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se aplica un tampón de lavado a la resina multimodal, para lavar los contaminantes y retener el G-CSF, antes de liberarse el G-CSF, **caracterizado porque** el tampón de lavado comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral básica y/o una sal que se escoge de acuerdo con la serie de Hofmeister.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la resina multimodal de cromatografía se selecciona de entre las siguientes resinas disponibles en el mercado Capto MMC™.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las siguientes etapas:
 - 30 - una resina multimodal que contiene un ligando ácido 2-(benzoilamino) butanoico cargado negativamente tal como Capto MMC;
 - una etapa de inactivación basada en química para los virus encapsulados;
 - una resina de afinidad basada en un fragmento F_{ab} que se expresa en levaduras dirigido hacia G-CSF;
 - un intercambiador catiónico tal como SP Sefarosa o Resource S;
 - 35 - una etapa de eliminación de agentes patógenos por filtración con un tamaño medio de poro de 20 nm tal como Planova 20N;
 - una etapa de intercambio y/o concentración de tampón tal como ultrafiltración con un corte aproximado de 1-5 kDa;
 - una resina de cromatografía de exclusión por tamaño tal como Superdex 75.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, **caracterizado porque** la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad en la que la afinidad la proporciona un fragmento F_{ab} derivado de levaduras dirigido hacia el G-CSF y porque la pureza del producto resultante de la resina de cromatografía de afinidad es mayor del 90%.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** se lleva(n) a cabo etapa(s) adicional(es) de cromatografía seleccionada(s) de entre cromatografía de exclusión por tamaño, intercambio aniónico, intercambio catiónico, interacción hidrófoba y afinidad por metal inmovilizado, **caracterizado porque** la pureza del producto final es mayor del 99%.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** la secuencia de purificación comprende además las etapas de eliminación/inactivación de agentes patógenos que comprenden una etapa de inactivación con base química, una etapa de eliminación basada en tamaño, etapas de cromatografía o combinaciones de las mismas, etapas que se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas contra el agente patógeno a eliminar.

