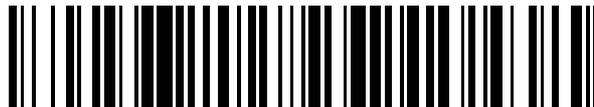


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 453**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2011 PCT/EP2011/001331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11709881 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2547699**

54 Título: **Procedimiento para obtener G-CSF humano recombinante biológicamente activo**

30 Prioridad:

**17.03.2010 EP 10002811**

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

**09.05.2017**

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)  
Graf-Arco-Strasse 3  
89079 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

**HINDERER, WALTER y  
SCHECKERMANN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 611 453 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener G-CSF humano recombinante biológicamente activo.

## 5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), en particular de G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) en una forma pura y altamente activa. Esto se logra mediante el replegado del G-CSF solubilizado contenido en cuerpos de inclusión en un sistema de oxidorreducción adecuado a temperaturas ambiente y usando al menos una etapa de cromatografía de fase inversa (RP) precedida por una cromatografía de intercambio catiónico en el procedimiento de purificación.

## Antecedentes de la invención

**[0002]** El G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) es una citoquina hematopoyética, liberada principalmente por células mononucleares y fibroblastos, que estimula la proliferación y diferenciación de células precursoras del linaje de los granulocitos y la activación de neutrófilos funcionalmente maduros. Debido a dichas características, el G-CSF se está usando en diferentes campos médicos, como, por ejemplo, en la reconstitución de poblaciones de células sanguíneas normales después de quimioterapia o irradiación, o para la estimulación de la respuesta inmunitaria frente a patógenos infecciosos. Por lo tanto, en los centros médicos, el G-CSF se usa principalmente como terapia antitumoral, en particular en el tratamiento de la neutropenia como una consecuencia de la quimioterapia, y además se usa en trasplantes de médula ósea y en el tratamiento de enfermedades infecciosas. La primera preparación de G-CSF disponible en el comercio basada en G-CSF recombinante, fue producida y distribuida por Amgen con el nombre comercial Neupogen®.

**[0003]** El G-CSF humano en su forma natural es una glucoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Dalton y tiene cinco restos de cisteína. Cuatro de estos restos forman dos enlaces disulfuro intramoleculares, que son de esencial importancia para la actividad de la proteína. Las formas recombinantes del G-CSF se usan principalmente para producir productos farmacéuticos, que se pueden obtener, por ejemplo, mediante la expresión en células de mamífero como células CHO (ovario de hámster chino) o en células procariotas como *E. coli*. Cuando las proteínas recombinantes se expresan en procariotas, las proteínas a menudo son producidas dentro de la célula hospedante en forma de agregados insolubles, al menos parcialmente inactivos (cuerpos refráctiles, cuerpos de inclusión CI). Antes de que dichas proteínas puedan usarse, deben convertirse en su forma activa.

**[0004]** La formación de dichos cuerpos de inclusión conduce a la necesidad de solubilizar y renaturalizar las proteínas posteriormente al aislamiento de los cuerpos de inclusión, mediante medios de centrifugación a velocidad moderada, con la ayuda de medios adecuados con el fin de mantener su configuración activa.

**[0005]** Los procedimientos para la renaturalización de proteínas recombinantes derivadas de cuerpos de inclusión se conocen en general y se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0114506, WO 84/03711, US 4.530.787 y EP 0241022. Además, se han descrito técnicas generales relacionadas con la solubilización y renaturalización de proteínas desnaturalizadas en los documentos EP 0512097, EP 0364926, EP 0219874 y WO 01/87925, y además se pueden tomar de la bibliografía científica y trabajos de referencia sobre la química de proteínas.

**[0006]** El documento EP 0500108 describe un método para activar el G-CSF recombinante humano en una forma activa a partir de cuerpos de inclusión, usando un sistema de cambio de oxidorreducción de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSH) y análisis de la cinética de reactivación para el G-CSF en determinadas condiciones. Sin embargo, no se describe un procedimiento de purificación corriente abajo.

**[0007]** En el documento EP 0719860, los cuerpos de inclusión que contienen G-CSF eran solubilizados con N-lauroilsarcosina (Sarkosyl®) y posteriormente se lograba el replegado por oxidación al aire usando sulfato de cobre. Las desventajas de este método son las reacciones secundarias, p. ej., formación de radicales superóxido en cadenas laterales de aminoácidos. Además, el procedimiento de replegado requiere tiempo y es difícil obtener parámetros de replegado estandarizados. Finalmente, la separación del desnaturalizante que incluye una etapa cromatográfica conduce a una pérdida de aproximadamente 20% del rendimiento total de proteína. El G-CSF obtenido posteriormente se purifica por una cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía de intercambio catiónico.

**[0008]** Los documentos EP 1630173 y EP 1837346 describen procedimientos de obtención de G-CSF recombinante humano a partir de cuerpos de inclusión usando un sistema de cambio de oxidorreducción de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSH), en los que la etapa de replegado se lleva a cabo a bajas temperaturas durante más de medio día. Por lo tanto, a una escala industrial este procedimiento requiere energía y por lo tanto es costoso debido al enfriamiento de volúmenes grandes de solución de proteína a lo largo de muchas horas. El G-CSF resultante posteriormente se purifica por cromatografía de intercambio catiónico.

**[0009]** En el documento WO2007/009950 el procedimiento para la purificación del G-CSF enseñado en el documento EP 1630173 se especifica además con respecto a las etapas cromatográficas en cuanto que la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de interacción hidrófoba se realizan de forma consecutiva sin ninguna etapa intermedia entre ellas. En particular, el procedimiento de purificación cromatográfica comprende una secuencia de dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico llevadas a cabo antes y después de la cromatografía de interacción hidrófoba, respectivamente.

**[0010]** Sin embargo, aunque los medios y procedimientos para proporcionar G-CSF purificado con calidad terapéutica eran conocidos en la técnica anterior, los procedimientos disponibles hasta la fecha para obtener el G-CSF a partir de cuerpos de inclusión, en particular a una escala comercial, en general requieren tiempo, son laboriosos y costosos. Este problema técnico se resuelve por las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones y se describen con detalle más adelante. Además como se describe con detalle más adelante, estas realizaciones proporcionan la separación de una isoforma conformacional del G-CSF y, por lo tanto, una preparación de G-CSF muy homogénea.

#### Resumen de la invención

**[0011]** La presente invención proporciona un procedimiento para recuperar y purificar el factor estimulador de colonias de granulocitos (rhG-CSF) a partir de una célula recombinante que produce G-CSF, para usar en la fabricación de una composición farmacéutica como se caracteriza en las reivindicaciones. Dicho procedimiento comprende solubilizar la proteína recombinante de cuerpos de inclusión, replegar la molécula de G-CSF simplemente diluyendo el solubilizado en un tampón de replegado a temperaturas moderadas, preferiblemente  $>10^{\circ}\text{C}$ , y purificar el G-CSF replegado por cromatografía, en el que al menos una etapa de cromatografía comprende una cromatografía de fase inversa (RP). Este procedimiento en general se caracteriza por (a) solubilización del G-CSF contenido en los cuerpos de inclusión con un tampón de solubilización que contiene un agente desnaturalizante y un agente de reducción, (b) replegado del G-CSF diluyendo el solubilizado con un tampón de replegado que contiene glutatión reducido y oxidado a una temperatura  $>10^{\circ}\text{C}$ ; (c) purificación del G-CSF replegado mediante al menos una etapa de cromatografía, que comprende cromatografía en fase inversa (RP), precedida por una cromatografía de intercambio catiónico (CEX).

**[0012]** En particular, en un aspecto, la presente invención se basa en un procedimiento de replegado en un sistema de oxidorreducción adecuado llevado a cabo a temperaturas superiores a  $10^{\circ}\text{C}$ , en menos de medio día y ventajosamente a temperatura ambiente, es decir, a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en 3 a 4 horas. Aparte del hecho de que se puede lograr la renaturalización eficaz y precisa de las moléculas de G-CSF en estas condiciones, se pueden evitar los inconvenientes de los procedimientos previos descritos en la técnica anterior citados antes. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es fácil de realizar, requiere menos tiempo y no implica sistemas de enfriamiento que consumen energía.

**[0013]** Además, el procedimiento de la presente invención se basa en la sorprendente observación de que durante el procedimiento de producción y recuperación del G-CSF, se forma al menos una isoforma de G-CSF que se hace visible solo aplicando una cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) analítica a  $60^{\circ}\text{C}$ ; véase la figura 3, que pone de manifiesto una hidrofobicidad ligeramente menor que la forma principal. La naturaleza estructural de esta isoforma adicional mal plegada del G-CSF se investigó con detalle y se caracterizó adicionalmente como se describe más adelante. El contenido máximo de la isoforma de G-CSF adicional en la preparación entera podía constituir hasta 7% del rendimiento de proteína G-CSF total. El análisis detallado usando espectroscopía de CD puso de manifiesto que la isoforma de G-CSF difiere del G-CSF de referencia objeto en un contenido mayor de estructuras de hélice  $\alpha$  (66% para la isoforma y 52% para el G-CSF de referencia). Una propiedad característica de esta isoforma adicional es su menor hidrofobicidad en comparación con un patrón de referencia de G-CSF y la fracción principal de la preparación de G-CSF de la presente invención, por cuya razón se puede separar y por lo tanto excluir casi enteramente de la preparación. Como resultado, la incorporación de la etapa de cromatografía de RP y en particular de RP-HPLC como una etapa del procedimiento dentro del

procedimiento de la presente invención, conduce a una preparación de G-CSF mejorada, es decir, muy purificada, que carece sustancialmente de esta isoforma e impurezas relacionadas con el producto adicionales, es decir, el contenido de la isoforma de G-CSF menos hidrófoba permanece por debajo de 1% de la proteína G-CSF total. En este contexto, la cromatografía de RP se debe distinguir de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) que no es una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, con respecto a la purificación del G-CSF, hasta ahora la RP y RP-HPLC, respectivamente, solo se han usado para fines analíticos; véase, p. ej., el documento WO2007/009950. Los principios de cromatografía mencionados también son distinguidos claramente entre los expertos (véase, por ejemplo, Bioanalytik, F. Lottspeich, H. Zorbas (ed.), Heidelberg, Berlín, Alemania, Spektrum Akad. Verlag 1998). Por ejemplo, mientras que la HIC típicamente se eluye con agua, la RP se eluye con disolvente, en la que la elución se hace con un gradiente a concentraciones mayores de disolventes, tales como acetonitrilo o etanol. Preferiblemente, las etapas cromatográficas comprenden cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en condiciones adecuadas, precedida por una aplicación de una cromatografía de intercambio catiónico (CEX).

