

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 427**

51 Int. Cl.:

C07K 14/635 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014 E 14154713 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2905289**

54 Título: **Método para purificar teriparatida (PTH1-34)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2017

73 Titular/es:

**RICHTER-HELM BIO TEC GMBH & CO. KG
(100.0%)
Suhrenkamp 59
22335 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**REICH, CHRISTOPH y
KUECHLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 612 427 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

Método para purificar teriparatida (PTH1-34)

La presente invención se refiere a un método novedoso para purificar teriparatida, un fragmento de polipéptido terapéuticamente activo de la hormona paratiroidea humana de longitud completa. El método se basa en la cromatografía de intercambio iónico y es eficaz en la separación del polipéptido terapéuticamente activo de variantes no deseadas, tales como polipéptidos truncados. El método de la invención puede utilizarse a escala preparativa, lo que permite implementarlo en el proceso de producción de la teriparatida. Por consiguiente, la invención también proporciona un método para la producción de teriparatida que incluye una etapa en la cual la teriparatida se purifica mediante el novedoso método de cromatografía de intercambio iónico de la invención.

10 Antecedentes de la invención

La hormona paratiroidea (PTH) es una hormona polipeptídica que se produce de forma natural en la paratiroides de los mamíferos. El polipéptido humano consiste en 84 aminoácidos y está implicado en la regulación de la concentración de calcio en el plasma sanguíneo. Si el nivel de calcio disminuye por debajo de un nivel umbral, las células de la glándula paratiroides secretan PTH a la sangre y se induce la liberación de calcio desde el tejido óseo. Al mismo tiempo, la PTH ayuda en la absorción de calcio desde el intestino delgado y aumenta la reabsorción de calcio de la pre-orina, evitando de este modo la pérdida de calcio por los riñones. Debido a sus efectos de liberación de calcio, se ha observado que una cantidad excesiva de PTH en la sangre, tal como normalmente se observa en el hiperparatiroidismo primario y secundario, está asociada con una densidad ósea reducida y con atrofia ósea (osteoporosis). Considerando los efectos fisiológicos de la PTH, resulta extraño que, sin embargo, la hormona haya resultado ser útil en el tratamiento de la osteoporosis.

Sin embargo, estudios animales en ratas revelaron por primera vez que una exposición breve a la PTH induce formación de hueso debido a la activación transitoria de los osteoclastos, mientras que una exposición prolongada da como resultado en última instancia atrofia ósea. Estudios clínicos posteriores en seres humanos utilizando el fragmento farmacéuticamente activo PTH1-34 de la PTH humana confirmaron que el fragmento puede utilizarse para tratar la osteoporosis. El PTH1-34 es un polipéptido que tiene una masa molecular de 4,7 kDa que consiste en los primeros 34 aminoácidos de la hormona PTH humana. Se aprobó para el tratamiento de la osteoporosis en 2002 con el nombre del producto "teriparatida". La teriparatida se comercializa por Lilly Pharma bajo la marca Forteo (en los Estados Unidos) y Forsteo (en Europa).

Actualmente, el PTH1-34 para uso terapéutico se produce por expresión heteróloga en células hospedadoras bacterianas y posterior purificación del polipéptido farmacológicamente activo. Sin embargo, se ha descubierto que todos los fragmentos conocidos y variantes del PTH1-34 producidos durante el proceso de producción demuestran una potencia reducida comparada con el PTH1-34. Además se ha observado un efecto negativo en la pureza general. Por ejemplo, se identificó una serie de fragmentos derivados del PTH1-34 en el lote final obtenido tras la expresión heteróloga, incluyendo entre otros PTH1-30, PTH2-34, PTH3-34 y PTH4-34. Además, las modificaciones químicas de ciertos aminoácidos del PTH1-34, por ejemplo, la oxidación de restos de metionina o la desamidación de restos de asparagina, da lugar a variantes adicionales.

Sin embargo, dado que la homogeneidad de un producto pensado para ser usado como producto terapéutico es de la máxima importancia por motivos de seguridad, cualquier tipo de forma truncada o modificada químicamente del PTH1-34 en el producto final es claramente indeseable. Por consiguiente, los procesos de producción actuales normalmente incluyen una o más etapas de cromatografía dirigidas a la purificación del polipéptido PTH1-34. Sin embargo, se ha descubierto que es problemático separar el PTH1-34 de alguna de sus variantes y fragmentos sin pérdidas significativas del producto. En particular, se ha observado que el fragmento PTH2-34 muestra esencialmente las mismas propiedades de retención en la cromatografía de intercambio iónico que el PTH1-34. Por consiguiente, el fragmento PTH2-34 se co-eluye con el PTH1-34, lo que dificulta la purificación del PTH1-34. Además, se probaron técnicas cromatográficas alternativas, por ejemplo, la cromatografía de fase inversa, pero no mostraron potencial para una separación preparativa de la teriparatida truncada y de longitud completa.

En vista de lo anterior, se necesitan nuevos métodos que sean eficaces en la separación del PTH1-34 de sus fragmentos y variantes químicamente modificadas. El método de la presente invención posibilita una purificación eficaz del polipéptido PTH1-34 por cromatografía de intercambio catiónico utilizando gradientes de pH y fuerza iónica inversamente proporcionales. Tal como se describe con más detalle a continuación, el método es particularmente adecuado para separar el PTH1-34 del PTH2-34.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura primaria y secundaria del fragmento de la hormona paratiroidea PTH1-34. La figura 1a muestra la secuencia de aminoácidos y la distribución de cargas en el PTH1-34. La figura 1b muestra la

estructura secundaria del PTH1-34.

La figura 2 muestra el intento de separar el PTH1-34 del PTH2-34 por cromatografía de intercambio catiónico a escala analítica utilizando un gradiente de sal. Volumen de la columna (VC): 1 ml. Resina: Fractogel SO_3^- (S). Eluyente A: KH_2PO_4 20 mM, pH 6,5. Eluyente B: KH_2PO_4 20 mM, KCl 500 mM, pH 6,5. Carga: 1 mg/ml de resina. Gradiente 0-100 % de eluyente B en 60 VC. Caudal: 120 cm/h.

La figura 3 muestra la separación cromatográfica del PTH1-34 y del PTH2-34 utilizando una columna de intercambio catiónico con un volumen de columna de 29 ml. Eluyente A: Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, pH 6,5. Eluyente B: Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, KCl 4 mM, pH 8,2. Carga: 4,5 mg/ml de resina. Elución por etapas con 13,5 volúmenes de columna con tampón de elución al 100 %. Resina: Fractogel SO_3^- (S). Caudal: 150 cm/h.

La figura 4 muestra la separación cromatográfica del PTH1-34 y del PTH2-34 a escala preparativa utilizando una columna de intercambio catiónico con un volumen de columna de 26,3 l. Eluyente A: Tris 20 mM, dihidrogenofosfato potásico 20 mM, pH 6,5. Eluyente B: Tris 20 mM, hidrogeno fosfato dipotásico 16 mM, dihidrogenofosfato potásico 4 mM, pH 8,9. Carga: 3,5 g/l de resina. Resina: Fractogel SO_3^- (S). Caudal: 100 cm/h.

La figura 5 muestra los resultados del análisis por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento en fase reversa (RP-uHPLC) de las fracciones recogidas de la ejecución de cromatografía de intercambio catiónico ilustrada en la figura 4.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la sorprendente perspectiva de que la teriparatida (también citada en el presente documento como PTH1-34) puede purificarse de manera eficaz en un proceso de cromatografía de intercambio catiónico aumentando el pH y disminuyendo simultáneamente la fuerza iónica en el fluido utilizado para eluir el polipéptido del material de intercambio catiónico. El uso de estos gradientes inversamente proporcionales no ha sido divulgado en la técnica anterior. En su lugar, es un conocimiento básico en el campo de la cromatografía de intercambio iónico que los polipéptidos, que están unidos a un intercambiador iónico, pueden eluirse incrementando la fuerza iónica en el eluyente, por ejemplo, aumentando la concentración de sal en el eluyente (S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno (1988), "Ion Exchange Chromatography of Proteins", Chromatographic Science Series, Volumen 43, Marcel Dekker, Nueva York; C. T. Mant et al. (2007), "HPLC Analysis and Purification of Peptides", Methods in Molecular Biology, Volumen 386, 3-55). La disminución de la fuerza iónica en el eluyente no es una etapa habitual en la cromatografía de intercambio iónico. Es sorprendente, por lo tanto, que un gradiente dual como el aplicado en la presente invención sea adecuado para proporcionar PTH1-34 altamente purificado.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere, por lo tanto, a un método para purificar el PTH1-34 mediante cromatografía de intercambio iónico, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto un fluido que contiene el PTH1-34 con un material de intercambio catiónico en condiciones que permitan la unión reversible del PTH1-34 a dicho material de intercambio catiónico;

(b) opcionalmente, lavar el material de intercambio catiónico para eliminar el material no unido;

(c) eluir el PTH1-34 mediante el aumento del pH y la disminución de la fuerza iónica.