Figura 1

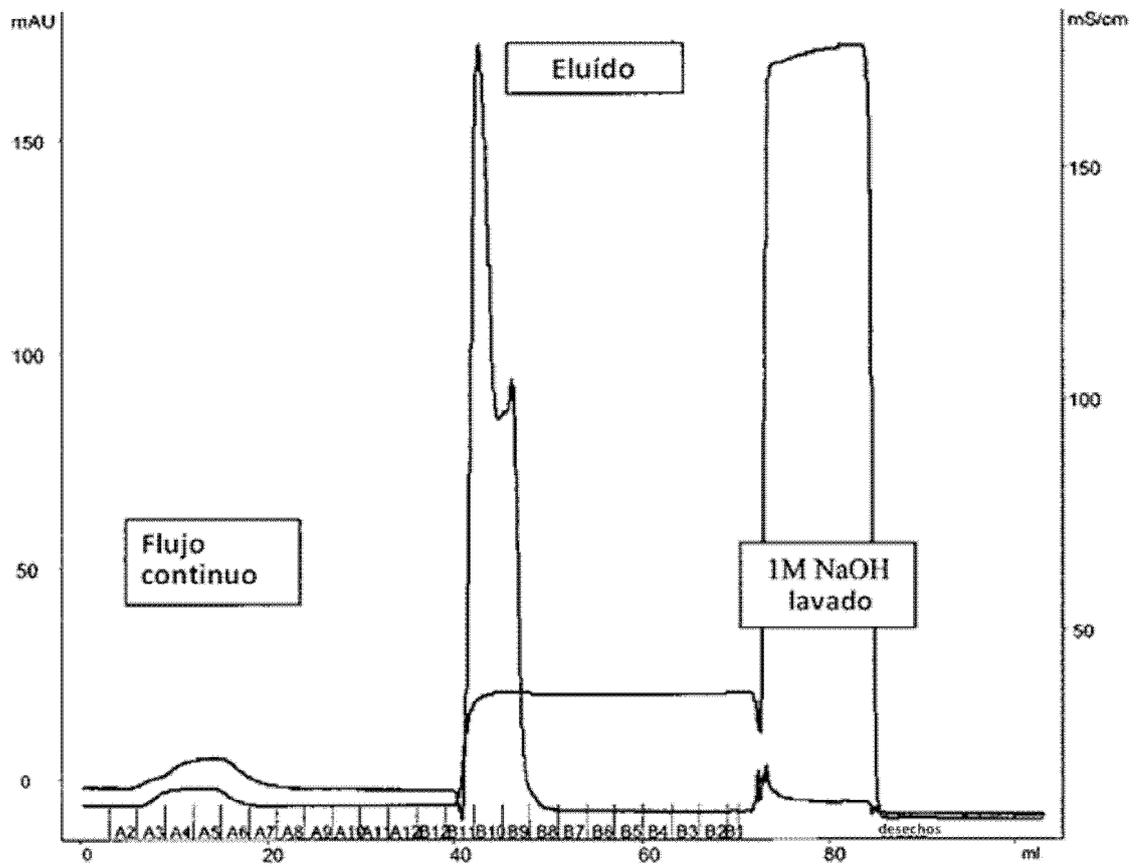


Figura 2

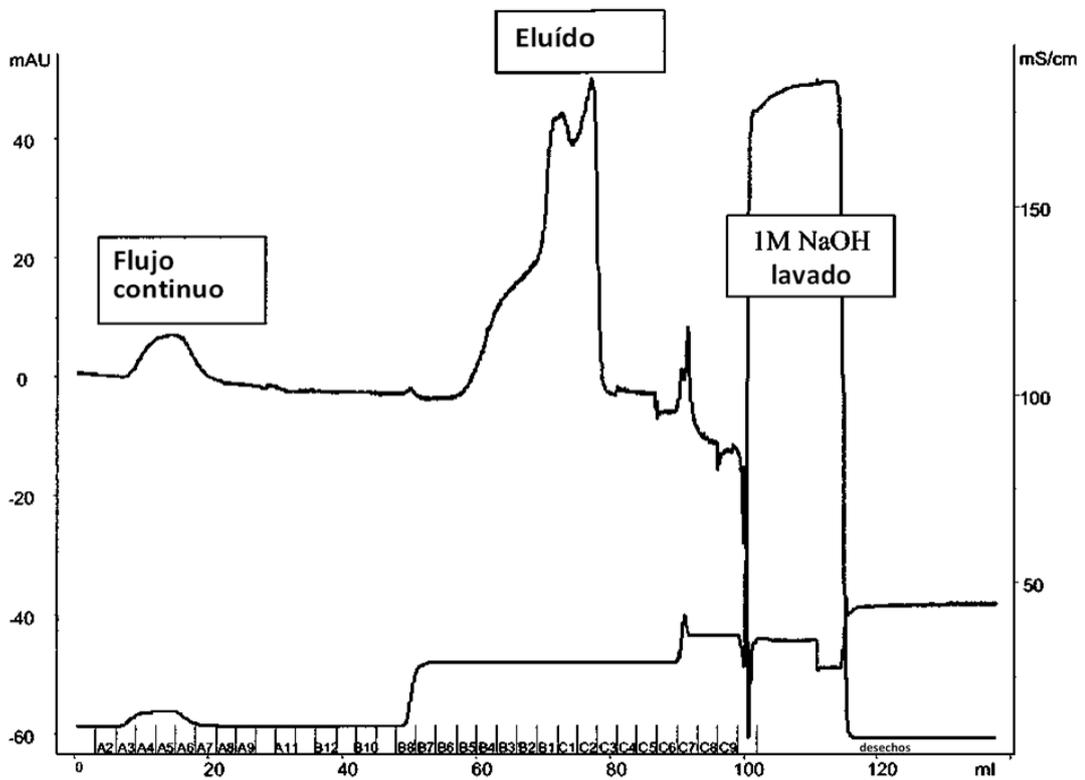