15 **[0014]** En este contexto, es prudente suponer que en los procedimientos de la técnica anterior para obtener el G-CSF de cuerpos de inclusión, también se forman las isoformas de G-CSF, pero hasta ahora no se han detectado, puesto que en las condiciones de la RP-HPLC analítica usada en la técnica anterior, las isoformas no eran evidentes. Además, puesto que la existencia de dichas isoformas de G-CSF no eran conocidas, no había razones para buscarlas.

20 **[0015]** Por consiguiente, el procedimiento de la presente invención, en particular la etapa de cromatografía de RP preparativa y la etapa de RP-HPLC, respectivamente, se pueden implementar en procedimientos de purificación para el G-CSF, en especial el G-CSF obtenido de cuerpos de inclusión después de solubilización/renaturalización en un sistema de oxidorreducción adecuado tal como los descritos en los documentos citados anteriormente. Además, en combinación con la etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) que precede, estas dos etapas de cromatografía son suficientes para purificar el G-CSF recombinante humano en una calidad que es suficiente para usar el G-CSF resultante como un fármaco. Por lo tanto, aunque el procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo preferiblemente como se indica en la figura 1 y se ilustra en los ejemplos, el experto en la materia sabrá que con el fin de llegar a un G-CSF con una calidad terapéutica, es suficiente llevar a cabo la cromatografía de CEX y una posterior RP-HPLC, mientras que cualesquiera otras etapas de purificación se pueden alterar u omitir del todo.

**[0016]** En resumen, se proporciona un procedimiento de obtención de G-CSF recombinante humano, biológicamente activo, puro, que se puede llevar a cabo con un mínimo de etapas del procedimiento de fabricación manteniendo la complejidad técnica así como los costes de energía en un nivel bajo, y en el que la preparación de G-CSF resultante es sustancialmente similar a los productos de referencia disponibles en el comercio y carece de isoformas adicionales de G-CSF.

**[0017]** La preparación de G-CSF obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es, por lo tanto, ventajosa en comparación con las obtenidas de acuerdo con procedimientos de la técnica anterior que no usan una cromatografía de RP-HPLC en términos de pureza, es decir, en ser más homogéneas en sus moléculas de proteínas G-CSF. Además, debido a la homogeneidad de la preparación de G-CSF obtenida por el procedimiento de la presente invención, es prudente esperar que la actividad in vivo de la preparación de G-CSF sea al menos similar, si no mejor, que la de los productos de G-CSF recombinantes disponibles en el comercio hasta ahora. Esto también implica que por lo demás las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas serán similares a las de los productos comercializados. Por lo tanto, el G-CSF obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para usar en medicina humana.

**[0018]** Además, la preparación de G-CSF obtenida por el procedimiento de la presente invención es particularmente adecuada para la derivatización adicional, puesto que el producto químicamente modificado así retiene la alta pureza y homogeneidad de la preparación de G-CSF. Por lo tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende además la modificación química del G-CSF obtenido de acuerdo con dicho procedimiento, por ejemplo, por unión covalente de un polímero soluble en agua al G-CSF, tal como polietilenglicol (PEG).

55 **[0019]** Además, en vista de las consideraciones anteriores, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica del G-CSF recombinante o un derivado del mismo y aditivos farmacéuticamente aceptables tales como tampones, sales y estabilizantes, en donde dicho procedimiento comprende el procedimiento de obtener el G-CSF como se caracteriza en las reivindicaciones, y en particular en los ejemplos. Preferiblemente, el G-CSF biológicamente activo purificado o derivado del mismo, p. ej.,

G-CSF pegilado se formula en ácido acético 10 mM a un pH de 4,0, polisorbato 80 al 0,0025% y sorbitol 50 g/l. Las composiciones farmacéuticas así obtenidas también se describen en la presente solicitud.

### Breve descripción de los dibujos

5

[0020]

Fig. 1: Esquema de diagrama de flujo que ilustra el procedimiento de aislamiento y purificación del G-CSF de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Como se ilustra, en una realización preferida de la presente  
10 invención, el procedimiento de purificación y obtención del G-CSF humano biológicamente activo a partir de cuerpos de inclusión comprende las etapas de:

(a) fermentación y recogida

15 a. Cultivo de células recombinantes que producen rhG-CSF, que expresan en exceso rhG-CSF que se acumula con alta densidad en cuerpos de inclusión;

b. Aislamiento de los cuerpos de inclusión;

20 c. Solubilización de los cuerpos de inclusión mediante el uso de un agente de reducción en un tampón de desnaturalización seguido de filtración;

d. Replegado conseguido suministrando un tampón de replegado y transferencia de la mezcla de solubilización a dicho tampón de replegado en un procedimiento de dilución de una sola etapa, en la que se usa un sistema de  
25 oxidorreducción basado en un glutatión oxidado y reducido (GSH/GSSH) en un tampón de hidrocloreto de arginina alcalino débil, e incubación a temperaturas superiores a 10°C durante al menos tres horas para generar rhG-CSF soluble biológicamente activo en un tanque de acero inoxidable seguido de filtración;

(b) purificación del rhG-CSF soluble

30

a. Etapa de ultra y diafiltración para intercambiar el tampón, reducir la concentración del desnaturalizante y concentrar el G-CSF replegado, preferiblemente usando un tamaño de poros con corte de exclusión de peso molecular de 10 kDa y seguido de filtración;

35 b. Cromatografía de intercambio catiónico para separar especies agregadas así como proteínas y ADN del hospedante, intercambiar el tampón, y concentrar la fracción de G-CSF por reducción de volumen;

c. Una etapa de microfiltración para separar las impurezas insolubles;

40 d. Una etapa de purificación por RP-HPLC en condiciones adecuadas a temperaturas ambiente realizada, por ejemplo, mediante una columna Jupiter C4, con el fin de separar la isoforma de G-CSF menos hidrófoba que eluye antes que la fracción principal de G-CSF; y separación de los derivados oxidados y reducidos del G-CSF

e. Una etapa de ultra y diafiltración (p. ej., filtración de flujo tangencial) para concentrar el G-CSF purificado y ajustar  
45 el G-CSF en la formulación deseada, preferiblemente usando un tamaño de poros con corte de exclusión de peso molecular de 5 kDa y seguido de filtración;

f. Almacenamiento del G-CSF purificado preferiblemente a 2-8°C

50 Las etapas del procedimiento y purificación individuales se explican con más detalle en la descripción y ejemplos.

Fig. 2: Análisis de transferencia Western del rhG-CSF purificado, aislado de cuerpos de inclusión, Las proteínas G-CSF purificadas se separaron por SDS-PAGE Tris-glicina al 4-20% y se transfirieron. La transferencia Western se incubó con anticuerpo primario dirigido contra G-CSF, y se reveló usando un anticuerpo indicador secundario. Se  
55 cargaron 0,1 µg de proteína por ranura. Bandas 3, 7, 9 y 13 vacías; 2, 8 y 14 marcadores de peso molecular (Magic Mark XP); 4-6, G-CSF obtenido por el procedimiento ilustrado en los ejemplos; 10-12, Neupogen® como referencia. Neupogen® y el G-CSF se mueven a aproximadamente 18 kDa como está indicado en las bandas 4-6 comparadas con las bandas 10-12. Como resultado el G-CSF obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención parece que carece de bandas adicionales y es comparable a Neupogen®.

Fig. 3: Análisis por RP-HPLC analítica de la preparación de rhG-CSF antes o después de la etapa de purificación por RP-HPLC preparativa de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Después de replegado y purificación por cromatografía de CEX, se tomaron muestras de G-CSF antes (A) o después (B) de la etapa de purificación por cromatografía de RP-HPLC preparativa y se sometieron a análisis por RP-HPLC analítica a 60°C, con el fin de determinar la composición de las muestras. G-CSF ★ indica la isoforma del G-CSF menos hidrófoba, mientras que G-CSF indica la fracción principal. Hay que indicar que en (A) con la muestra tomada antes de la etapa de purificación por RP-HPLC, es visible un pico adicional antes del pico de la fracción principal (flecha). En (B) con la muestra tomada después de la etapa de purificación por RP-HPLC, el pico principal es visible, mientras que el segundo pico que corresponde a la isoforma de G-CSF menos hidrófoba destacado en (A) por una flecha, está casi completamente ausente.