PTH1-34 e impurezas derivadas del mismo

Se ha observado que el presente método es eficaz para purificar el PTH1-34 terapéuticamente activo que está presente en un fluido de varias variantes y fragmentos no deseados del PTH1-34 que pudieran estar también presentes en dicho fluido. Estos fragmentos pueden incluir, por ejemplo, formas truncadas del PTH1-34 que pueden ser consideradas como producto relacionado con impurezas resultantes del proceso de producción del polipéptido. Por ejemplo, la manera más común de producir el PTH1-34 incluye la expresión heteróloga del polipéptido en células hospedadoras de *E. coli*. Se ha descubierto que la expresión heteróloga del PTH1-34 puede dar lugar a formas truncadas en N-terminal y en C-terminal del PTH1-34 que no son aceptables y tienen que eliminarse del producto por razones de seguridad.

En particular, se ha observado que el PTH2-34, una forma truncada del PTH1-34 que carece del resto de serina N-terminal, está regularmente presente después de la expresión heteróloga. La cantidad general del PTH2-34 truncado en producto de la solución obtenida es de hasta el 1 % (p/p). Otras posibles formas truncadas del PTH1-34 pueden carecer de los primeros 2 o 3 aminoácidos en el extremo N-terminal. Estas variantes se citan en el presente documento como PTH3-34 y PTH4-34, respectivamente. En una realización preferida de la invención, el método de cromatografía de intercambio iónico que se proporciona en el presente documento se aplica con el propósito de eliminar uno o varios de los fragmentos de PTH2-34 truncados en N-terminal, PTH3-34 y PTH4-34. En una realización

particularmente preferida, el método reivindicado se refiere a la eliminación de fragmentos truncados PTH2-34.

Aparte de los fragmentos truncados en N-terminal de PTH1-34, el fluido que se va a someter al método de purificación de la presente invención puede contener también formas del PTH1-34 truncadas en el C-terminal. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos que carezcan de 1, 2, 3 o 4 de los aminoácidos localizados en el extremo C-terminal del PTH1-34. Por lo tanto, en otra realización preferida, el método de cromatografía de intercambio iónico proporcionado en el presente documento se aplica con el fin de eliminar uno o varios de los polipéptidos PTH1-33, PTH1-32, PTH1-31 y PTH1-30 truncados en el C-terminal. En una realización particularmente preferida, el método reivindicado se aplica para eliminar el PTH1-30.

En otra realización adicional más de la presente invención, el nuevo método se realiza con el fin de eliminar variantes químicamente modificadas del PTH1-34 que comprenden modificaciones en una o más cadenas laterales de aminoácidos. Estas variantes pueden surgir como impurezas relacionadas con el producto en la producción del PTH1-34. Se han identificado una serie de variantes del PTH1-34 que difieren del polipéptido original en que ciertos restos de aminoácidos se han oxidado, desaminado y/o modificado por formación de succinimida. Por ejemplo, se ha identificado una variante que tiene un resto de asparagina desaminada en la posición 16 del PTH1-34. Otra variante tiene restos de metionina oxidados en las posiciones 8 y/o 18 del PTH1-34. Como en los fragmentos truncados, es necesario retirar estas variantes del producto final de PTH1-34 por razones de seguridad.

El PTH1-34 que se va a purificar con el método de la invención preferentemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. El polipéptido ilustrado en la SEQ ID NO: 1 se corresponde con los 34 aminoácidos N-terminales de la hormona paratiroidea humana de origen natural. Por comparación, la secuencia de aminoácidos de la hormona paratiroidea humana de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 2. La figura 1a muestra la distribución de la carga de aminoácidos dentro de la secuencia del PTH1-34 de SEQ ID NO: 1. En condiciones fisiológicas, la secuencia del PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 comprende dos regiones de alfa-hélice que están conectadas mediante una región en bucle (véase la figura 1b). No se ha observado una estructura terciaria para la molécula en condiciones fisiológicas.

También se incluyen en el término "PTH1-34" los homólogos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. Tal como se usa en el presente documento, los homólogos del PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 son polipéptidos que se diferencian del polipéptido en la SEQ ID NO: 1 en un número limitado de aminoácidos, por ejemplo en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más aminoácidos. Preferentemente, el homólogo difiere en no más de 15 aminoácidos respecto del polipéptido ilustrado en la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el polipéptido que se va a purificar mediante el método de la invención puede ser un polipéptido que difiere del PTH1-34 que se muestra en la SEQ ID NO: 1 en que no más de 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos han sido sustituidos por otros aminoácidos. En los casos donde se efectúa una sustitución de aminoácidos, la sustitución es preferentemente una sustitución conservativa de aminoácidos, es decir, una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de polaridad similar que pueda actuar como un equivalente funcional. Preferentemente, el aminoácido que se usa como sustituto se selecciona del mismo grupo que el resto de aminoácido que se va a sustituir. Por ejemplo, puede sustituirse un resto hidrófobo por otro residuo hidrófobo, o puede sustituirse un resto polar por otro resto polar que tenga la misma carga. Los aminoácidos funcionalmente homólogos que pueden utilizarse para una sustitución conservativa pueden ser, por ejemplo, aminoácidos no polares, tales como glicina, valina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, fenilalanina, y triptófano. Los ejemplos de aminoácidos polares no cargados pueden ser serina, treonina, glutamina, asparagina, tirosina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos polares (básicos) cargados pueden ser histidina, arginina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos polares (ácidos) cargados pueden ser ácido aspártico y ácido glutámico.

Es particularmente preferible que el homólogo del PTH1-34 que pueda comprender 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con el PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 no comprenda modificaciones químicas, tales como oxidaciones, desamidaciones, ciclaciones, y similares. Además, es preferible que el homólogo comprenda o consista en 34 aminoácidos.

De acuerdo con la invención, el polipéptido PTH1-34 que se va a someter al método de la invención puede obtenerse por cualquier método adecuado que se conozca en la técnica para producir polipéptidos. El polipéptido puede haberse preparado tanto por métodos ribosómicos como no ribosómicos. Por ejemplo, el PTH1-34 puede haber sido sintetizado químicamente en fase sólida o en métodos de fase líquida. Se han descrito protocolos para la síntesis química de péptidos en fase de solución (véase, por ejemplo, Andersson *et al.*, *Biopolymers* 55:227-250, 2000). Para la síntesis en fase sólida se puede usar la técnica básica descrita por Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85, 2149-2154). En esta estrategia, el péptido en crecimiento está anclado sobre una resina insoluble, y los reactivos solubles que no hayan reaccionado son eliminados en etapas de filtración o lavado sin pérdidas en la manipulación. La técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield se ha mejorado en la última década y hoy en día permite la síntesis de polipéptidos de hasta 50 aminoácidos. La síntesis química de fragmentos del PTH1-34 fue divulgada, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4.427.827 y 4.105.602.

Como alternativa, el polipéptido PTH1-34 que se va a purificar de acuerdo con la invención puede ser un PTH1-34 producido de manera recombinante, es decir, el polipéptido se ha producido mediante procesos biotecnológicos que

implican modificaciones genéticas de células u organismos. Típicamente, se clona una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PTH1-34 en un vector adecuado que posibilita la expresión o sobreexpresión del polipéptido en la célula hospedadora. El vector se introduce en la célula hospedadora procarionota o eucariota, y la célula se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido. Normalmente, el polipéptido que se va a expresar estará
5 bajo el control de un promotor inducible de forma que la expresión podría iniciarse con la adición de un inductor, por ejemplo, IPTG, al medio de cultivo. Tras la incubación de las células para permitir la expresión, las células normalmente se recogen y homogeneizan para liberar el polipéptido PTH1-34 recombinante. Finalmente, el polipéptido se recupera mediante una o más etapas de purificación. De acuerdo con la presente invención, se prefiere particularmente que el polipéptido PTH1-34 sea un polipéptido que haya sido producido de manera recombinante por
10 expresión heteróloga en células hospedadoras.

Para simplificar su posterior enriquecimiento y purificación, el PTH1-34 recombinante debe prepararse en forma de un polipéptido de fusión. Tal como se usa en el presente documento, se prefiere un polipéptido de fusión a una fusión de la secuencia de aminoácidos del PTH1-34 a una segunda secuencia de aminoácidos. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, una etiqueta de afinidad, es decir, una secuencia de aminoácidos que está
15 fusionada al polipéptido PTH1-34 en N-terminal o en C-terminal, y que tenga una fuerte afinidad por otro compuesto o material, permitiendo de este modo el enriquecimiento y/o la purificación del polipéptido de fusión como un todo. La etiqueta de afinidad puede ser, por ejemplo, una secuencia de poli-histidina que comprende 6-12 histidinas que interacciona específicamente con una matriz de quelato de iones de níquel o con resinas IMAC alternativas. Como alternativa, la etiqueta de afinidad puede ser una glutatión S-transferasa que permite la purificación mediante una
20 matriz de glutatión. Se conocen bien en la técnica etiquetas de afinidad adicionales. Puede eliminarse una secuencia de etiqueta de afinidad de la secuencia del PTH1-34 después de la purificación con la matriz de afinidad, por ejemplo, proporcionando un sitio de escisión proteolítica entre el PTH1-34 y la etiqueta de afinidad.