Figura 3

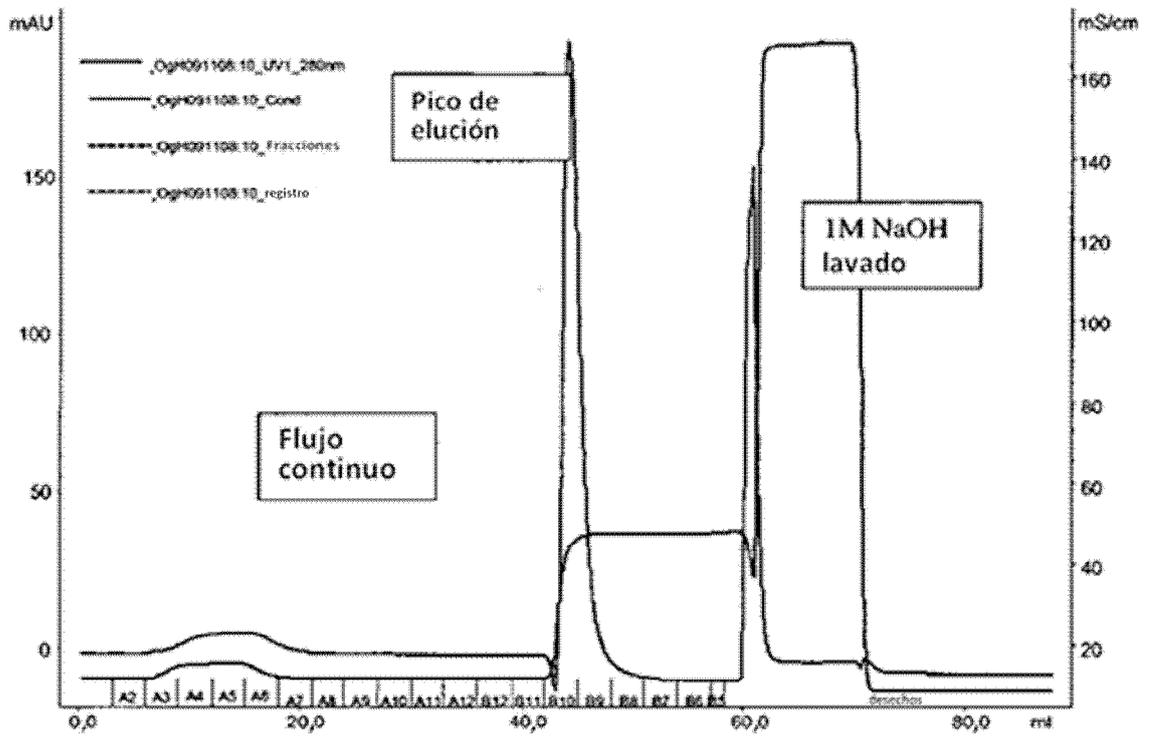


Figura 4

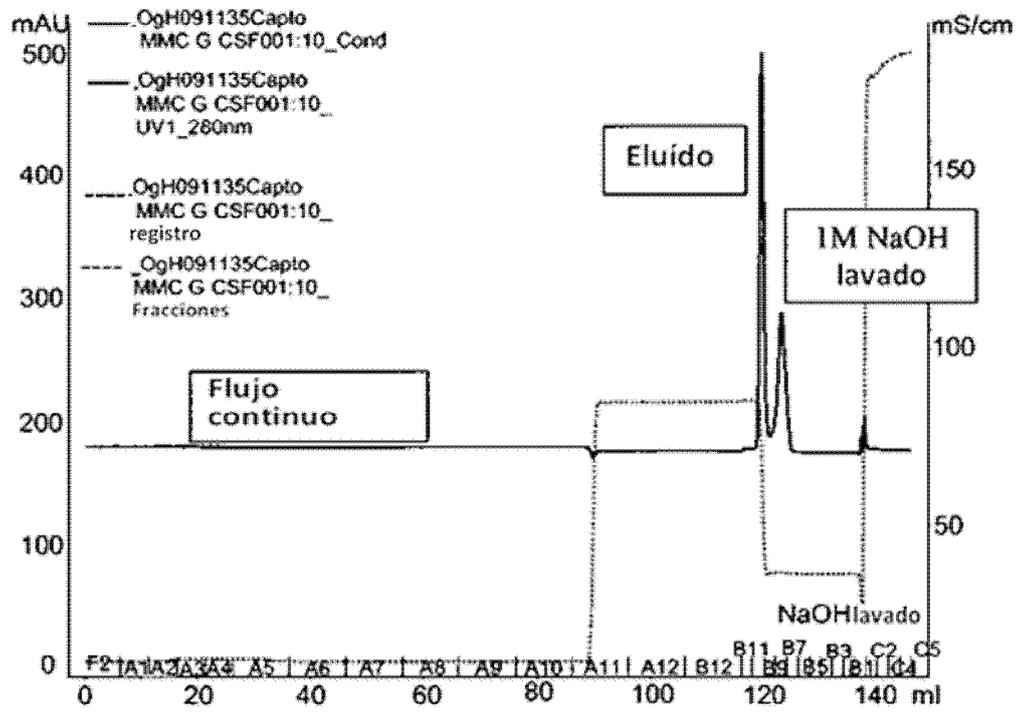