### Descripción detallada de la invención

15 **[0021]** La presente invención se refiere en general a un procedimiento para la producción a gran escala de una preparación de G-CSF homogénea y altamente purificada con cantidades minimizadas de la isoforma del G-CSF menos hidrófoba comparado con el G-CSF de referencia. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una composición farmacéutica de G-CSF humano recombinante biológicamente activo como se caracteriza en las reivindicaciones, que comprende obtener el G-CSF de una célula recombinante  
20 que produce G-CSF, tal como *E. coli*, que comprende la solubilización de la proteína G-CSF recombinante de cuerpos de inclusión, replegado de la molécula de G-CSF por dilución del solubilizado en un tampón de replegado a temperatura ambiente >10°C, y purificación del G-CSF replegado por cromatografía, en donde al menos una etapa de cromatografía comprende cromatografía en fase inversa (RP). En otras palabras, el procedimiento de la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener G-CSF humano biológicamente activo a partir de cuerpos de  
25 inclusión como se caracteriza en las reivindicaciones que comprende las etapas de:

(a) solubilización del G-CSF contenido en los cuerpos de inclusión con un tampón de solubilización que contiene un agente desnaturalizante y un agente de reducción,

30 (b) replegado del G-CSF diluyendo el solubilizado con un tampón de replegado que contiene glutatión reducido y oxidado a una temperatura >10°C;

(c) purificación del G-CSF replegado mediante al menos una etapa de cromatografía, que comprende cromatografía de fase inversa (RP), precedida por una cromatografía de intercambio catiónico (CEX).

35 **[0022]** De acuerdo con la presente invención, la expresión “G-CSF humano biológicamente activo” se entiende que indica una preparación de G-CSF, que se ha purificado por el procedimiento de acuerdo con la presente invención y es capaz de potenciar la diferenciación y proliferación de células progenitoras hematopoyéticas y de activar determinadas células maduras del sistema hematopoyético. Por lo tanto, el G-CSF obtenido mediante el  
40 procedimiento de la presente invención es adecuado para tratar indicaciones donde la administración de G-CSF es ventajosa. Se entiende que la expresión “G-CSF humano biológicamente activo” también incluye mutantes y modificaciones del G-CSF, cuyas secuencias de aminoácidos están alteradas comparadas con la secuencia de tipo natural, pero que tiene actividades biológicas similares que el G-CSF de tipo natural. Lo mismo se aplica a los conjugados de G-CSF. Típicamente, el G-CSF es G-CSF recombinante humano. Preferiblemente, el G-CSF que se  
45 va a purificar es metionil (Met) G-CSF humano producido en células de *E. coli*.

**[0023]** La expresión “una isoforma menos hidrófoba”, como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación/fracción de G-CSF que tiene la misma masa, punto isoeléctrico y cartografía peptídica idéntica incluyendo los puentes disulfuro, puesto de manifiesto, por ejemplo, por degradación de Edman y geles de enfoque  
50 isoeléctrico (IEF) o por espectrometría de masas. Además, ni los aductos de lípidos ni el isoaspartato son detectables por espectrometría de masas. La isoforma de G-CSF menos hidrófoba se puede caracterizar por su diferencia en el espectro de CD comparado con el G-CSF de referencia en el intervalo UV cercano (DO 260-320 nm) que indica un contenido mayor de estructuras de hélice  $\alpha$  (66% para la isoforma y 52% para el G-CSF de referencia). Además, la diferencia en hidrofobicidad del G-CSF objeto y su isoforma se puede demostrar por su RP-HPLC  
55 analítica a 60°C. Estas diferencias son las razones por las que la forma menos hidrófoba eluye en una fracción más temprano comparado con el G-CSF de referencia en una cromatografía de RP-HPLC, que se aplica a 60°C. Por lo tanto, la isoforma de G-CSF se puede definir por sus propiedades distintas de ser menos hidrófoba y eluir en distintas fracciones en una RP-HPLC aplicada a 60°C, en la que la isoforma del G-CSF eluye antes que el pico principal del G-CSF objeto; véase la figura 3. Las técnicas para caracterizar las muestras comprenden SDS-PAGE,

IEF, UV, CD, espectroscopía de fluorescencia y RMN; véase también antes y los ejemplos. Considerando toda la información junta, la isoforma del G-CSF menos hidrófoba se explica mejor como una variante de plegado que tiene una estructura 3D ligeramente alterada, que se considera como una forma mal plegada. Su eliminación debería conducir a fármacos más eficaces y seguros.

5

**[0024]** Como se ha mencionado, la preparación de G-CSF obtenida por el procedimiento de la presente invención, carece sustancialmente de la isoforma del G-CSF menos hidrófoba. La expresión “carece sustancialmente” de una isoforma del G-CSF menos hidrófoba o “con una cantidad minimizada” de la isoforma del G-CSF menos hidrófoba, significa que la preparación de G-CSF de la presente invención contiene típicamente  
10 menos de 5% de la isoforma del G-CSF menos hidrófoba, preferiblemente menos de 1%, ventajosamente menos de 0,2% de las isoformas menos hidrófobas del G-CSF.

**[0025]** De acuerdo con la presente invención, la expresión “cuerpos de inclusión” se refiere a agregados compactos, insolubles, intracelulares, de proteínas expresadas recombinantes plegadas de forma incorrecta o  
15 plegadas de forma parcialmente correcta, que se pueden aislar como una fracción de partículas por centrifugación de los lisatos celulares.

**[0026]** El término “solubilización” como se usa en el presente documento, significa que el G-CSF que forma cuerpos de inclusión queda disuelto por tratamiento con un desnaturalizante, p. ej., un agente caotrópico y un agente  
20 de reducción, por el cual interacciones inter e intramoleculares, que no están presentes en la proteína natural, se rompen, resultando así una dispersión monomérica de G-CSF recombinante.

**[0027]** De acuerdo con la presente invención, la expresión “agente desnaturalizante” se refiere a un agente, que es capaz de desplegar una proteína, produciendo una reducción o pérdida de la conformación de la proteína  
25 natural. Para usar en los tampones de solubilización, los agentes caotrópicos o desnaturalizantes adecuados son urea, guanidina-HCl, arginina, tiocianato sódico, un pH extremo (ácidos o bases diluidos), detergentes (p. ej., SDS, Sarkosyl®), sales (cloruro, nitratos, tiocianatos, tricloroacetato), la derivatización química (sulfitolisa, reacciones en bases con anhídrido citracónico), disolventes (2-amino-2-metil-1-propanol o alcoholes, DMSO, DMS) o resinas de intercambio aniónico fuerte, como por ejemplo Q-Sepharose.

30

**[0028]** Las concentraciones adecuadas de urea son 1-9 mol/l, preferiblemente 5-9 mol/l. Las concentraciones adecuadas de guanidina-HCl son 1-8 mol/l, preferiblemente 4-8 mol/l. En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, el agente desnaturalizante es guanidina-HCl, en donde preferiblemente la concentración de  
35 guanidina-HCl es 6,0 mol/l; véase también los ejemplos.

35

**[0029]** Típicamente, el tampón de solubilización en el procedimiento de la presente invención contiene un agente de reducción además del agente desnaturalizante. Los agentes de reducción adecuados son glutatión reducido (GSH), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), cisteína, β-mercaptoetanol. Preferiblemente, el agente de  
40 reducción en el procedimiento de la presente invención es DTT. En una realización de la presente invención, la concentración del agente de reducción en el tampón de solubilización es de 1 a 100 mmol/l, preferiblemente de 1 a 10 mmol/l, y se puede ajustar de acuerdo con los ejemplos. De acuerdo con la presente invención, un componente de tampón adecuado del tampón de solubilización puede ser el tris(hidroximetil)aminometano o fosfato, que debe presentar un valor de pH básico, con el fin de permitir la reducción de los puentes disulfuro.

**[0030]** Con el fin de asegurar una solubilización eficaz y completa, se requiere una relación adecuada de cuerpos de inclusión y el tampón de solubilización. De acuerdo con la presente invención, se usan de 10 a 100 ml de  
45 tampón de solubilización por gramo de cuerpos de inclusión, preferiblemente de 1 a 80 ml, lo más preferiblemente de 1 a 40 ml, más preferiblemente > 20 ml/g y típicamente > 30 ml por gramo de cuerpo de inclusión.

**[0031]** Además, en una realización de la presente invención, se añade un agente quelante, por ejemplo, etilendiaminatetraacetato (EDTA) o dimetilaminoetanol (DMAE) al tampón de solubilización y/o de replegado para  
50 formar complejos con los iones metálicos en solución acuosa. Una vez unidos al EDTA, estos iones metálicos tienden a no interferir con la acción de los detergentes, o tienen la capacidad de oxidar el agente de reducción. Además, las proteasas dependientes de metal son inhibidas por los agentes quelante. En una realización preferida  
55 de la presente invención, el tampón de solubilización y/o el tampón de replegado contienen EDTA disódico, preferiblemente en una concentración entre 0,5 y 10 mM.

**[0032]** De acuerdo con la presente invención, para asegurar una solubilización completa y eficaz, el tiempo de solubilización en el procedimiento de la presente invención es de 1 a 10, preferiblemente de 4 a 8, lo más

preferiblemente  $6 \pm 1$  horas o de 5,5 a 6,5 horas. En una realización preferida adicional, el procedimiento de solubilización se lleva a cabo a temperatura ambiente por encima de  $10^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente entre  $15-30^{\circ}\text{C}$ , lo más preferiblemente a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , es decir, a la misma temperatura o similar que el procedimiento de replegado; véase antes y los ejemplos.

5

**[0033]** De acuerdo con la presente invención, deben eliminarse los residuos de células hospedantes del G-CSF solubilizado, para asegurarse que no interfieren sustancias molestas con el procedimiento de replegado. Por lo tanto, el solubilizado preferiblemente se somete a filtración antes de diluirlo con el tampón de replegado. Por ejemplo, la proteína G-CSF solubilizada se separa de los residuos de la célula hospedante, proteínas desplegadas

10

agregadas, dímeros, multímeros y/o proteína desplegada de G-CSF por filtración a través de un filtro de  $1,5 \mu\text{m}$ .