El PTH1-34 recombinante puede expresarse en grandes cantidades en las células hospedadoras bacterianas, de manera que se forman cuerpos de inclusión en los que los polipéptidos recombinantes están presentes en formas
25 parcialmente plegadas y agregados mediante interacciones hidrófobas no covalentes o iónicas. En los casos donde el método de producción del PTH1-34 recombinante proporcione el polipéptido en cuerpos de inclusión, se incluirá preferiblemente una etapa en la que se solubilicen y replieguen los polipéptidos en los cuerpos de inclusión. Los métodos para la solubilización y el repliegado de polipéptidos de los cuerpos de inclusión son bien conocidos en la técnica.

30 Dispositivo cromatográfico y material de intercambio catiónico

El presente método se lleva a cabo preferentemente mediante el uso de un dispositivo de FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas), es decir, un dispositivo automatizado que comprende una columna que incluye el material de intercambio catiónico como la fase estacionaria, una o más bombas que proporcionan una presión que es suficiente
35 para hacer que la fase móvil (es decir, los tampones usados para unir, lavar y eluir) fluya a través del material de intercambio catiónico, un aparato que recoge las fracciones eluidas de la columna, y un detector que es capaz de detectar el PTH1-34 que es eluido desde la columna. La detección puede lograrse midiendo la absorbancia a una longitud de onda de, por ejemplo, 280 nm. Además, también pueden controlarse los cambios en el pH y la conductividad en las fracciones. Hay disponible comercialmente un número considerable de dispositivos de FPLC automatizados que son adecuados para la cromatografía de intercambio catiónico a través de diferentes fabricantes.
40 Los ejemplos no limitantes de dichos dispositivos cromatográficos incluyen los sistemas AKTApurifier, AKTAavant, AKTApilot, AKTAexplorer o AKT-Aprocess (GE Healthcare), los sistemas K-Prime 40 (Merck Millipore), los sistemas NCG (Bio-Rad), y dispositivos similares. Sin embargo, no es obligatorio el uso de estos dispositivos automáticos para llevar a cabo el método de la presente invención.

El método de la invención puede hacer uso de cualquier material de intercambio catiónico que se haya descrito en la
45 técnica como útil para la purificación de polipéptidos. Tal como se usa en el presente documento, el material de intercambio catiónico es una matriz polimérica insoluble que comprende en su superficie grupos funcionales cargados negativamente que son capaces de atraer cationes o moléculas cargadas positivamente. El material de intercambio catiónico puede estar en forma de perlas porosas que tienen, por ejemplo, un tamaño de entre 10-100 μm , preferentemente de 20-80 μm . En la técnica se conocen varios materiales de intercambio catiónico diferentes,
50 incluyendo polímeros naturales reticulados, polímeros orgánicos y materiales inorgánicos. Mientras que normalmente se emplean grupos carboximetilo en intercambiadores catiónicos débiles, los intercambiadores catiónicos fuertes incluyen a menudo grupos sulfopropilo. Cuando se realiza el método de la presente invención, es preferible que el intercambiador catiónico esté presente en la forma de una columna rellena adecuada para su uso en un dispositivo FPLC automatizado, como el sistema Akta Purifier 100 FPLC.

En otra realización preferida de la invención, el material de intercambio catiónico utilizado en el método de purificación es un intercambiador catiónico fuerte que comprende sulfoetilo, sulfopropilo, sulfobutilo y/o sulfoisobutilo como grupos
55 funcionales. Los materiales de intercambio catiónico que comprenden una mezcla de uno o más de los grupos anteriores pueden utilizarse igualmente en el método de la invención. Además, el material de intercambio catiónico puede basarse en cualquier material polimérico común que se haya descrito para su uso en este tipo particular de

cromatografía. Por ejemplo, el material polimérico de intercambio catiónico puede comprender poliestiroldivinilbenzol, polimetacrilato, estireno-divinilbenceno, agarosa reticulada, matrices basadas en sílice, éter de polivinilo, celulosa, y dextrano.

5 Los materiales o columnas de intercambio catiónico que contengan estos materiales pueden obtenerse a través de diferentes proveedores e incluyen, por ejemplo, la resina Unosphere S 70 (Biorad, Munich, Alemania), la resina Nuvia™ S (Biorad, Munich, Alemania), la resina Poros HS20 o HS50 (Life Technologies, Darmstadt, Alemania), la resina Source 15S o 30S (GE Healthcare, Friburgo, Alemania), la resina de Polisulfoetilo A (PolyLC, Columbia, EE.UU.), la resina Ceramic HyperD F (S) (Pall, Dreieich, Alemania), el medio de bioseparación Bakerbond™ PolyCSX-35 (Avantor Performance Materials, Center Valley, EE.UU.), las resinas Eshmun S y CPX (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), las resinas Toyopearl SP-650M y GigaCap S-650M (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, EE.UU.) y otras fases estacionarias de intercambio catiónico que se utilizan con regularidad para la purificación de proteínas.

15 La utilización de una de las siguientes resinas es particularmente preferida en el método de la invención: la resina Eshmun S, la resina Eshmun CPX, la resina Poros HS20, y la resina Toyopearl GigaCap S-650M. Un material de resina de intercambio catiónico particularmente preferido para el método de la invención es la resina Fractogel® desarrollada por Merck Millipore. La resina Fractogel® utiliza la denominada "tecnología tentáculo", lo que significa que la superficie de las perlas de resina contiene cadenas poliméricas largas que proporcionan una accesibilidad mejorada de las proteínas que se van a purificar a los grupos funcionales del material de resina. El método de la invención se lleva a cabo preferentemente con la resina Fractogel® EMD SE Hicap (M), la resina Fractogel® EMD SO₃⁻ (S), o la resina Fractogel® EMD SO₃⁻ (M). Se prefiere particularmente el uso de la resina Fractogel® EMD SO₃⁻ (S) de acuerdo con la invención.

25 Las columnas de intercambio catiónico utilizadas en el método de purificación divulgado en el presente documento pueden ser de cualquier tamaño. Dado que el método de la invención está dirigido a la purificación del PTH1-34 a partir de lotes de producción, se prefiere particularmente el uso de columnas preparativas que permitan la unión de grandes cantidades del PTH1-34. Se pueden utilizar columnas preparativas que tienen un volumen de lecho de 1-100 l, aunque se prefieren particularmente volúmenes de lecho de 10-50 l, por ejemplo, 45 l. Por ejemplo, las columnas preparativas utilizadas en el método de purificación de la presente invención pueden tener un volumen de lecho de al menos 1 l, al menos 2 l, al menos 3 l, al menos 4 l, al menos 5 l, al menos 10 l, al menos 20 l, al menos 25 l, o más. Normalmente, las columnas preparativas útiles en el método de la invención tendrán un diámetro de entre 1-100 cm, aunque se prefiere particularmente un diámetro de entre 20-80 cm o 40-60 cm.

35 Pueden usarse columnas analíticas que tienen un volumen de lecho de 1-5 ml para optimizar adicionalmente las condiciones del método de purificación de intercambio catiónico de la invención, por ejemplo, para ajustar el método para otros polipéptidos. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que las condiciones que resultaron altamente útiles para una columna analítica pueden no ser igualmente transferibles a las condiciones en una columna preparativa (véanse los ejemplos más adelante).

Preparación de la muestra y de la columna

40 El método de la invención utiliza como material de partida un fluido que contiene el PTH1-34. El fluido puede ser el sobrenadante de un cultivo celular que se utilizó para la expresión heteróloga del polipéptido. Por ejemplo, es posible someter directamente el sobrenadante que comprende los polipéptidos PTH1-34 y otros componentes solubles de las células hospedadoras al método de cromatografía de intercambio iónico de la invención, ya sea con o sin dilución previa. Sin embargo, es preferible que antes de aplicar el método de purificación de la invención se haya procesado adicionalmente el sobrenadante obtenido del cultivo celular, por ejemplo, por centrifugación, filtración, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, RP-HPLC, y similares, para eliminar sustancias no deseadas, por ejemplo, nucleótidos y/o polisacáridos, para retirar por escisión una etiqueta de afinidad u otro péptido o polipéptido que esté fusionado al PTH1-34, y/o para enriquecer el polipéptido PTH1-34. El fluido que se va a utilizar en el método de la invención contiene preferentemente el polipéptido PTH1-34 en forma sustancialmente enriquecida, lo que significa que al menos un 50 % de los componentes polipeptídicos disueltos en el fluido son PTH1-34.