Figura 5

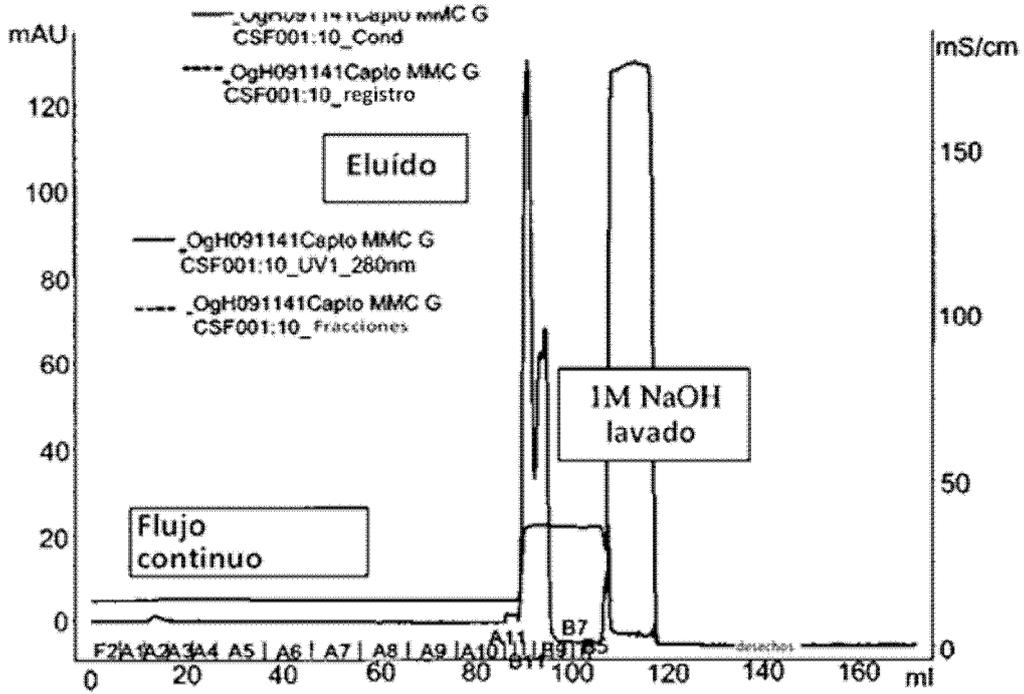


Figura 6

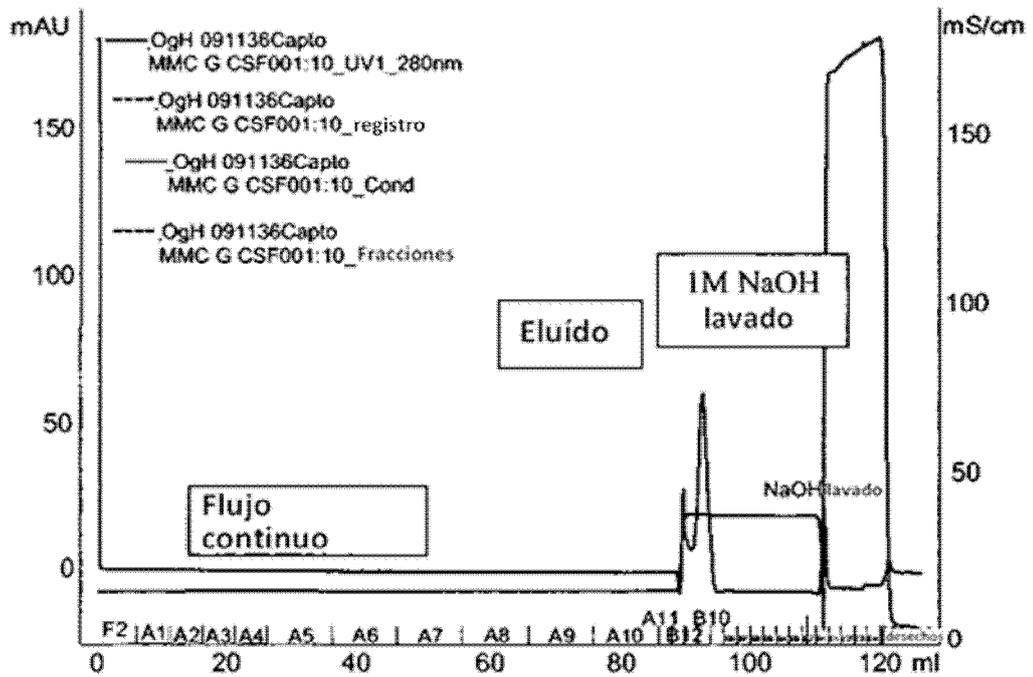