**[0034]** La formación de enlace disulfuro intramolecular en la proteína G-CSF se promueve por la adición de un tampón de replegado que comprende una pareja de oxidorreducción. Una "pareja de oxidorreducción" se refiere a mezclas de reactivos de tipo tiol reducidos y oxidados e incluye, por ejemplo, glutatión reducido/oxidado

15

(GSH/GSSG), cisteína/cistina, cisteamina/cistamina, DTT/GSSG y DTE/GSSG, así como mezclas de uno cualquiera de los componentes de las parejas de oxidorreducción mencionadas; véase, p. ej., Clark, *Cur. Op. Biotech.* 12 (2001), 202-207. En una realización de la presente invención, la pareja de oxidorreducción es GSH/GSSG, en donde la concentración del glutatión reducido y oxidado es  $0,1$  a  $20 \text{ mmol/l}$ , preferiblemente de  $0,5$  a  $10 \text{ mmol/l}$ , lo más preferiblemente de  $0,2$  a  $10 \text{ mmol/l}$  cada uno; véase también los ejemplos.

20

**[0035]** El replegado con el fin de obtener el G-CSF biológicamente activo se puede llevar a cabo en tampones a un pH neutro o básico. Preferiblemente, el procedimiento de replegado se lleva a cabo a un valor de pH de aproximadamente 8. Los tampones de replegado pueden incluir otros aditivos para potenciar el replegado, p. ej., L-arginina o hidrocloreuro de arginina ( $0,4-1 \text{ mol/l}$ ); PEG; concentraciones bajas de desnaturalizantes tales como urea ( $1-2 \text{ mol/l}$ ) y guanidina-HCl ( $0,5-1,5 \text{ mol/l}$ ); y detergentes (p. ej., Chaps, SDS, CTAB, lauril-maltósido, Polisorbato 80/Tween 80®, y Triton X-100®). En una realización preferida de la presente invención, el tampón de replegado contiene además arginina-HCl.

25

**[0036]** Entre las estrategias de replegado conocidas, la dilución es todavía la metodología más sencilla. En aplicaciones a escala industrial se usa habitualmente para el replegado de proteínas recombinantes expresadas en cuerpos de inclusión. Típicamente, la dilución se lleva a cabo en una etapa mezclando/diluyendo la solución que contiene la proteína solubilizada con un diluyente que contiene un agente solubilizante en una cantidad necesaria para alcanzar el nivel de dilución óptimo. Cuando la concentración del agente solubilizante está por debajo de un determinado nivel umbral, la proteína empieza a recuperar su conformación tridimensional biológicamente activa.

Dependiendo de la proteína específica y de las condiciones de plegado elegidas, el replegado empieza en milisegundos a segundos. En su fase de rotura inicial, la proteína es muy susceptible a la agregación. Para minimizar la agregación, la concentración de proteína se debe mantener bastante baja, preferiblemente por debajo de  $2 \text{ mg/ml}$ . Después de esta fase de replegado inicial, la proteína forma una estructura más compacta y finalmente, la conformación de la proteína natural que es menos susceptible a la agregación. El replegado completo, incluyendo la formación de enlaces disulfuro, se puede conseguir para el G-CSF en horas. Con el fin de asegurar una renaturalización eficaz y completa, es necesaria una relación adecuada de solubilizado con tampón de replegado. De acuerdo con la presente invención, el solubilizado se diluye con tampón de replegado en una relación de  $1$  a  $100$ , preferiblemente de  $1$  a  $40$ , lo más preferiblemente de  $1$  a  $20$ ; véanse también los ejemplos.

30

**[0037]** La expresión "diluir con tampón de replegado" como se usa de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, en principio incluye diluir el solubilizado en una cantidad predeterminada de tampón de replegado y verter el tampón de replegado en la muestra de solubilizado. Preferiblemente, el solubilizado se añade al tampón de replegado con agitación. En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento de dilución dura aproximadamente una hora.

45

**[0038]** Como se ha mencionado antes, en el procedimiento de la presente invención, el procedimiento de replegado en un sistema de oxidorreducción adecuado se puede llevar a cabo a temperaturas ambiente por encima de  $10^{\circ}\text{C}$  en menos de medio día y ventajosamente a temperatura ambiente, es decir, a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en  $3$  a  $4$  horas. La temperatura ambiente puede variar entre  $10^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}$ , y preferiblemente es entre  $15^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente entre  $17^{\circ}\text{C}$  y  $23^{\circ}\text{C}$ , y particularmente preferido entre  $19^{\circ}\text{C}$  y  $21^{\circ}\text{C}$ . El tiempo para el replegado puede orientarse hacia las condiciones ilustradas en los ejemplos. Por lo tanto, aunque el procedimiento de replegado a aproximadamente  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  dura aproximadamente de  $3$  a  $4$  horas, se puede usar el mismo marco de tiempo o una o dos horas más o menos dependiendo de si el procedimiento de replegado se lleva a cabo por debajo de  $18^{\circ}\text{C}$  o por encima de  $22^{\circ}\text{C}$ . En cualquier caso, la duración del procedimiento de replegado es menor de  $12$  horas.

50

55

**[0039]** Usando el procedimiento de la presente invención, 70% del contenido total de proteína G-CSF de cuerpos de inclusión se puede replegar en G-CSF biológicamente activo.

5 **[0040]** El procedimiento de replegado se puede detener disminuyendo el pH del tampón de replegado a un pH ácido. En una realización preferida de la presente invención, se usa ácido acético para reducir el pH de 3,0 a 6,5, preferiblemente de 3,5 a 5,5, lo más preferiblemente a 4,0.

10 **[0041]** Una vez que la proteína G-CSF se ha replegado, se puede añadir un surfactante o tensioactivo a la muestra de proteína. En una realización preferida de la presente invención, se añade un detergente no iónico, preferiblemente polisorbato 20 u 80, lo más preferiblemente polisorbato 80 (Tween 80®) a la muestra de la proteína G-CSF replegada en una concentración final de 0,001 a 1%, preferiblemente de 0,05 a 0,1%, lo más preferiblemente a una concentración final de 0,05 a 0,06% o de 0,01%, dependiendo del uso posterior del G-CSF.

15 **[0042]** En muchos casos, será ventajoso someter el conjunto de replegado a filtración antes del procesamiento adicional con el fin de separar partículas de alto peso molecular, que a menudo son agregados de proteínas formados durante el plegado. En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la solución de proteína replegada se filtra a través de una cascada de filtros, preferiblemente a través de una cascada de filtros de 10 y 1,2  $\mu\text{m}$ . Después de filtración, la solución se puede almacenar en una etapa de reposo, en donde  
20 se prefieren temperaturas ambiente como  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ; véase también la figura 1 y la tabla 1 en el ejemplo 6 adjunto en la presente invención.

**[0043]** Con el fin de lograr mayor concentración de producto de la preparación de G-CSF obtenida después de replegado, la proteína G-CSF se puede dializar o diafiltrar para separar la pareja de oxidorreducción y/u otros  
25 componentes de tampón no deseados. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento de filtración en el presente documento para separar los residuos celulares, proteínas contaminantes insolubles y precipitado de ácido nucleico. Esta etapa proporciona un medio conveniente para separar de forma económica los residuos celulares, proteínas contaminantes y precipitado. En la elección de un filtro o un esquema de filtros, es necesario asegurar un funcionamiento robusto en el caso de que se produzcan cambios o variaciones corriente arriba. Mantener el  
30 equilibrio entre un buen rendimiento de clarificación y rendimiento de la etapa requiere la investigación de una gran variedad de tipos de filtros con diferentes medios de filtración. Los tipos de filtros adecuados pueden usar filtros de celulosa, fibras de celulosa regenerada, fibras de celulosa combinadas con ayudantes de filtración inorgánicos (p. ej., tierra de diatomeas, perlita, sílice pirolizada), fibras de celulosa combinadas con ayudantes de filtración inorgánicos y resinas orgánicas, o cualquier combinación de los mismos, y filtros poliméricos (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a nylon, polipropileno, polietersulfona) para lograr la separación eficaz. En una realización, la  
35 filtración, p. ej., una etapa de ultra y diafiltración, se lleva a cabo usando una membrana de UF de 5-10 kDa y aproximadamente 8x intercambio de tampón, donde el tampón se intercambia por acetato Na y un detergente no iónico, p. ej., polisorbato 80 a un pH 4.

40 **[0044]** La diafiltración es un procedimiento de fraccionamiento de lavado de moléculas más pequeñas a través de una membrana, dejando la molécula más grande de interés en el retenido. Es una técnica conveniente y eficaz para eliminar o intercambiar sales, eliminando detergentes, separando moléculas libres de unidas, eliminando materiales de bajo peso molecular, o cambiando rápidamente el entorno iónico o pH. El procedimiento típicamente usa una membrana de microfiltración con el fin de separar un producto de interés de la suspensión mientras se  
45 mantiene la concentración de la suspensión como una constante.

**[0045]** Como se ha descrito antes, la etapa de purificación cromatográfica esencial en el procedimiento de la presente invención comprende cromatografía de fase inversa (RP), en particular una etapa de cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) a una escala industrial. Mediante la RP-HPLC analítica a  $60^\circ\text{C}$ , se puede  
50 ver la isoforma del G-CSF menos hidrófoba contaminante en la muestra de G-CSF obtenida después del procedimiento de replegado, que se caracteriza por el contenido de hélice  $\alpha$  de 66% y el perfil de elución mostrado en la figura 3. Como se ha mencionado en la técnica anterior, se han llevado diferentes etapas de cromatografía de intercambio iónico o hidrófoba para purificar el G-CSF, mientras que no se ha contemplado la RP-HPLC como una etapa purificante a una escala industrial.