50 En una realización, el fluido utilizado como material de partida en el método de la invención se obtiene de una ejecución previa de cromatografía en fase inversa, es decir, el fluido es el eluato de la cromatografía en fase inversa. Este eluato contendrá cantidades significativas de disolventes orgánicos, tales como acetonitrilo, y podría ser necesario diluirlo con un tampón adecuado antes de aplicarlo al material de intercambio catiónico. De manera conveniente, el tampón utilizado para la dilución puede ser el mismo tampón que se usó para equilibrar el material de intercambio catiónico. El eluato de la cromatografía en fase inversa puede diluirse en un factor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Una dilución de factor 2-4 ha resultado ser particularmente útil. Cuando la dilución no es posible, por ejemplo, debido a una excesiva cantidad de acetonitrilo en el fluido, puede realizarse un intercambio completo del tampón, lo que significa que el PTH1-34 se transfiere desde el eluato de la fase inversa a un tampón que se ajusta a la cromatografía de intercambio iónico posterior. El intercambio del tampón puede lograrse fácilmente, por ejemplo, por filtración de flujo tangencial, cromatografía de exclusión por tamaño, diafiltración o diálisis. Es preferible que el

PTH1-34 se transfiera al tampón que se utiliza durante la unión del polipéptido al material de intercambio catiónico (denominado en lo sucesivo como un "tampón de unión").

5 Antes de la aplicación del fluido que contiene el polipéptido PTH1-34 al material de intercambio catiónico, el material de intercambio catiónico se equilibrará normalmente mediante lavado de la columna con 1-50, preferentemente 1-25, y más preferentemente con 1-10 volúmenes de columna de un tampón de equilibrado para proporcionar condiciones que promuevan la unión del polipéptido al intercambiador catiónico. Preferentemente, el tampón de equilibrado y el tampón de unión son idénticos. Tras el equilibrio, se pone en contacto el fluido que contiene el polipéptido PTH1-34 con el material de intercambio catiónico.

Puesta de contacto del PTH1-34 con el material de intercambio catiónico

10 De acuerdo con la etapa (a) del método anterior, el fluido que contiene el PTH1-34 se pone en contacto con el material de intercambio catiónico en condiciones que posibilitan la unión del polipéptido a la matriz polimérica del intercambiador catiónico. Esto significa que las condiciones en términos de temperatura, presión y pH son tales que el PTH1-34 puede desplazar a los cationes que se han unido al material de intercambio catiónico después del equilibrado. En particular, se facilita la unión del polipéptido al material de intercambio catiónico mediante la selección
15 de un pH adecuado del tampón de unión.

Para identificar un pH adecuado que permita la unión del PTH1-34 a un material de intercambio catiónico concreto, puede ponerse en contacto el polipéptido con el intercambiador catiónico elegido en diferentes condiciones de pH a la vez que se detecta la cantidad de polipéptido en el flujo pasante. De este modo, puede determinarse fácilmente un intervalo de pH adecuado para la unión del polipéptido al intercambiador catiónico. Es preferible de acuerdo con la
20 invención que el pH se seleccione de tal forma que el PTH1-34 esté presente en forma de un polipéptido cargado positivamente que soporte su unión al intercambiador catiónico. Para proporcionar moléculas del polipéptido PTH1-34 cargadas positivamente, el pH del tampón utilizado en la etapa de unión debe estar preferentemente por debajo del punto isoeléctrico del polipéptido. El PTH1-34 expuesto en la SEQ ID NO: 1 tiene un punto isoeléctrico de 8,3. Por lo tanto, cuando se pretende purificar el PTH1-34 de la SEQ ID NO: 1 con el método de la presente invención, el pH en la
25 etapa de unión debe seleccionarse para que esté por debajo de 8,3.

Preferentemente, el tampón de unión utilizado para la aplicación del polipéptido PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 al material de intercambio catiónico se ajustará a un pH de 8,0 o inferior. Será particularmente preferible que el pH del tampón de unión sea de al menos 0,5 unidades de pH, más preferentemente de al menos 1,0, al menos 1,5, o al menos 2,0 unidades de pH por debajo del punto isoeléctrico del polipéptido que se va a purificar. En los casos donde el método de
30 la invención se lleve a cabo con el PTH1-34 expuesto en la SEQ ID NO: 1, la unión del polipéptido al material de intercambio catiónico se realiza preferentemente en un tampón de unión que tenga un pH por debajo de 7,8, por debajo de 7,3, por debajo de 6,8, y más preferentemente por debajo de 6,3, o incluso por debajo de 6,0. Por ejemplo, el PTH1-34 de SEQ ID NO:1 se une al material de intercambio catiónico utilizando un tampón de unión a un pH de entre 6,0 y 8,0, preferentemente a un pH de entre 6,5 y 7,5, y más preferentemente a un pH de entre 6,8 y 7,2. En los
35 casos donde se utilice un homólogo de PTH1-34 que difiera del PTH1-34 en la SEQ ID NO: 1 en 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, sería posible que el punto isoeléctrico de dicho polipéptido modificado sea ligeramente diferente. El experto en la materia será capaz de determinar fácilmente el punto isoeléctrico del homólogo utilizando métodos rutinarios bien conocidos en la técnica.

La presente invención se basa, entre otras, en la perspectiva de que la separación cromatográfica del PTH1-34 de sus fragmentos y variantes puede mejorarse eluyendo el PTH1-34 del material de intercambio catiónico mediante el
40 aumento del pH y un descenso simultáneo de la fuerza iónica en la fase móvil. Esto puede conseguirse convenientemente mediante el uso de un eluyente que, en comparación con el tampón de unión o lavado, tiene un pH más elevado y una conductividad más baja. Por lo tanto, el tampón de unión utilizado para unir el PTH1-34 a la resina de intercambio catiónico en el método de la invención mostrará una fuerza iónica que es mayor que la del eluyente.
45 Esto es inusual en la cromatografía de intercambio catiónico, porque la fuerza iónica del eluyente se incrementa normalmente de manera gradual para garantizar el desplazamiento de los polipéptidos desde el intercambiador catiónico. La conductividad (expresada como mS/cm) de los tampones utilizados en el proceso de cromatografía de intercambio iónico es una medida adecuada que refleja la fuerza iónica de dicho tampón. Por consiguiente, los términos "conductividad" y "fuerza iónica" se utilizan indistintamente en el presente documento.

Es preferible que el tampón de unión tenga una conductividad al menos un 30 % superior, al menos un 50 % superior, al menos un 75% superior, al menos un 100% superior, al menos un 150% superior, al menos un 200% superior, o al menos un 300 % superior a la conductividad del eluyente correspondiente. La conductividad del tampón de unión
50 estará preferiblemente en el intervalo de 1,5-3,0 mS/cm, por ejemplo, más de 1,5 mS/cm, más de 1,6 mS/cm, más de 1,7 mS/cm, más de 1,8 mS/cm, más de 1,9 mS/cm, más de 2,0 mS/cm, más de 2,1 mS/cm, más de 2,2 mS/cm, más de 2,3 mS/cm, más de 2,4 mS/cm, más de 2,5 mS/cm, más de 2,6 mS/cm, más de 2,7 mS/cm, más de 2,8 mS/cm, o más de 2,9 mS/cm. Preferentemente, la conductividad del tampón de unión será al menos 0,5 mS/cm superior que la conductividad del eluyente correspondiente, más preferentemente al menos 0,6 mS/cm, al menos 0,7 mS/cm, al menos 0,8 mS/cm, al menos 0,9 mS/cm, al menos 1,0 mS/cm, al menos 1,1 mS/cm, al menos 1,2 mS/cm, al menos 1,3
55

mS/cm, al menos 1,4 mS/cm, al menos 1,5 mS/cm, al menos 1,6 mS/cm, al menos 1,7 mS/cm, al menos 1,8 mS/cm, al menos 1,9 mS/cm, o al menos 2,0 mS/cm.

En un aspecto preferido, la conductividad del tampón de unión está en el intervalo de entre 2,0 y 3,0 mS/cm, y la conductividad del eluyente está en el intervalo de entre 0,5 y 1,5 mS/cm. En un aspecto aún más preferido, la conductividad del tampón de unión está en el intervalo de entre 2,5 y 2,8 mS/cm, y la conductividad del eluyente está en el intervalo de entre 1,0 y 1,3 mS/cm.

Se pueden utilizar varios tampones en el método de la presente invención. Es preferible, de acuerdo con la invención, que el tampón de unión y el tampón de elución se preparen con la misma sustancia tamponadora. El compuesto de tampón utilizado para preparar el tampón de unión y el tampón de elución se seleccionan de forma que su intervalo de pH abarque el punto isoeléctrico del polipéptido PTH1-34, es decir, el valor de pK_a de la sustancia tamponadora no es más de una unidad de pH superior o inferior al punto isoeléctrico del polipéptido PTH1-34. En los casos donde el polipéptido PTH1-34 que se va a purificar sea el polipéptido de SEQ ID NO: 1, el tampón se seleccionará de manera que su intervalo de pH abarque el pH 8,3, es decir, el compuesto tamponador tiene un pK_a de entre 7,3 y 9,3. Un intervalo de pH en el área del punto isoeléctrico del PTH1-34 tiene la ventaja particular de que la preparación del tampón de unión, que preferentemente tiene un pH por debajo de 7,5, y más preferentemente un pH de aproximadamente 6,5, requerirá cantidades considerables de ácido, tal como HCl, para el ajuste del pH. La adición de HCl u otros ácidos al tampón de unión aumentará la fuerza iónica del tampón de unión con respecto al tampón de elución, teniendo este último un pH mayor y, en consecuencia, requiere o no solo un ligero ajuste de pH.