Figura 7

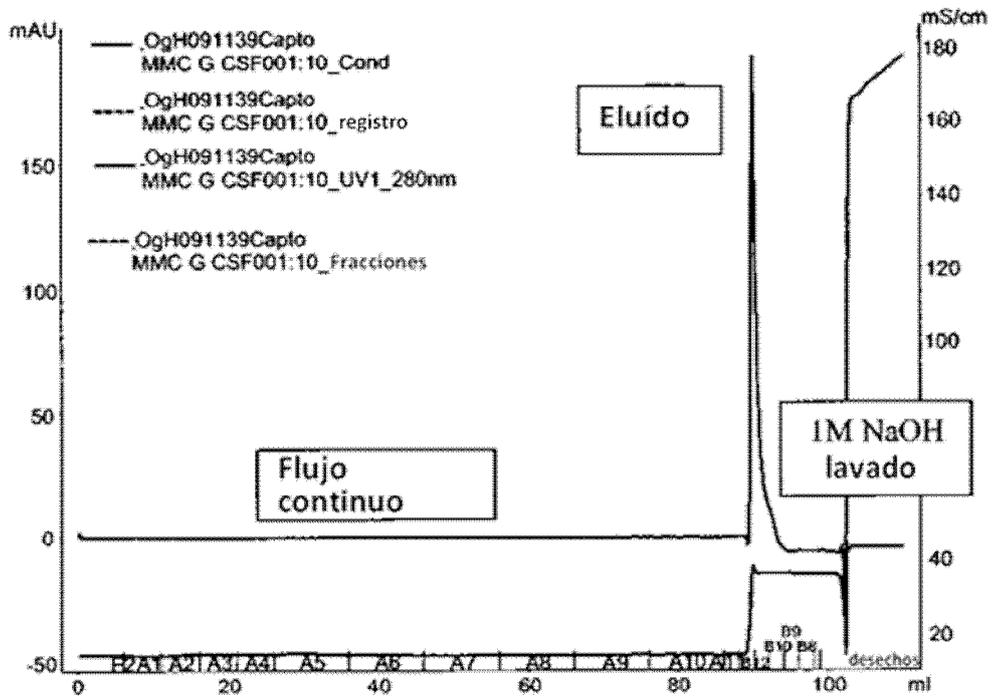
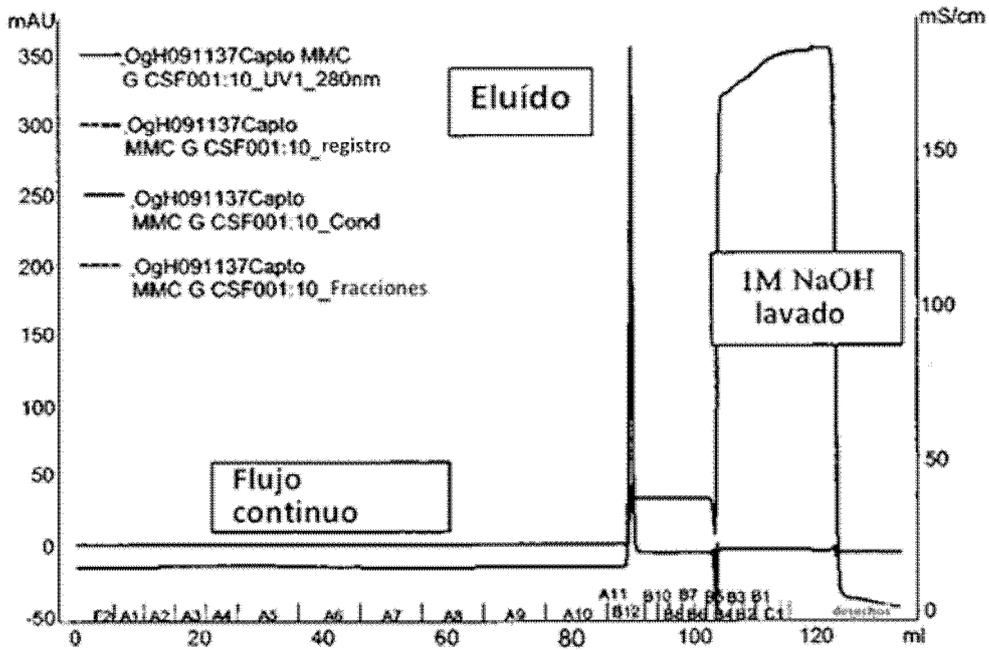