55 **[0046]** Los medios y procedimientos para llevar a cabo la cromatografía de fase inversa (RP) son bien conocidos para el experto en la materia. Preferiblemente, la etapa de cromatografía de fase inversa (RP) es cromatografía de fase líquida de alta presión, de fase inversa (RP-HPLC). Típicamente, la RP-HPLC se lleva a cabo con resinas que contienen grupos metilo, butilo, fenilo, propilo y/u octilo como grupos funcionales y usando sistemas

de fase móvil que contienen disolvente orgánico. En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la RP-HPLC se lleva a cabo con un material de cromatografía de fase inversa C4 disponible en el comercio. Los materiales de fase inversa de ejemplo son: Vydac 214TPB1015®, C4 disponible en Grace Davison; Daisopak SP-300-15-C4-BIO® disponible en DAISO Fine Chem. GmbH; YMC Gel Butyl Sphärisch C4, 15µ, 300A 5 disponible en YMC Europe GmbH; Jupiter 15µ®, C4, 300A disponible en Phenomenex.

**[0047]** En el procedimiento de la presente invención, se usa preferiblemente una resina cromatográfica Jupiter C4® en la RP-HPLC y se usa una resina cromatográfica Source 15 RPC® o Source 30 RPC® (proveedor GE Healthcare) en la cromatografía de RP. Jupiter C4® consiste en partículas de gel de sílice, cuyas superficies llevan 10 cadenas de alquilo C4. De acuerdo con la presente invención, se usa lo más preferiblemente una resina cromatográfica Jupiter C4®; véanse también los ejemplos.

**[0048]** La separación de G-CSF de las impurezas proteínicas se basa en diferencias en la fuerza de las interacciones hidrófobas. La elución se lleva a cabo con un disolvente menos polar que el agua, p. ej., un gradiente 15 de acetonitrilo, etanol o metanol en agua, preferiblemente usando acetonitrilo en presencia de ácido trifluoroacético diluido. Así, se puede separar la isoforma del G-CSF menos hidrófoba del G-CSF, siendo eluidos en diferentes fracciones. Normalmente, la isoforma menos hidrófoba de la preparación de G-CSF total eluye en una fracción más temprana que el G-CSF de referencia. El G-CSF y la isoforma del G-CSF menos hidrófoba pueden eluir con un gradiente lineal de un disolvente orgánico, por ejemplo, de 0 a 90% de acetonitrilo en agua, es decir, agua para 20 inyección (API) y que contiene aproximadamente 0,1% de TFA. Preferiblemente, la RP-HPLC se lleva a cabo como se describe en los ejemplos. El eluato se recoge preferiblemente en viales previamente cargados con tampón que contiene polisorbato 80; véase también antes y los ejemplos.

**[0049]** Como se ha explicado antes y se ilustra en los ejemplos, en el procedimiento de la presente invención 25 la etapa de cromatografía de RP está precedida por una cromatografía de intercambio catiónico. Por lo tanto, el G-CSF se purifica usando una sola cromatografía de intercambio catiónico, con el fin de separar todos los contaminantes como proteínas de la célula hospedante, en particular endotoxinas y ADN de la célula hospedante.

**[0050]** La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) se lleva a cabo después de que el G-CSF replegado 30 se ha ultra y diafiltrado. Como se ilustra en los ejemplos, se lleva a cabo una etapa de cromatografía de CEX con un material seleccionado (CM Sepharose® FF) que permite caudales particularmente altos y buena recuperación del producto. Debido al hecho de que tiene carga positiva en un entorno ácido, el G-CSF es un ligante fuerte y eluye con un gradiente lineal de cloruro sódico a un pH ácido en un volumen pequeño en una concentración alta en el tampón deseado. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la etapa de CEX se usa antes de la cromatografía de 35 RP, en particular antes de una RP-HPLC, para el intercambio de tampón, concentración de G-CSF y separación de los agregados de G-CSF. Los medios y procedimientos para llevar a cabo la cromatografía de intercambio catiónico son bien conocidos por el experto en la materia; véase también la técnica anterior citada en la sección de antecedentes, antes o el proveedor GE Healthcare. Por ejemplo, se pueden usar matrices convencionales disponibles en el comercio. En el presente documento, el G-CSF se une a la matriz de intercambio catiónico en un 40 intervalo de pH específico debido a su carga total positiva, mientras que la mayoría de las sustancias contaminantes como ácidos nucleicos, lipopolisacáridos y proteínas procedentes de las células hospedantes, así como isómeros iónicos de G-CSF y formas alteradas del G-CSF que tienen diferentes valores de pH, no son capaces de unirse y aparecen en el flujo que pasa a través o se separan mediante lavado. Las matrices de intercambio catiónico adecuadas incluyen, pero no se limitan a carboximetil (CM) celulosa, AG 50 W, Bio-Rex 70®, carboximetil (CM) 45 Sephadex®, sulfopropil (SP) Sephadex, carboximetil (CM) sepharose CL-6B®, CM sepharose HP®, Hyper D-S ceramic® (Biosepra) y sulfonato (S) Sepharose®, SP Sepharose FF®, SP Sepharose HP®, SP Sepharose 15 XL®, CM Sepharose FF®, TSK gel SP 5PW®, TSK gel SP-5PW-HR®, Toyopearl SP-650M®, Toyopearl SP-650S®, Toyopearl SP-650C®, Toyopearl CM-650M®, Toyopearl CM-650S® etc. matrices de sulfopropilo, en particular los productos SP Sepharose XL® y SP Sepharose FF® (flujo rápido) y S-Sepharose FF®, disponible en Amersham 50 Biosciences, Freiburg, Alemania (ahora GE Healthcare). En una realización, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico de sulfopropilo. En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la cromatografía de intercambio iónico es cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y se lleva a cabo con CM-Sepharose FF®; véase también los ejemplos 6 y 7.

55 **[0051]** Los tampones adecuados para la cromatografía de intercambio catiónico incluyen tampones de maleato, malonato, citrato, lactato, ácido acético, acetato, fosfato, REPES, Bistris y Bicina. En una realización preferida, se usa ácido acético como un componente del tampón. Preferiblemente, la concentración del tampón está en el intervalo entre 10 y 100 mM, preferiblemente entre 20 mM y 50 mM. De acuerdo con la presente invención, también se incluye un tensioactivo en el tampón, preferiblemente polisorbato 20 u 80, lo más preferiblemente se usa

polisorbato 80; véase también antes. La purificación de la preparación de G-CSF se lleva a cabo usando un valor de pH del tampón no superior a 6,0, preferiblemente no superior a 5,5. Posteriormente, normalmente se lleva a cabo el lavado de la columna en la que está unido el G-CSF mediante cinco volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado, compuesto de ácido acético, polisorbato 80, a pH 5,5.

5

**[0052]** El G-CSF puede eluir de la columna mediante la alteración del tampón, en el caso de la cromatografía de intercambio catiónico mediante un aumento del valor de pH o un aumento de la fuerza iónica. Preferiblemente, la elución se realiza mediante aumento de la fuerza iónica, preferiblemente usando un gradiente lineal de cloruro sódico. Las condiciones adecuadas para la cromatografía de intercambio catiónico se pueden tomar de la bibliografía relevante, como por ejemplo, el manual "Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods" de Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania (ahora GE Healthcare), 2002, y el ejemplo 7.

10

**[0053]** En una realización preferida particular del procedimiento de la presente invención, el procedimiento de purificación comprende:

15

- (i) una etapa de ultra/diafiltración;
- (ii) la etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEX);
- (iii) una etapa de microfiltración;
- (iv) la etapa de cromatografía de fase inversa (RP); y
- (v) una etapa de ultra/diafiltración.

20

**[0054]** Esta realización también se muestra en la figura 1 y se ilustra en los ejemplos. En la primera etapa (i) de ultra/diafiltración, el tampón se intercambia por acetato Na, polisorbato 80 a un pH ácido. Finalmente, la solución se filtra a través de una cascada de filtros de 10 y 1,2  $\mu\text{m}$ . Después de la filtración, la solución se puede almacenar a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (etapa de reposo). Las etapas de purificación cromatográfica están diseñadas para separar los componentes del cultivo celular, impurezas de células bacterianas e impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto y para asegurar el contenido de G-CSF uniforme para procedimientos posteriores. El enriquecimiento del G-CSF altamente purificado de acuerdo con la presente invención, se lleva a cabo en las posteriores etapas de filtración y cromatográfica; véase también la figura 1. En una realización adicional del procedimiento de la presente invención, la preparación de G-CSF obtenida en la etapa (ii) de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) se somete a una etapa (iii) de microfiltración, en la que se separan las impurezas solubles del homogeneizado celular. Con el fin de conseguir una preparación de G-CSF pura sin la forma menos hidrófoba, se lleva a cabo además la etapa (iv) de RP-HPLC. Posteriormente, se usa una etapa final de ultra/diafiltración como etapa de acabado final y para formular el G-CSF en su tampón deseado. Esto satisface la necesidad de obtener un volumen final pequeño de la preparación, es decir, la concentración de G-CSF en la mezcla de la RP-HPLC debe aumentar mucho, y de formular la mezcla de la RP-HPLC en un tampón adecuado para estabilizar más el G-CSF purificado.

25

30

35

**[0055]** Después de llevar a cabo las diferentes etapas de purificación de acuerdo con la presente invención, la pureza del G-CSF es alta, alcanzando una pureza que supera al menos 98% o incluso 99% de la proteína total, determinado por RP-HPLC y electroforesis en gel SDS-PAGE, respectivamente; véase también la figura 2. Además, el contenido de dímero/multímero de la preparación de G-CSF purificada de acuerdo con la presente invención, típicamente es <2%, preferiblemente <1%, mientras que la contaminación restante del ADN de la célula hospedante es  $\leq 100$  ppm o  $\leq 200$  ppm de proteína de la célula hospedante, respectivamente. Además, en una realización preferida, la contaminación por endotoxinas es  $\leq 5$  UE/mg, la biocarga total es < 1 UFC/10 ml. Además, el contenido final del ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo que queda es  $\leq 30$  ppm y  $\leq 410$  ppm, respectivamente.