Las sustancias tamponadoras adecuadas que tienen un pK_a en el intervalo de 8,3 incluyen tris(hidroximetil)aminometano (citado como "Tris" en el presente documento), trietanolamina, y tampón borato. Los tampones adicionales que se ha observado que son adecuados para llevar a cabo el método de la invención incluyen un tampón de barbital que tiene un pH en el intervalo de, por ejemplo, 6,8-9,2, y un tampón de glicilglicina que tiene un pH en el intervalo de, por ejemplo, 7,3-9,3. En el presente documento se prefiere el uso del tampón Tris, porque se descubrió de manera inesperada que da como resultado una separación particularmente buena del PTH1-34. El uso de tampón Tris no fue una medida obvia en el método de la invención, porque se recomienda con frecuencia en la bibliografía el uso de Tris en la cromatografía de intercambio aniónico. El Tris es un tampón catiónico que es, en principio, capaz de unirse a los grupos funcionales de la resina de intercambio catiónico, alterando de este modo la separación reproducible. En el método de la presente invención, sin embargo, se observa que el uso de Tris no influye negativamente en la purificación del PTH1-34 mediante cromatografía de intercambio catiónico.

El compuesto tamponador estará presente en el tampón de unión en una cantidad de 1-200 mM, preferentemente 10-100 mM, y más preferentemente 20-80 mM. En los casos donde se utilice Tris en el tampón de unión, la concentración preferida estará en el intervalo de 20-40 mM, en donde 20 mM es particularmente preferida. Pueden usarse sales adicionales, tales como NaCl o KH_2PO_4 , como aditivos en cantidades de 1-100 mM, preferentemente 20-80 mM, para ajustar la conductividad del tampón cuando sea necesario. Pueden añadirse otros compuestos tamponadores, tales como Bis-Tris, al tampón Tris. Los ejemplos no limitantes de un tampón de unión a base de Tris que sea adecuado para su uso en la purificación del polipéptido PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 incluyen:

Tris 20 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 30 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 40 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 20 mM, KH_2PO_4 20 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 40 mM, KH_2PO_4 40 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 30 mM, Bis-Tris 20 mM, pH 6,5-7,5
 Tris 40 mM, Bis-Tris 20 mM, pH 6,5-7,5

Basándose en su experiencia y en la información y los ejemplos particulares que se proporcionan en el presente documento, el experto será capaz de preparar fácilmente tampones de unión adicionales que sean adecuados para su uso en el proceso de purificación de la presente invención.

La puesta en contacto del polipéptido PTH1-34 con el material de intercambio catiónico puede realizarse de diferentes maneras, dependiendo del equipamiento particular que se utilice para llevar a cabo el método de la invención. En los casos donde se utilice un dispositivo FPLC para el proceso de purificación de la invención, el polipéptido PTH1-34 puede ponerse en contacto con el material de intercambio catiónico mediante la inyección del fluido que contiene el PTH1-34 (ya esté o no diluido con tampón de unión) en un bucle de inyección que posteriormente se introduce en el flujo del tampón de unión. El caudal durante la unión estará en el intervalo de 50-400 cm/h, preferentemente de 100-300 cm/h, más preferentemente de 150-200 cm/h.

Cuando se utilicen columnas preparativas que tengan tamaño de volumen del lecho de 1-50 l, el PTH1-34 se aplicará a la columna de manera que la carga proteica total esté en el intervalo de 2,0-4,5 g/l. En las estrategias que utilizan

columnas que tienen un tamaño de volumen del lecho de 10-250 ml, la carga proteica total está en el intervalo de 10-20 mg/ml. Cuando se utilicen columnas analíticas que tengan tamaño de volumen del lecho de menos de 10 ml, por ejemplo, 5 ml o 1 ml, la carga proteica total estará normalmente en el intervalo de 0,1-5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml.

5 Lavado de la resina de intercambio catiónico

Después de la unión de la proteína, el material de intercambio catiónico se lava opcionalmente para eliminar el material que no se ha unido. Para este fin, el material de intercambio catiónico se lava preferentemente con varios volúmenes de columna de tampón de lavado. De acuerdo con la invención, el tampón de lavado puede ser idéntico al tampón de unión en cuanto a su pH o fuerza iónica. El tampón de lavado puede contener componentes adicionales no incluidos en el tampón de unión. En cualquier caso, sin embargo, el pH y la fuerza iónica del tampón de lavado podrían ajustarse para evitar cualquier elución prematura del polipéptido PTH1-34 del material de intercambio catiónico.

Dependiendo del tamaño de la columna utilizada en el método de la invención, será útil lavar la columna después de la unión de polipéptidos con 1-25 volúmenes de columna, preferiblemente 1-15 volúmenes de columna, y más preferiblemente 1-10 volúmenes de columna. En una realización aún más preferente de la invención, la resina de intercambio catiónico se lava después de la unión del PTH1-34 hasta que las señales detectadas de absorción UV, pH y conductividad permanezcan constantes.

Elución del polipéptido PTH1-34

Tras la unión del PTH1-34 al material de intercambio catiónico y (cuando sea aplicable) el lavado de dicho material, se eluye el polipéptido PTH1-34. De acuerdo con la invención, la elución se efectúa aumentando el pH y disminuyendo la fuerza iónica. En comparación con el tampón de unión, el eluyente tendrá, por lo tanto, un pH más alto que es cercano al punto isoeléctrico del polipéptido PTH1-34. Al aumentar el pH, se reduce la carga positiva general del polipéptido PTH1-34 y el polipéptido se liberará del material de intercambio catiónico. Preferentemente, el eluyente es un tampón de elución, es decir, comprende al menos un compuesto tamponador.

El aumento del pH puede lograrse de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una elución en gradiente en la que el eluyente se mezcla gradualmente con el tampón de unión o el tampón de lavado. De este modo, el pH de la fase móvil que fluye sobre el material de intercambio catiónico aumenta gradualmente, de manera que los diferentes polipéptidos, que se han unido al material de intercambio catiónico, se liberan en función de su fuerza de interacción. El gradiente utilizado puede ser un gradiente convexo, cóncavo o lineal, pero se prefieren particularmente gradientes lineales. Puede variarse la pendiente del gradiente según sea necesario. Normalmente, son útiles los gradientes lineales con una pendiente del 1-5 % de tampón de elución por volumen de columna para llevar a cabo el método de la invención. Como alternativa, se puede realizar una etapa de elución isocrática cambiando los tampones de unión o lavado directamente al 100 % de eluyente sin ningún gradiente. En una etapa de elución isocrática, la composición del eluyente permanece constante durante la elución, debido a que el eluyente no se mezcla gradualmente con tampón de unión o de lavado en el transcurso de la elución.

El eluyente utilizado para liberar el polipéptido PTH1-34 del material de intercambio catiónico se ajustará a un pH de 8,0 o superior. Será preferible que el pH del eluyente sea 0,1 unidades de pH, 0,2 unidades de pH, o 0,3 unidades de pH superior o inferior al punto isoeléctrico del polipéptido PTH1-34 que se va a purificar. En los casos donde el método de la invención se lleve a cabo con el PTH1-34 de la SEQ ID NO: 1, el eluyente tiene preferentemente un pH de al menos 8,0 o más, al menos 8,1 o más, al menos 8,2 o más, al menos 8,3 o más, al menos 8,4 o más, al menos 8,5 o más, o al menos 9,0 o más. En los casos donde se utilice un homólogo del PTH1-34 que difiera del PTH1-34 en la SEQ ID NO: 1 en 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos, sería posible que el punto isoeléctrico de dicho polipéptido modificado sea ligeramente diferente. Por lo tanto, el pH óptimo para su uso durante la etapa de elución podría variar ligeramente del determinado para el PTH1-34 de la SEQ ID NO: 1.

Tal como se ha afirmado anteriormente en el contexto del tampón de unión, el eluyente utilizado para la elución de PTH1-34 tendrá una fuerza iónica que es significativamente menor que aquella del tampón de unión y/o del tampón de lavado. Preferentemente, el eluyente tendrá una conductividad en el intervalo de 0,1-1,4 mS/cm, por ejemplo, menor de 1,4 mS/cm, menor de 1,3 mS/cm, menor de 1,2 mS/cm, menor de 1,1 mS/cm, menor de 1,0 mS/cm, menor de 0,9 mS/cm, menor de 0,8 mS/cm, menor de 0,7 mS/cm, menor de 0,6 mS/cm, menor de 0,5 mS/cm, menor de 0,4 mS/cm, menor de 0,3 mS/cm, o menor de 0,2 mS/cm. En otro aspecto, la conductividad del eluyente está en el intervalo de entre 0,2 y 1,4 mS/cm, preferentemente entre 0,5 y 1,3 mS/cm.