Figura 8



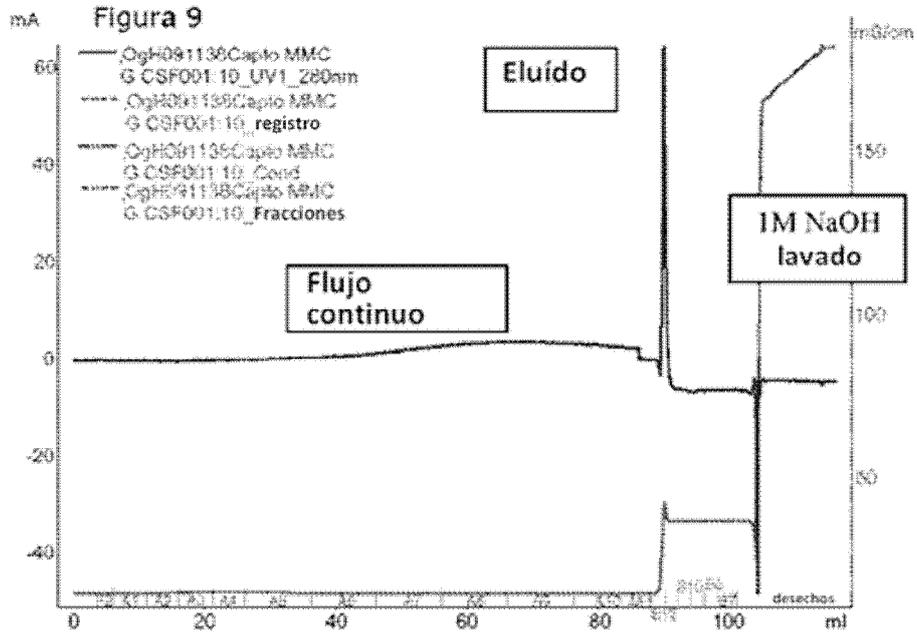


Figura 10

SDS-PAGE 10% teñida con plata: se utilizó el tampón MES como tampón de ejecución

A)