40

45

**[0056]** Debido a la alta pureza y homogeneidad de la preparación de G-CSF obtenida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el G-CSF es particularmente adecuado para la derivatización adicional. Por lo tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende además la modificación química del G-CSF obtenido de acuerdo con dicho procedimiento, por ejemplo mediante unión covalente de un polímero soluble en agua al G-CSF, tal como polietilenglicol (PEG). La conjugación de polietilenglicol (PEG) a proteínas es una tecnología importante para producir moléculas con duración prolongada en el cuerpo humano. La unión de un resto de PEG de 10 a 30 kDa al G-CSF puede tener la capacidad de (1) prevenir la precipitación de proteína haciendo a las proteínas más solubles, y (2) disminuir la tasa de agregación con respecto al G-CSF, debido al hecho de que la solubilidad del PEG-G-CSF es mediada por la solvatación favorable de moléculas de agua alrededor del grupo PEG.

50

55

**[0057]** La expresión "soluble en agua" se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los polímeros solubles en agua de ejemplo incluyen péptidos, sacáridos, poliéteres, poliaminas, poli(ácidos

carboxílicos) y similares. La cadena principal de polímero del polímero soluble en agua puede ser polietilenglicol (es decir, PEG).

**[0058]** La expresión "polímero soluble en agua" unido covalentemente al G-CSF se refiere a un conjugado entre un polipéptido de G-CSF y al menos un polímero, en el que el conjugado está formado por una unión covalente entre un grupo funcional del polímero y un grupo funcional del polipéptido. Los conjugados pueden comprender uno o más restos poliméricos. Varios restos poliméricos o polímeros adecuados incluyen polialquilenglicoles, tales como PEG y PPG, hidroxialquil-almidones, tales como hidroxietil-almidones (HES). En una realización preferida, dicho polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG). Dicho G-CSF pegilado incluye G-CSF monopegilado y G-CSF modificado con dos o más moléculas de PEG. En una realización preferida adicional, dicho polímero unido covalentemente es de 10 a 30 kDa, preferiblemente 20 kDa. Los procedimientos de modificación química del G-CSF, en particular la pegilación, son bien conocidos para el experto en la materia y se describen, p. ej., en el documento WO2008/124406.

**[0059]** El procedimiento para la producción de una composición farmacéutica de G-CSF recombinante y aditivos farmacéuticamente aceptables tales como tampones, sales y estabilizantes, comprende el procedimiento de obtener el G-CSF de la presente invención como se ha descrito antes. El G-CSF obtenido de acuerdo con la presente invención se puede (i) usar directamente o (ii) procesar más, por ejemplo pegilar como se ha definido antes o véase el documento WO2008/124406, y después almacenar en forma de un liofilizado o en forma líquida.

**[0060]** El G-CSF como un ingrediente activo de una composición farmacéutica se puede administrar en un procedimiento típico por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intraesternal, transdérmica, nasal, inhalante, tópica, rectal, oral, intraocular o subcutánea. El procedimiento de administración no está particularmente limitado, pero se prefiere una administración no oral, y es más preferible la administración subcutánea o intravenosa.

**[0061]** Los adyuvantes adecuados en las formulaciones del G-CSF expresado de forma recombinante son, por ejemplo, estabilizantes como azúcares y alcoholes de azúcares, aminoácidos y tensioactivos como, por ejemplo, el polisorbato 20/80, así como sustancias tampón adecuadas. Para realizaciones adicionales de las formulaciones de G-CSF de la presente invención, véase, p. ej., los documentos WO2009/027437 y WO/2008/124406. De ejemplos para las formulaciones véase también los productos comerciales Neupogen® y Granocyte en la "ROTE LISTE 2004". En una realización preferida de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el G-CSF biológicamente activo purificado se formula en ácido acético 10 mM a un pH de 4,0, polisorbato 80 al 0,0025% y sorbitol 50 g/l.

**[0062]** La actividad del G-CSF obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se puede determinar por un bioensayo y comparar con la actividad de un G-CSF de referencia disponible en el comercio. Para este fin, la línea de células de ratón NFS-60, que es sensible al G-CSF, se cultiva en medio RPMI 1640 (Bachern, Heidelberg, Alemania), que contiene carbonato sódico 1,5 g/l, glucosa 4,5 g/l, Hepes 10 mM y piruvato sódico 1,0 mM y complementado con glutamina 2 mM, FCS al 10%, 2-mercaptoetanol al 0,05 mM y G-CSF 60 ng/ml. Para el ensayo de actividad, las células se lavaron dos veces en medio sin G-CSF, se pusieron en placas de 96 pocillos en una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo, y se incubaron durante 3 días a 37°C y 4,5% de CO<sub>2</sub>, con concentraciones variables de G-CSF purificado y el de referencia, respectivamente. Posteriormente, las células se tiñeron con reactivo XTT y se midió la absorción a 450 nm en un lector de placas de microvaloración.

**[0063]** El G-CSF purificado obtenido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se caracteriza por una actividad biológica de 80-125% con respecto al patrón de referencia de la OMS en el ensayo de proliferación de NFS-60.

**[0064]** Las composiciones farmacéuticas obtenidas por el procedimiento de la presente invención se caracterizan por ser estériles y estar exentas de pirógenos. Como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" incluye formulaciones para uso humano y veterinario. Los procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están al alcance del experto en la materia, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) y versión actualizada Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por la University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472.

**[0065]** Otra bibliografía relativa a cualquiera de los materiales, procedimientos usos y compuestos que se van a usar de acuerdo con la presente invención, se puede obtener de bibliotecas públicas y bases de datos, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede usar la base de datos pública "Medline", que se encuentra

en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica y/o la Biblioteca Nacional de Medicina en los Institutos Nacionales de la Salud. Los expertos en la materia conocen bases de datos adicionales y direcciones web, tales como las del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que es parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), y también se pueden obtener usando motores de búsqueda de internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 5 352-364, se da una revisión de la información de patentes de biotecnología y un estudio de fuentes relevantes de la información de patente útil para la búsqueda retrospectiva y para la información actualizada.

**[0066]** La descripción anterior describe en general la presente invención. Salvo que se exponga otra cosa, un término usado en el presente documento tiene la definición que proporciona el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado 2000 y reimpresión 2003, ISBN 0 19 850673 2.

**[0067]** Se puede obtener una comprensión más completa con referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento solo con fines de ilustración, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente invención.

### Ejemplos

**[0068]** Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia (p. ej., genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación, química de proteínas y bioquímica). Se usan técnicas estándar para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. - y la versión completa titulada *Current Protocols in Molecular Biology*, y procedimientos químicos).

#### Ejemplo 1: Material de partida

**[0069]** El G-CSF se expresa en 03-221C-pHIP, un vector de expresión derivado de pBR322. La cepa hospedante de *E. coli* BNN93 se transformó con este plásmido para la producción. BNN93 es un derivado de *E. coli* K12. La síntesis de G-CSF es regulada por un promotor lambda, que es inducido por un cambio de temperatura de 30°C a 42°C, produciendo un exceso de expresión de G-CSF insoluble primario en cuerpos de inclusión.

#### Ejemplo 2: Fermentación

**[0070]** El contenido de un vial de banco de células de trabajo (BCT) diluido con 1.000 ml de medio complejo sin kanamicina se usa para generar el "banco de células de trabajo diluido" para la prefermentación. La dilución tiene lugar en una campana de flujo de aire laminar (CFL) de calidad A en una sala limpia de calidad B. El precultivo se transfiere de forma aseptica directamente al prefermentador de 20 litros. El cultivo se inicia a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  con agitación a 250 rpm durante 6 a 12 horas hasta que se alcanza una  $\text{DO}_{600}$  de 0,3 a 0,6. El caldo de fermentación completo se transfiere a un fermentador de 1.000 litros previamente cargado con medio complejo sin kanamicina. El cultivo se incubaba a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  con agitación  $\geq 200$  rpm para asegurar una  $\text{pO}_2 \geq 30\%$  y pH de  $20 \pm 0,2$ , durante 9 a 11 horas hasta que se alcanza una  $\text{DO}_{600}$  de 5 a 7.

#### Ejemplo 3: Expresión de G-CSF en cuerpos de inclusión

**[0071]** La expresión de G-CSF es inducida por aumento de la temperatura a 42°C y posterior incubación durante 6,75 a 7,25 horas con agitación a  $\geq 200$  rpm para asegurar una  $\text{pO}_2 \geq 30\%$ . Las células bacterianas se recogen a temperatura ambiente mediante un separador de disco a 150 l/h, dando como resultado aproximadamente 100 litros de suspensión celular concentrada.

#### Ejemplo 4: Aislamiento de cuerpos de inclusión

**[0072]** La suspensión de células concentrada se diluye hasta 200 litros y se homogeneiza a 500 bar por tres pasos sucesivos en fosfato Na 20 mM, pH 8,0 con 300 l/h usando un homogeneizador de alta presión. Los cuerpos de inclusión liberados posteriormente se recogen por centrifugación en cuba tubular a 17.000 rpm con 50 l/h. Después de una resuspensión en fosfato Na 18 mM, Triton X-100 al 2% (p/v), EDTA 5 mM, pH 8,0 durante 10 minutos, los cuerpos de inclusión se centrifugan de nuevo a 17.000 rpm con 50 l/h. El sedimento resultante se lava con fosfato Na 18 mM a pH 8,0 durante 10 minutos, seguido de otra centrifugación a 17.000 rpm con 50 l/h. El

sedimento se vuelve a suspender en agua para inyección (API) y se dispensa en tres partes alícuotas iguales. Después los cuerpos de inclusión se almacenan a  $-15^{\circ}\text{C}$  (etapa de reposo).