El tampón utilizado para preparar el eluyente será preferiblemente el mismo que el utilizado como tampón de unión y/o tampón de lavado, en donde se prefiere el uso de los tampones Tris, trietanolamina y borato. Se prefiere particularmente el uso del tampón Tris.

La sustancia tamponadora estará presente en el eluyente en una cantidad de 1-200 mM, preferentemente 10-100 mM, y más preferentemente 20-80 mM. En los casos donde el Tris se utilice en el eluyente, la concentración preferida estará en el intervalo de 20-40 mM. Se prefiere particularmente una cantidad de 20 mM de Tris en el eluyente. Pueden usarse sales adicionales, tales como NaCl o KH_2PO_4 , como aditivos en cantidades de 1-100 mM, preferiblemente de 20-80 mM. Pueden añadirse otros compuestos tamponadores, tales como Bis-Tris, al tampón Tris. Los ejemplos no limitantes de un eluyente a base de Tris que sea adecuado para su uso en la purificación del polipéptido PTH1-34 de SEQ ID NO: 1 incluyen:

- Tris 20 mM, pH 9,0
- Tris 30 mM, pH 9,0
- 10 Tris 40 mM, pH 9,0
- Tris 20 mM, KH_2PO_4 3 mM, K_2HPO_4 13 mM, pH 9,0
- Tris 30 mM, KH_2PO_4 4 mM, K_2HPO_4 14 mM, pH 9,0
- Tris 40 mM, KH_2PO_4 5 mM, K_2HPO_4 15 mM, pH 9,0
- 15 Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, KCl 5 mM, pH 8,2
- Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, KCl 5 mM, pH 8,3
- Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, KCl 5 mM, pH 9,0
- Tris 20 mM, Bis-Tris 20 mM, KCl 5 mM, pH 10,0

La elución se realizará aplicando 10-50 volúmenes de columna al material de intercambio catiónico. En caso de usar un gradiente lineal de eluyente al 0-100 %, el gradiente puede aplicarse en 10-50 volúmenes de columna. Se espera que los volúmenes de gradiente de 10-20 volúmenes de columna proporcionen el mejor equilibrio entre el pico de dilución y la resolución.

Modos preferidos de llevar a cabo la purificación

El método de purificación de la invención es capaz de separar el PTH1-34 terapéuticamente activo de subproductos y fragmentos modificados químicamente. Se prefiere que el eluato obtenido en la etapa (c) contenga menos del 5 % de impurezas, es decir, compuestos proteínicos que no sean el PTH1-34 sin modificar. Específicamente, se prefiere que el eluato obtenido en la etapa (c) contenga menos del 5 % (p/p) del fragmento PTH2-34 y/o menos del 5 % del PTH1-34 desamidado. Aún más preferentemente, el eluato obtenido en la etapa (c) contiene menos del 0,5 % (p/p) del fragmento del PTH2-34 y/o menos del 0,5 % del PTH1-34 desamidado. En una realización lo más preferida del método, el eluato obtenido en la etapa (c) no contiene PTH2-34 detectable.

30 De acuerdo con una realización particularmente preferida de la invención, el PTH1-34 que se va a purificar es el polipéptido ilustrado en la SEQ ID NO: 1, y el método de purificación se realiza con un sistema de tampón que comprende eluyente A: Tris 20 mM (con o sin Bis-Tris 20 mM), pH 6,5-7,0, y eluyente B: Tris 20 mM (con o sin Bis-Tris 20 mM), pH 8,0-10,0. Se prefiere además iniciar la elución llevando a cabo una etapa de elución con eluyente B al 75-100%.

35 De acuerdo con la invención, es posible añadir compuestos adicionales al eluyente A o B que puedan resultar ventajosos para una serie de realizaciones de la invención. Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender sacarosa 250 mM, Tween 20 (1%), urea (1-2 M) y/o arginina (50-100 mM).

Preparación del polipéptido PTH1-34

40 El método de purificación descrito anteriormente puede ser parte de un proceso para la preparación del PTH1-34. Esto significa que el método de purificación de la presente invención puede implementarse en un proceso de fabricación que incluya la expresión heteróloga del polipéptido y varias etapas posteriores de procesamiento dirigidas al plegado y purificación del polipéptido.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método para preparar el PTH1-34, en particular, el PTH1-34 de la SEQ ID NO: 1, que comprende las etapas de

- 45 (a) expresar de manera recombinante el PTH1-34 en una célula hospedadora;
- (b) opcionalmente, romper las células hospedadoras para liberar el PTH1-34 expresado de manera recombinante;
- (c) purificar el PTH1-34 mediante un método de purificación como el que se describe anteriormente con más detalle.

50 En la etapa (a) del método de fabricación anterior, el PTH1-34, o un homólogo del mismo descrito en otras partes del presente documento, se expresa de manera recombinante en una célula hospedadora, tal como en una célula hospedadora procarionota o eucariota. En una realización preferida del método de fabricación de la invención, el PTH1-34 se expresa en células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, en bacterias del género *Escherichia*. El

método de fabricación puede usar, por ejemplo, cepas bacterianas comunes de *E. coli* para expresar grandes cantidades del polipéptido PTH1-34.

5 Tras la expresión del polipéptido en las células, puede ser necesario romper las células para liberar el polipéptido recombinante del citoplasma. Como alternativa, en los casos donde el polipéptido se secreta por la cepa hospedadora al sobrenadante, por ejemplo, como consecuencia del uso de péptidos de señal adecuados, no será necesario romper las células. En su lugar, el polipéptido recombinante puede obtenerse directamente del sobrenadante de cultivo. El polipéptido recombinante, además, puede procesarse, por ejemplo, eliminando el péptido de señal.

En la etapa (c) del proceso de fabricación anterior, el PTH1-34 se purifica mediante el uso del método de cromatografía de intercambio catiónico citado anteriormente.

10 Preferentemente, el método para preparar el PTH1-34 también comprende una o más etapas cromatográficas adicionales, tales como la cromatografía en fase inversa, que se lleva a cabo antes o después de la etapa (c).

Ejemplos

Ejemplo 1: Purificación del PTH1-34 en una columna analítica

15 Las condiciones para separar el PTH1-34 del PTH2-34 truncado en N-terminal se analizaron en una columna analítica de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (S) en un volumen de 1 ml (0,8 mm de diámetro, 20 mm de altura). El eluato de una cromatografía en fase inversa que contenía aproximadamente 0,6 mg/ml de PTH1-34 se aplicó a la columna a una carga de aproximadamente 1 mg/ml de la resina.

20 La unión de los polipéptidos a la columna se llevó a cabo en el eluyente A (también usado como tampón de unión) que consiste en KH₂PO₄ 20 mM, pH 6,5. La elución se realizó utilizando el eluyente B que consiste en KH₂PO₄ 20 mM, KCl 500 mM, pH 6,5. El eluyente se aplicó en un gradiente lineal de eluyente al 0-100% en 60 volúmenes de columna. El caudal fue de 120 cm/h. Se recogieron fracciones de 1 ml. De cada una de las muestras recogidas, se midió la extinción a 220 nm.

25 El resultado de la cromatografía se ilustra en la figura 2. Se puede ver que el PTH1-34 y el PTH2-34 co-eluyen en el mismo pico. Evidentemente, en estas condiciones no fue posible separar el PTH1-34 del PTH2-34 en un grado suficiente. No hubo selectividad de unión para el PTH1-34 ni para el PTH2-34 con la columna de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (S). Por consiguiente, se hicieron esfuerzos por conseguir un método mejorado para purificar el PTH1-34 y obtener mayores rendimientos.