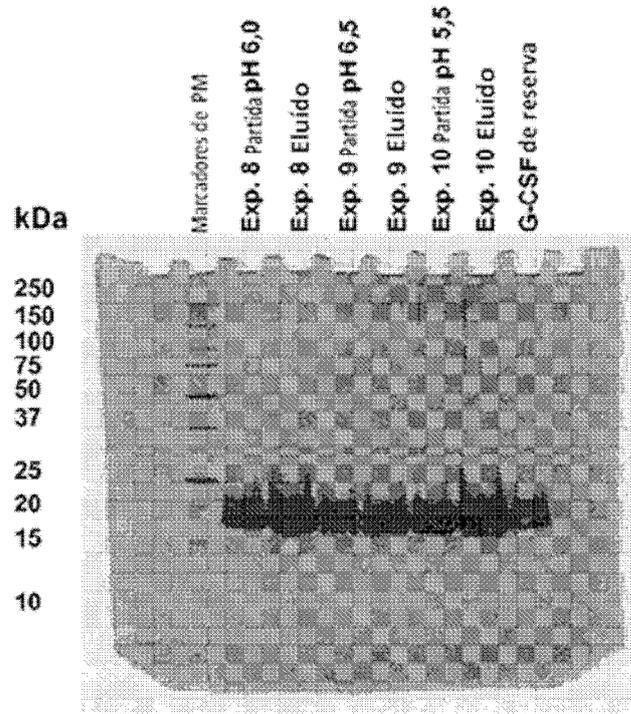


Figura 10

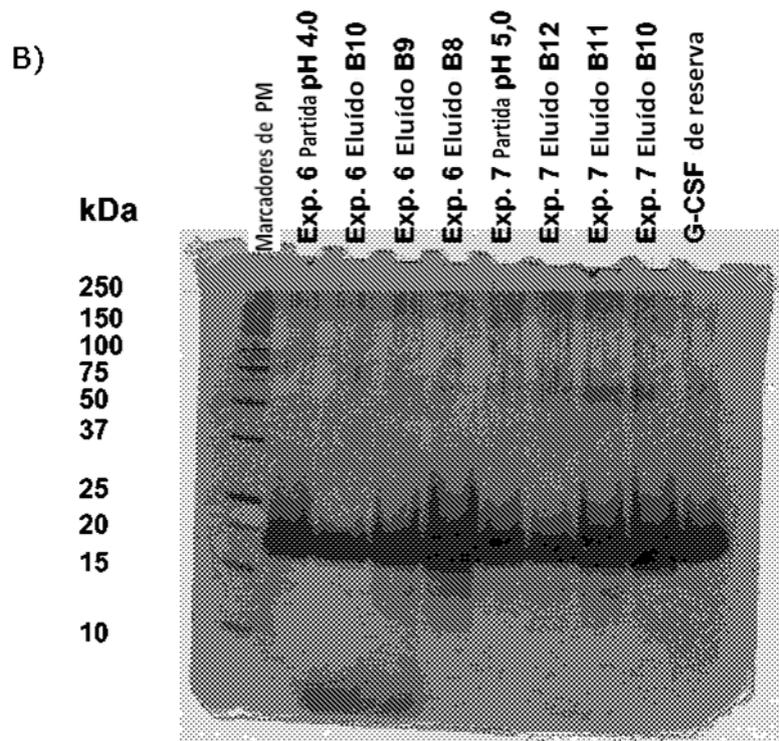


Figura 11

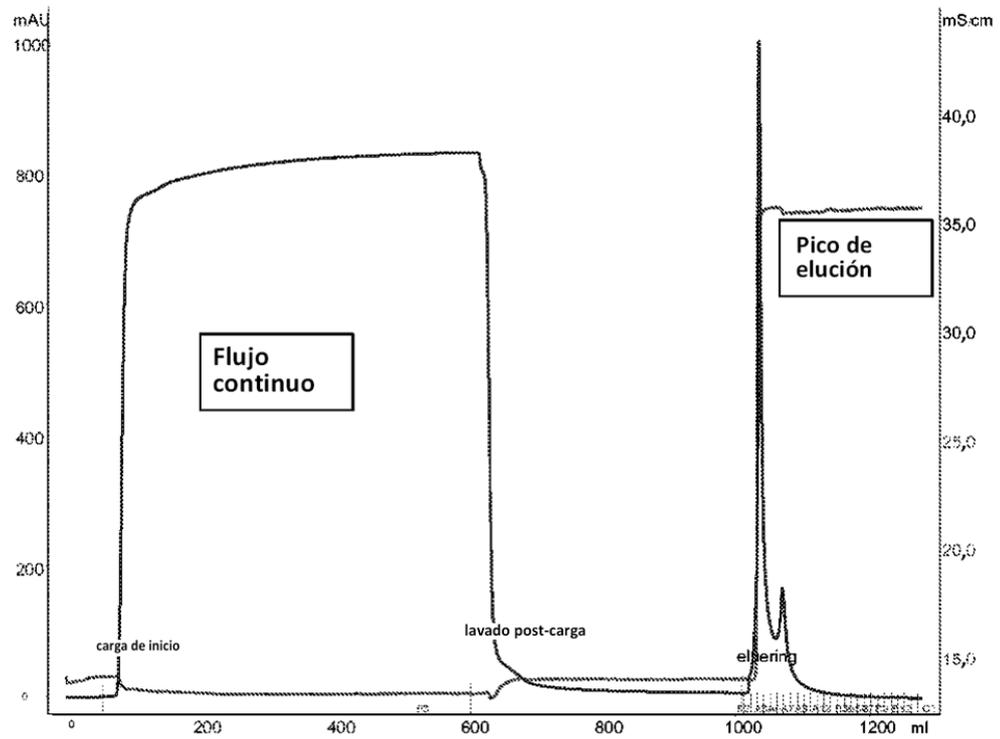


Figura 12



Figura 13