#### Ejemplo 5: Solubilización de los cuerpos de inclusión y replegado de G-CSF

5

**[0073]** Después de descongelar un tercio de la cantidad total de cuerpos de inclusión obtenidos de una fermentación de 1.000 litros, los cuerpos de inclusión se solubilizan por incubación en Tris 25 mM, GuHCl 6 M, EDTA 1 mM, pH 8,0 durante 5,5 a 6,5 horas con agitación, seguido de filtración con un filtro de 1,5  $\mu\text{m}$ , p. ej., filtración profunda (filtración por clarificación). El G-CSF después se repliega por dilución en Tris 25 mM, arginina 0,8 M, glutatión 1 mM (reducido), glutatión 1 mM (oxidado), EDTA 10 mM, pH 8,0 a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A esto le sigue la adición de polisorbato 80 a una concentración final de 0,01% (p/v) con ajuste a pH 4,0 con ácido acético. Después del replegado, se lleva a cabo una etapa de ultrafiltración y diafiltración (corte de exclusión de peso molecular de 10 kDa, 8,4  $\text{m}^2$ , aproximadamente 8x intercambio de tampón) donde el tampón se intercambia por acetato Na 10 mM, polisorbato 80 al 0,01% (p/v), pH 4,0. Finalmente, la solución se filtra a través de una cascada de filtros de 10 y 1,2  $\mu\text{m}$ . Después de la filtración, la solución se almacena a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (etapa de reposo).

#### Ejemplo 6: Purificación del G-CSF

**[0074]** Las etapas de purificación cromatográfica están diseñadas para separar los compuestos del cultivo celular, impurezas de células bacterianas, impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto, y para asegurar el contenido uniforme del G-CSF para la preparación de una formulación farmacéutica o para la posterior pegilación; véanse los siguientes ejemplos. En la figura 1 se da un resumen del procedimiento de la presente invención y se describe en la tabla 1 a continuación. Se proporciona una descripción más detallada para llevar a cabo la cromatografía de intercambio catiónico y de RP-HPLC en el ejemplo 7 y tablas 2 y 3.

25

Tabla 1: Composiciones de tampones usados en las etapas del procedimiento indicadas

<b>Etapas del procedimiento</b>	<b>Tampón/solución</b>
<b>Homogeneización</b>	
Tampón de homogeneización	Fosfato sódico 20 mM, pH 8,0,
Presión de homogeneización	500 bar
<b>Solubilización de CI</b>	
Tampón de solubilización	Tris 25 mM, pH 8,0, Guanidina-HCl 6 M; Titriplex III 1 mM Adición de DTT a 5 mM;
ml de tampón de solubilización / por gramo de CI	38,25 ml de tampón de solubilización / g de CI (1166 $\pm$ 12 g de CI + 44,6 l de tampón solub.)
Duración	5,5-6,5 h
Temperatura	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Agitación	200 rpm agitador con impulsor en un tanque móvil
<b>Filtración profunda</b>	
	Tamaño de poros 1,5 $\mu\text{m}$
<b>Replegado</b>	
Tampón de replegado	Tris 25 mM, pH 8,0, hidrocloreuro de arginina 0,8 M, Titriplex III 10 mM Aditivo: GSSG 1 mM; GSH 1 mM
Dilución de tampón de replegado	Aprox. 1 + 19 (p. e., independiente del contenido total de proteína) (aprox. 47 l de suspensión de CI + 19 partes de tampón de replegado, es decir $20 \pm 9$ litros)
Tiempo de dosificación de la suspensión de CI	en 50-70 min.
Duración después de dosificación	3,5-4,5 h
Temperatura	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Adición con agitación de polisorbato 80	200 rpm agitador con impulsor, a 0,01%
Detención del replegado	Valoración a pH 4,0 con HAc al 50%
<b>Filtración</b>	Filtración 10 $\mu\text{m}$ y 1,2 $\mu\text{m}$
<b>Ultra-/Diafiltración</b>	
Tampón de membrana	Hydrosart, 10 kDa, tampón: ácido acético 20 mM, pH 4,0, polisorbato 80 al 0,01% (p/v)
<b>Cromatografía 1</b>	

Resina	CM-Sepharose FF, pH 5,5
	Tampón A: ácido acético 20 mM, pH 5,5, polisorbato 80 al 0,004% (p/v)
	Tampón B: ácido acético 20 mM, pH 5,5, polisorbato 80 al 0,004% (p/v), NaCl 350 mM
Filtración	Filtración 0,45 y 0,2 µm
<b>Cromatografía 2</b>	
Resina	Jupiter C4, Resina de fase inversa
	Tampón A: API al 89%, TFA al 0,1%, Acetonitrilo al 10%
	Tampón B: API al 9%, Acetonitrilo al 90%, TFA al 0,1%, elución en ácido acético 20 mM, pH 4,0; polisorbato 80 al 0,0025% (p/v)
<b>Ultra-/ Diafiltración</b>	
Tampón de membrana	Hydrosart, 5 kDa, Tampón: ácido acético 10 mM, pH 4,0; polisorbato 80 al 0,0025%, sorbitol 50 mg/ml
Dilución a 1 mg/ml, esterilización por filtración doble y envasado	Bolsa: 50L 3D Thermo Fischer AF-Film / LDPE

#### Ejemplo 7: Cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía líquida de alta presión-fase inversa

**[0075]** El concentrado diafiltrado se carga en una columna de intercambio catiónico (CM Sepharose® FF).

- 5 Después de la carga, la columna se lava con cinco volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado (ácido acético 20 mM, polisorbato 80 al 0,004% (p/v), pH 5,5), y el G-CSF unido eluye de la columna CM usando un gradiente lineal de cloruro sódico a una bolsa que contiene ácido acético 20 mM, pH 5,5, polisorbato 80 al 0,004% (p/v) y sorbitol aproximadamente 50-80 mg/ml. El perfil de elución se sigue por detección UV (280 nm, 260 nm y 215 nm) y el gradiente se controla midiendo la conductividad. El G-CSF eluido se identifica de acuerdo con la
- 10 conductividad y el perfil de absorbancia. La concentración de la fracción mezcla de G-CSF se determina por la absorbancia UV280 y se diluye a  $\leq 1,6$  mg/ml.

Tabla 2: Parámetros para llevar a cabo la cromatografía de intercambio catiónico: CM Sepharose®-FF

<b>Cromatografía de intercambio catiónico: CM sepharose®-FF</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Resina	CM Sepharose® FF (GE Healthcare)
Dispositivo de columna	Millipore QuickScale®
Diámetro de columna	30 cm
Altura del lecho	11,0 + 1,0 cm
Platos teóricos	> 7.500 N/m
Factor de asimetría	n.d.
Caudal	70,7 l/h (100 cm/h) - todas las etapas
Tampón de carga	ácido acético 20 mM, pH 5,5; polisorbato 80 al 0,004% (v/p)
Tampón de elución	ácido acético 20 mM, pH 5,5; polisorbato 80 al 0,004% (v/p), NaCl 350 mM
Volumen de elución	1,4 - 1,7 VC
Elución / recogida	Gradiente lineal 0-100% de B en 7 VC
Criterios de mezcla	Inicio 1,8 AU <sub>280</sub> ; Detención 0,5 AU <sub>280</sub>

- 15 **[0076]** Después de filtración con una unidad de filtro de 0,45-0,22 µm, la solución se aplica a una columna de RP-HPLC y se eluyen fracciones usando un gradiente de acetonitrilo acidificado (TFA) en agua. El perfil de elución se sigue por detección UV (280 nm). La mezcla de RP-HPLC se define con los datos de pureza de RP-HPLC analítica (a 60°C) y la mezcla se somete a ultrafiltración y diafiltración por filtración de flujo tangencial con ácido acético 10 mM, polisorbato 80 al 0,0025% (p/v), sorbitol 50 mg/ml, pH 4,0 (corte de exclusión de peso molecular de 5
- 20 kDa, 4,8 m<sup>2</sup>, aproximadamente 8 x intercambio de tampón).

Tabla 3: Parámetros para llevar a cabo la cromatografía de fase inversa: Jupiter C4

<b>Cromatografía de fase inversa: Jupiter C4</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Resina	Jupiter® C4, 300 Å (Phenomenex)
Dispositivo de columna	Columna de acero inoxidable (Peak Biotech)
Diámetro de columna	25 cm
Altura del lecho	20 ± 2,5 cm
Platos teóricos	n.d.
Factor de asimetría	n.d.
Temperatura de la columna	22 ± 2°C
Caudal	98,1 l/h (299 cm/h) - todas las etapas
Tampón de carga	API al 89% / Acetonitrilo al 10%, TFA al 0,1%
Tampón de elución	API al 9% / Acetonitrilo al 90%, TFA al 0,1%
Volumen de elución	1,7 - 2,0 VC
Elución / recogida	Elución I; Gradiente lineal 0-38% (24,5 l; 15,0 min), Elución II: gradiente lineal 38-72% (92,0 l; 56:3 min), pre-fracciones 7 x 1 l, fracción principal 1 x 200 l
Criterios de mezcla	Inicio 0,02 AU <sub>280</sub> ; Detención 0,02 AU <sub>280</sub>

**Ejemplo 8: Carga, almacenamiento y transporte**

- 5 **[0077]** El diafiltrado se diluye con el mismo tampón a una concentración de proteínas de 20 ± 0,1 mg/ml, después se realiza doble filtración (dos filtros de 0,22 µm en una cascada) directamente a una bolsa de un solo uso (prefiltro conectado al envase final en una CFL previo a la filtración, premontaje de filtro final a la bolsa de acondicionamiento primario de 50 litros, esterilizada por irradiación y desconectada asépticamente por sellado después de filtración y carga) para el almacenamiento a 20 ± 3°C (etapa de reposo).