Ejemplo 2: Purificación del PTH1-34 en una columna de 29 ml

30 Para definir condiciones robustas y fiables a mayor escala, se probaron diferentes condiciones en una columna de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (S) con un volumen de 29 ml. Se observaron mejoras cuando se utilizó un aumento de pH en lugar de un aumento de concentración salina para la elución. Para proporcionar una baja fuerza iónica durante la elución, se prepararon los tampones de manera que el eluyente A (que se corresponde con el tampón de unión) tuviese una fuerza iónica alta y el eluyente B tuviese una fuerza iónica significativamente menor. Se observó que el tampón Tris era particularmente útil para esta estrategia. Se probaron las siguientes condiciones:

Ejecución del proceso	Condiciones del tampón	Gradiente [%B/VC]	Carga [mg/cm ² y mg/ml de Resina]	Rendimiento de la etapa [%]
P225	Eluyente A Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2.7 mS/cm Eluyente B Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 5 mM pH 10,0 Cond. 0,8 mS/cm	2,7 (40% lavado; 40-100% elución)	60/6	76
P226	<u>Eluyente A:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2.7 mS/cm <u>Eluyente B:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 5 mM pH 10,0 Cond. 0,8 mS/cm	2,5 (45% lavado; 45-100% elución)	65/4,5	73
P242	<u>Eluyente A:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2.7 mS/cm <u>Eluyente B:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 5 mM pH 10,0 Cond. 0,8 mS/cm	(0% lavado; 75% elución)	65/4,5	92
P243	<u>Eluyente A:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2.7 mS/cm <u>Eluyente B:</u> Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 4 mM pH 8,3 Cond. 13 mS/cm	(0% lavado; 100% elución)	65/4,5	88

Ejecución del proceso	Condiciones del tampón	Gradiente [%B/VC]	Carga [mg/cm ² y mg/ml de Resina]	Rendimiento de la etapa [%]
P250	Eluyente A: Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2,7 mS/cm Eluyente B: Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 4 mM pH 8,2 Cond. 1,4 mS/cm	(0% lavado; 100% elución)	65/4,5	75
P251	Eluyente A: Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM pH 6,5 Cond. 2,7 mS/cm Eluyente B: Tris 20 mM Bis-Tris 20 mM KCl 4 mM pH 8,1 Cond. 1,3 mS/cm	(0% lavado; 100% elución)	65/4,5	75

5 El eluato de una cromatografía en fase inversa RP que contiene aproximadamente 0,6 mg/ml de PTH1-34 se diluyó en un factor de 2 para reducir el contenido de acetonitrilo. El eluato RP se aplicó a la columna de carga 4,5-6 mg/ml de resina. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de unión (eluyente A). La elución de la resina se realizó con elución isocrática o gradiente de elución.

Se recogieron fracciones de 10 ml. De cada una de las muestras recogidas, se midió la extinción a 220 nm.

10 Como se puede ver en la tabla anterior, El rendimiento del PTH1-34 aumentó significativamente en la elución utilizando un aumento de pH y una disminución de la fuerza iónica. La figura 3 muestra de manera ilustrativa el resultado del proceso de ejecución P250. Se puede observar que el perfil modificado de la elución tiene un efecto tal que el PTH2-34 se eluye en una concentración separada que permite su separación del producto PTH1-34.

Ejemplo 3: Purificación de PTH1-34 en una columna de 26,3 l

15 El método de la invención se probó en una escala preparativa utilizando una columna de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (S) que tiene un volumen de 26,3 l (450 mm de diámetro de columna, 166 mm de altura de columna). La preparación del PTH1-34 utilizado en esta etapa cromatográfica era PTH1-34 expresado recombinantemente que se había sometido previamente a cromatografía en fase inversa (RP). La preparación del PTH1-34 obtenido de la etapa de cromatografía RP contenía aproximadamente un 1,2% de PTH2-34.

20 Para reducir la concentración de acetonitrilo, la fracción principal obtenida de la cromatografía RP se diluyó con eluyente A (Tris 20 mM, dihidrogenofosfato potásico 20 mM, pH 6,5, conductividad de aproximadamente 4,1 mS/cm) a razón 1:2 y se cargó en la columna. La columna se lavó con un gradiente inicial en el intervalo de 0-35% de eluyente B (Tris 20 mM, hidrogeno fosfato dipotásico 16 mM, dihidrogenofosfato potásico 4 mM, pH 8,9, conductividad de aproximadamente 3,5 mS/cm) en un volumen de columna y, en una etapa posterior, con un 35% de eluyente B para 10 volúmenes de columna. El caudal se ajustó a 100 cm/h. La columna se cargó con 3,5 g/l del polipéptido. La elución se realizó con un gradiente del 35-100% de eluyente B en 22 volúmenes de columna.

25 Se observó que el producto PTH1-34 eluía en el pico de lento ascenso mostrado en la Figura 4, mientras que el PTH2-34 eluyó en el área del pico de descenso brusco (es decir, el área mostrada en negro en la Figura 4). Se recogieron fracciones de la concentración para análisis posteriores por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (RP-uHPLC). Se recogió una primera fracción ("fracción 1" formada por 100,7 l) hasta el comienzo de la fracción principal. A continuación de la fracción principal procesada adicionalmente, se recogieron fracciones adicionales comenzando desde el pico máximo. Estas fracciones ("fracciones 2-6), que comprenden diferentes volúmenes (fracción 2: 1,4 (l), fracción 3: 3,7 (l), fracción 4: 8,1 (l), fracción 5: 3,6 l y fracción 6: 9,7 (l), se recogieron del área del pico descendente.

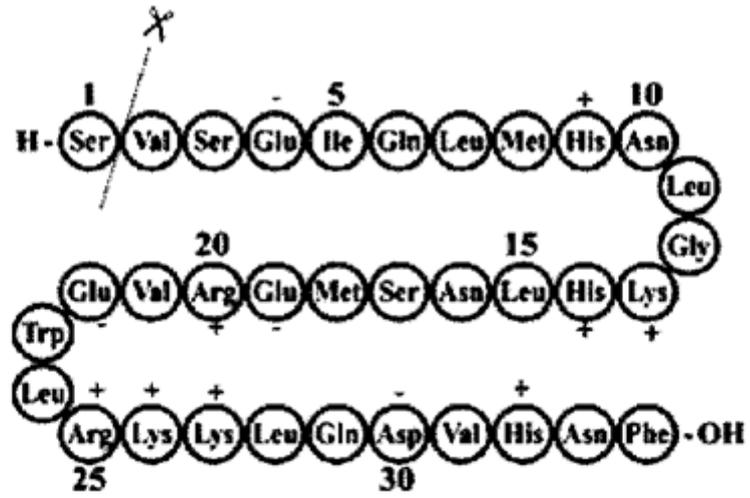
35 Los resultados de la RP-uHPLC se muestran en la figura 5. Se puede ver que la preparación inicial del PTH1-34 obtenida de la cromatografía RP contenía aproximadamente un 1,2 % de PTH2-34, mientras que la fracción 1 recogida después de la cromatografía de intercambio catiónico contenía solo aproximadamente el 0,1 % del polipéptido truncado. Casi la totalidad del PTH2-34 eluyó en las fracciones 3-6, es decir, en el área del pico descendente. Se cargaron un total de 62,9 g de PTH1-34 en la columna de intercambio catiónico. El proceso cromatográfico produjo 54,0 g del PTH1-34, lo que representa una recuperación del 86%.

40 A partir de estos resultados, se puede entonces concluir que el método de la presente invención es altamente eficaz para separar el PTH1-34 del PTH2-34 a una escala preparativa sin pérdida significativa del PTH1-34. El método es, por tanto, adecuado para su uso en la producción del PTH1-34 a gran escala.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar teriparatida (PTH1-34) mediante cromatografía de intercambio iónico, que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto un fluido que comprende el PTH1-34 con un material de intercambio catiónico en condiciones que permitan la unión reversible del PTH1-34 a dicho material de intercambio catiónico;
 - (b) opcionalmente, lavar el material de intercambio catiónico para eliminar el material no unido;
 - (c) eluir el PTH1-34 mediante el aumento del pH y la disminución de la fuerza iónica.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho PTH1-34 es PTH1-34 producido de manera recombinante.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho PTH1-34 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que difiera de la SEQ ID NO: 1 en la sustitución de 1, 2, o 3 aminoácidos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho material de intercambio catiónico comprende grupos de intercambio sulfoetilo, sulfopropilo, sulfobutilo o sulfoisobutilo.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho material de intercambio catiónico contiene poliestiroldivinilbenzol, polimetacrilato, éter de polivinilo, celulosa, o dextrano.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el eluato obtenido en la etapa (c) contiene menos del 0,5% (p/p) del fragmento PTH2-34.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la unión a dicho material de intercambio catiónico se efectúa a un pH de entre 6,3 y 6,7.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la unión a dicho material de intercambio catiónico se efectúa en presencia de un tampón de unión que contenga Tris 10-80 mM, preferentemente Tris 20 mM.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la elución a partir de dicho material de intercambio catiónico se efectúa en presencia de un eluyente que contenga Tris 10-80 mM, preferentemente Tris 20 mM.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el aumento de pH y/o la disminución de la fuerza iónica se efectúa mediante el uso de un gradiente lineal, cóncavo o convexo.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el aumento en el pH y/o la disminución de la fuerza iónica se efectúa utilizando una etapa de elución.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dicho tampón de unión tiene una fuerza iónica en el intervalo de 1,8 a 3,0 mS/cm.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho eluyente tiene una fuerza iónica en el intervalo de 0,2 a 1,2 mS/cm.
14. Un método para preparar teriparatida (PTH1-34), que comprende las etapas de
 - (a) expresar de manera recombinante el PTH1-34 en una célula hospedadora;
 - (b) opcionalmente, romper las células hospedadoras para liberar el PTH1-34 expresado de manera recombinante;
 - (c) purificar el PTH1-34 mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
15. El método de la reivindicación 14, en donde dicha célula hospedadora es una célula hospedadora procariota.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, en donde el método comprende una o más etapas adicionales previas o posteriores a la etapa (c).