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica de G-CSF humano recombinante biológicamente activo, que comprende obtener el G-CSF humano biológicamente activo partir de 5 cuerpos de inclusión, que comprende las etapas de:
- (a) solubilización del G-CSF contenido en los cuerpos de inclusión con un tampón de solubilización que contiene un agente desnaturalizante y un agente de reducción;
- 10 (b) replegado del G-CSF diluyendo el solubilizado con un tampón de replegado que contiene glutatión reducido y oxidado a una temperatura  $>10^{\circ}\text{C}$ ;
- (c) purificación del G-CSF replegado mediante al menos una etapa de cromatografía, que comprende cromatografía en fase inversa (RP), en la que una isoforma del G-CSF menos hidrófoba en la muestra de G-CSF obtenida después 15 de la etapa de replegado (b) que tiene un contenido de estructuras de hélice alfa de 66% e hidrofobicidad menor que un patrón de referencia del G-CSF que tiene 52% de estructuras de hélice alfa, se separa eluyendo en una fracción más temprana que el patrón de referencia del G-CSF, en el que la etapa de cromatografía de RP está precedida por una cromatografía de intercambio catiónico (CEX); y
- 20 (d) formular el G-CSF resultante en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el contenido de la isoforma del G-CSF menos hidrófoba en la composición farmacéutica es inferior a 1% de la proteína G-CSF total.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
- 25 (i) el agente de desnaturalización es guanidina-HCl y/o  
(ii) el agente de reducción es DTT.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la concentración de guanidina-HCl es de 4,0 a 8,0 30 mol/l.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
- (i) la concentración del agente de reducción en el tampón de solubilización es de 1 a 100 mmol/l;  
35 (ii) se usan de 10 a 100 ml de tampón de solubilización por gramo de cuerpos de inclusión; y/o  
(iii) la concentración del glutatión reducido y oxidado es de 0,2 a 10 mmol/l de cada uno.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la concentración del agente de reducción en el 40 tampón de solubilización es de 1 a 10 mmol/l.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que
- (i) el tampón de solubilización y/o el tampón de replegado contienen además un agente quelante, y/o  
45 (ii) el tampón de replegado además contiene arginina-HCl.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el agente quelante es EDTA disódico.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tiempo de solubilización 50 es de 1 a 10 horas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el tiempo de solubilización es de 4 a 8 horas.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el tiempo de solubilización es  $20 \pm 0,5$  horas.
- 55 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el solubilizado se diluye con tampón de replegado en una relación de 1 a 20, y/o se somete a filtración antes de diluir con el tampón de replegado.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el replegado se lleva a

cabo a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante al menos 3 horas.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa de cromatografía de fase inversa (RP) es cromatografía líquida de alta presión de RP (RP-HPLC).
- 5
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se usa resina cromatográfica que contiene grupos metilo, butilo, fenilo, propilo y/u octilo, como grupos funcionales.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que se usa una resina cromatográfica, que consiste en 10 partículas de gel de sílice, cuyas superficies llevan cadenas de alquilo C4.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la etapa (c) comprende:
- 15 (i) una etapa de ultra/diafiltración;  
(ii) la etapa de cromatografía de CEX;  
(iii) una etapa de microfiltración;  
(iv) la etapa de cromatografía de RP; y  
(v) una etapa de ultra/diafiltración.
- 20 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que además comprende unir covalentemente un polímero soluble en agua al G-CSF, y/o en el que el peso molecular del polímero es de 10 a 30 kDa.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el polímero soluble en agua es polietilenglicol 25 (PEG).
19. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el peso molecular del polímero es aproximadamente 20 kDa.
- 30 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el G-CSF biológicamente activo purificado se formula en ácido acético 10 mM a un pH de 4,0, polisorbato 80 al 0,0025% y sorbitol 50 g/l.
21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un aditivo seleccionado del grupo de tampones, sales y estabilizantes.
- 35



Fig. 1

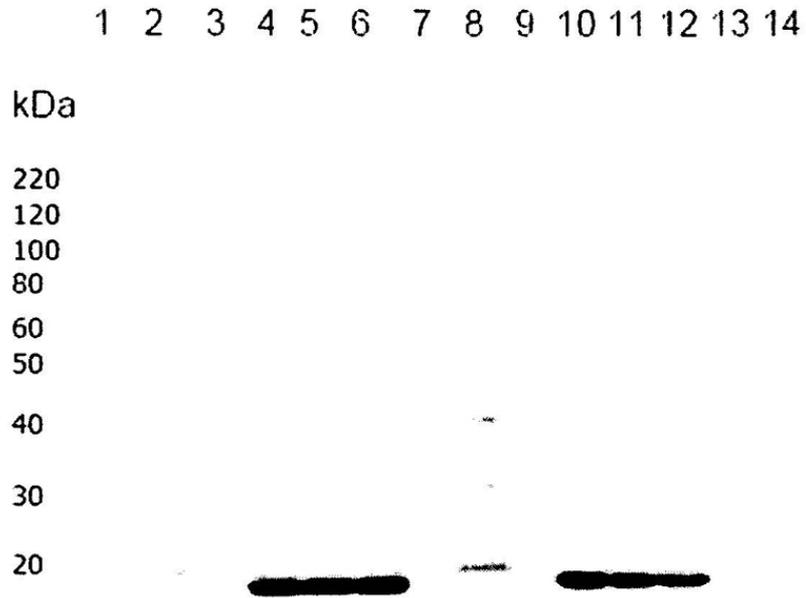


Fig. 2

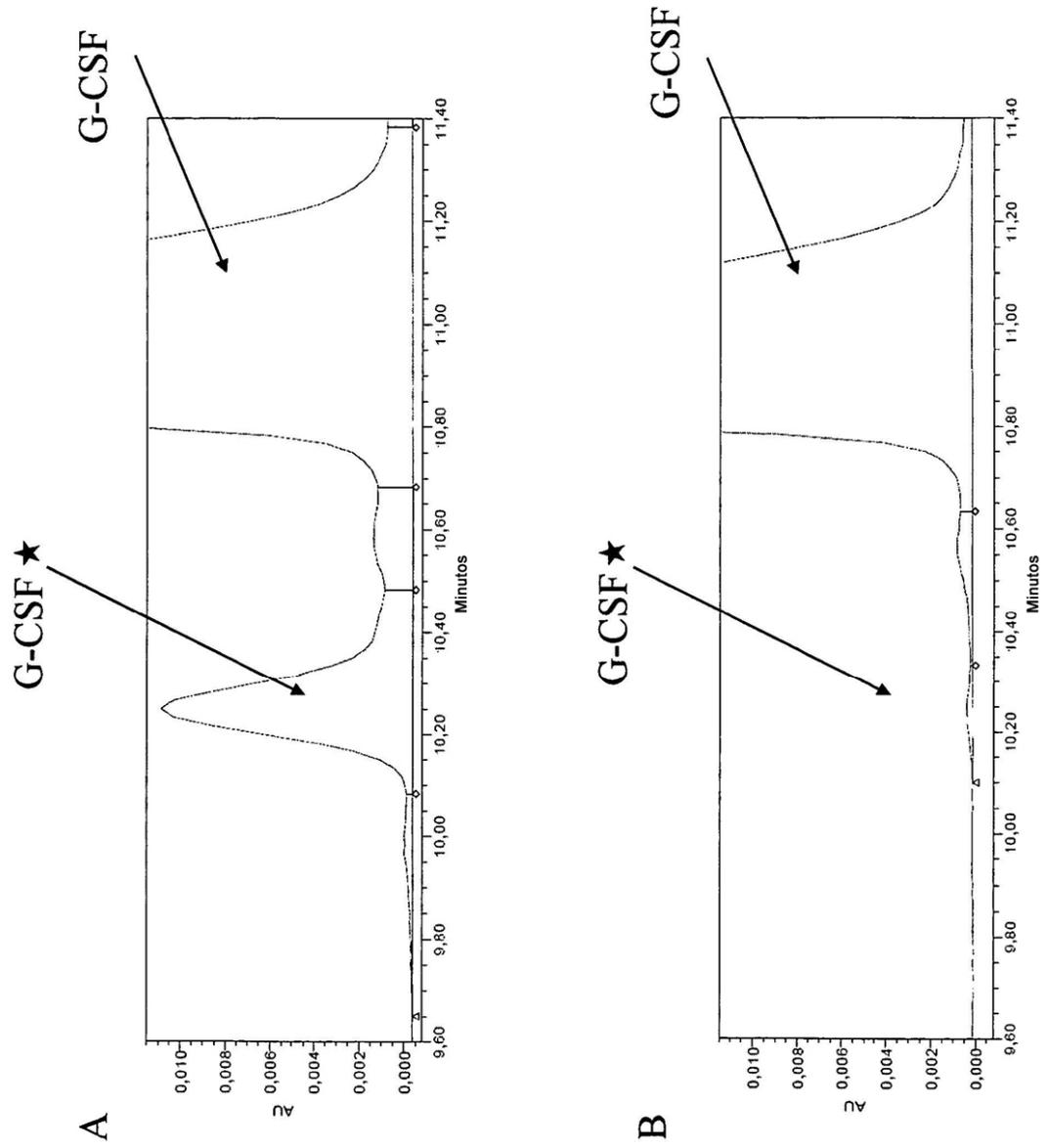


Fig. 3