a



b

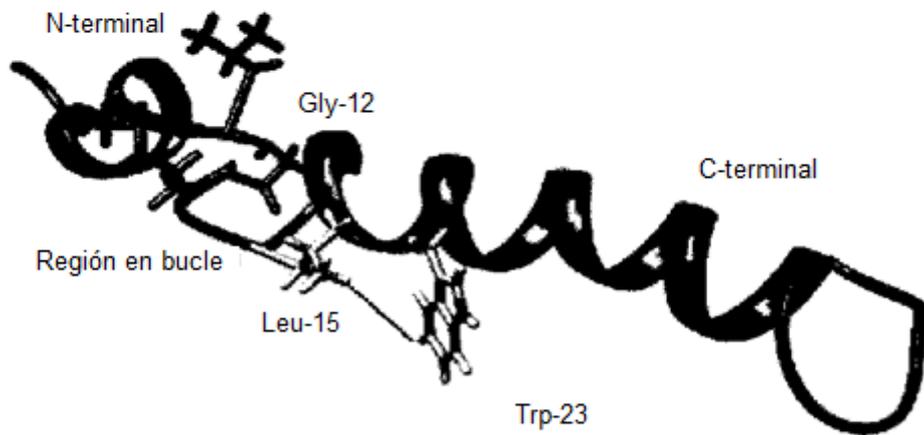


Fig. 1

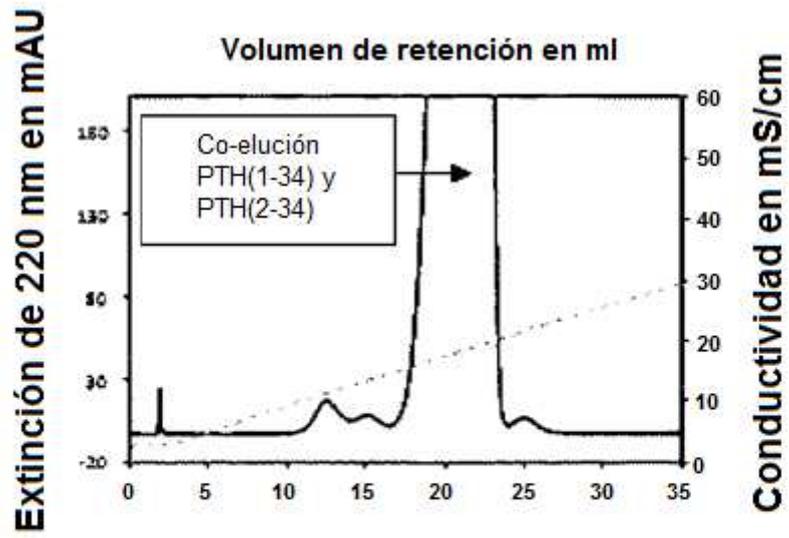


Fig. 2

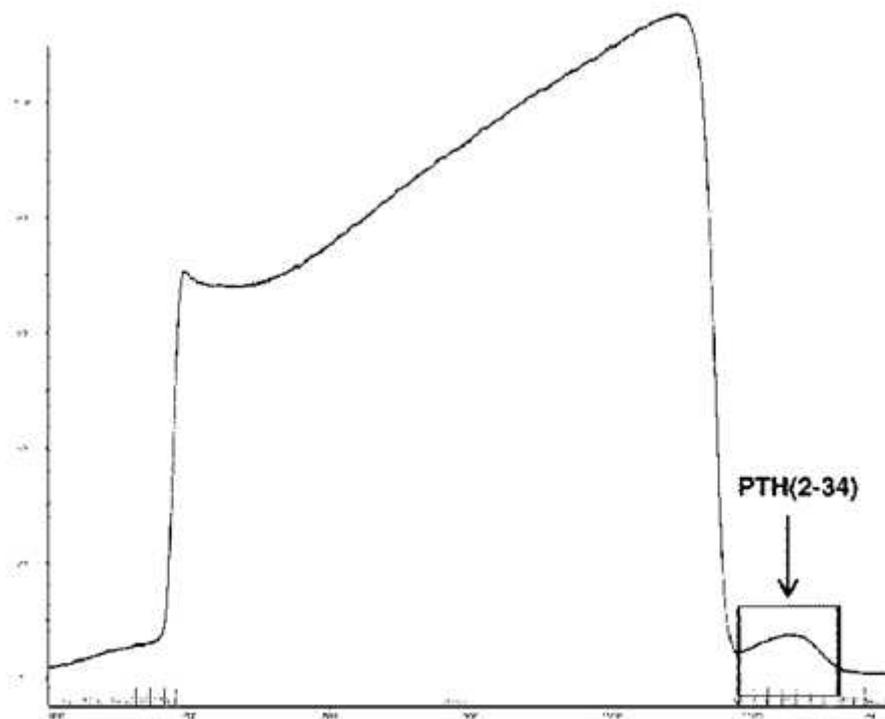


Fig. 3

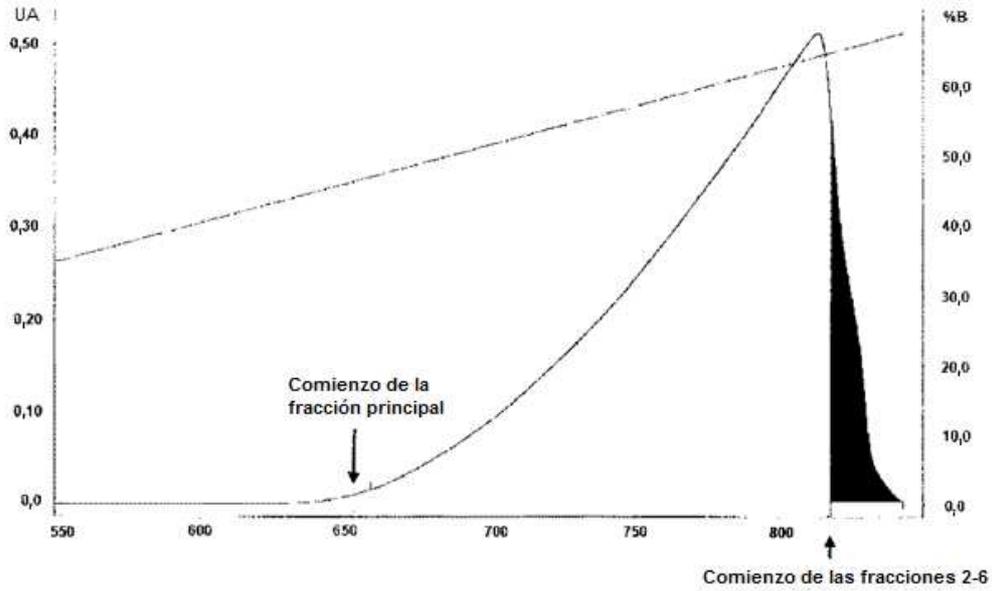


Fig. 4

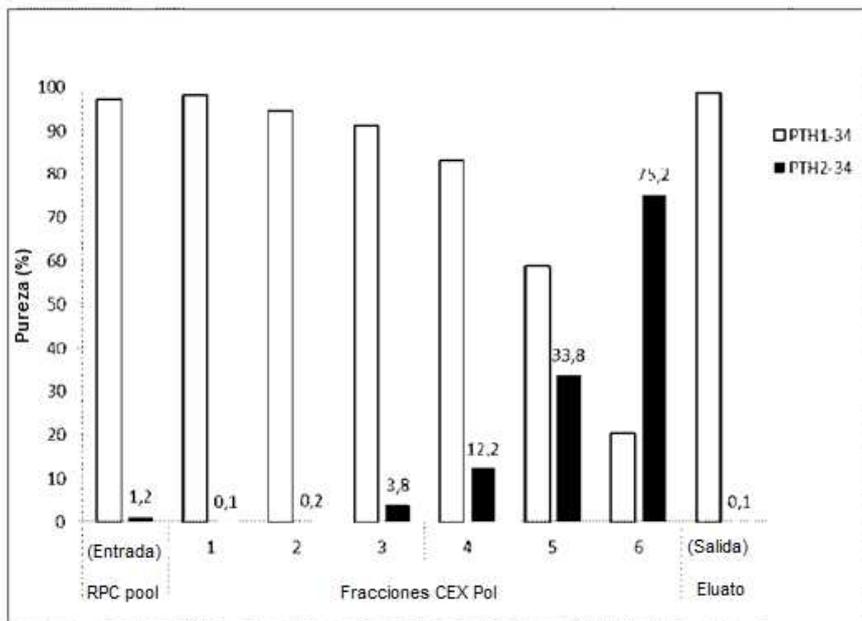


Fig. 5