

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 231**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2013 PCT/EP2013/055531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068603**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2013 E 13709470 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2828287**

54 Título: **Métodos para replegar G-CSF a partir de cuerpos de inclusión**

30 Prioridad:

**19.03.2012 HU P1200172**

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

**18.04.2018**

73 Titular/es:

**RICHTER GEDEON NYRT. (100.0%)  
Gyömrői út 19-21  
1103 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**FELFÖLDI, FERENC;  
BALLAGI, ANDRAS y  
BÉCSI, JÁNOS**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 664 231 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

Métodos para replegar G-CSF a partir de cuerpos de inclusión

5 **Campo de la invención**

La presente invención tal como se reivindica se refiere a métodos nuevos para replegar G-CSF (factor estimulante de colonias) a partir de cuerpos de inclusión. En particular, se refiere a un método que comprende dos etapas de replegamiento. La invención se refiere a un método para replegar G-CSF mediante (a) solubilización de G-CSF, (b) replegamiento oxidativo (primera etapa de replegamiento, en presencia de agente solubilizante), (c) eliminación del agente solubilizante y (d) una segunda etapa de replegamiento (en ausencia de agente solubilizante). Además, la presente invención se refiere a métodos nuevos para eliminar el agente solubilizante.

15 **Antecedentes de la invención**

El factor de crecimiento hematopoyético endógeno, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, sinónimo "factor de estimulación de colonias 3" = CSF3) regula la proliferación y diferenciación de células progenitoras dentro de la médula ósea y la liberación de granulocitos neutrófilos maduros ("neutrófilos") en la sangre periférica. La quimioterapia contra el cáncer, que afecta a células que se dividen rápidamente, conduce con frecuencia a un efecto secundario denominado "neutropenia". La neutropenia es una disminución en los recuentos de neutrófilos en la sangre periférica y afecta a más de uno de cada tres pacientes que reciben quimioterapia mielosupresora para el cáncer. Los pacientes que llegan a tener neutropenia pueden desarrollar fiebre ("neutropenia febril") y tienen un mayor riesgo de padecer infecciones. Se producen infecciones gastrointestinales y pulmonares mortales, así como la sepsis. Puede ser necesario retrasar un ciclo posterior de quimioterapia hasta que el paciente se haya recuperado de la neutropenia. El G-CSF recombinante humano es una sustancia farmacéutica eficaz y se aplica ventajosamente para tratar la neutropenia inducida por quimioterapia. Restablece el número de neutrófilos en la sangre y lo mantiene por encima del nivel crítico (Dale 2002).

El G-CSF humano natural es una proteína O-glicosilada que consiste en 174 aminoácidos y es relativamente hidrófoba. La cadena de hidratos de carbono en la forma glicosilada se sitúa en la treonina 133. Además de esta forma principal, puede producirse otra forma de empalme *in vivo* que lleva tres aminoácidos adicionales (Zsebo 1986). Cuando se expresa G-CSF recombinante humano en *E. coli*, lo siguiente puede observarse: en primer lugar, la proteína recombinante se produce en cuerpos de inclusión; en segundo lugar, la molécula de G-CSF resultante está desprovista de la cadena de hidratos de carbono natural, y en tercer lugar, el G-CSF recombinante lleva una metionina N-terminal adicional. Esta molécula de G-CSF, designada N-metionil-G-CSF o rmet(hu)G-CSF, recibió la denominación común internacional (INN) "filgrastim" y tiene un peso molecular de 18,7-18,9 kD (Welte 1996). La masa relativa teórica de filgrastim (Mr) es 18,799. La cadena de polipéptido de G-CSF contiene cinco cisteínas y las investigaciones estructurales con filgrastim revelaron dos enlaces disulfuro entre Cys 37-43 y Cys 65-75, mientras que la Cys 18 no apareada permanece reducida (Wingfield 1988). El primer producto en el mercado fue Neupogen® de Amgen que contenía filgrastim, un met-G-CSF recombinante humano expresado por *E. coli* (Welte 1996). Otro producto de G-CSF, aprobado en la Unión Europea, Granocyte® de Chugai, que contiene lenograstim, se deriva de células de mamífero recombinantes (CHO) y está glicosilado (Holloway 1996). Además, Amgen introdujo en el mercado en 2002 una versión mejorada de G-CSF, Neulasta®, que consiste en un conjugado de filgrastim y polietilenglicol (INN = pegfilgrastim) (Molineux 2004). Finalmente, se introdujeron en el mercado europeo varias versiones biosimilares de Neupogen® por parte de diferentes empresas farmacéuticas de medicamentos genéricos durante los últimos años.

La sobreexpresión de polipéptidos recombinantes heterólogos en microorganismos transformados a menudo da como resultado la formación de los denominados cuerpos de inclusión (IB), que contienen la proteína recombinante. Estos cuerpos de inclusión son agregados amorfos y altamente refringentes y los polipéptidos en los mismos están generalmente sin plegar, reducidos e inactivos, y son al menos parcialmente insolubles en tampones acuosos comunes. Los procedimientos para obtener proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión se describen en la técnica y comprenden generalmente lisis y disrupción de las células seguido por centrifugación. El sedimento que comprende una gran proporción de cuerpos de inclusión se lava habitualmente con detergentes para eliminar membranas lipídicas, lipopolisacáridos (LPS) y otros contaminantes o residuos celulares.

La bibliografía científica proporciona muchos métodos de cómo tales cuerpos de inclusión pueden aislarse a partir de bacterias y purificarse, y cómo la proteína recombinante después de eso puede solubilizarse y replegarse de vuelta a su estado nativo. (Los términos 'replegamiento' y 'renaturalización' se usan como sinónimos en el presente documento).

Se han usado diferentes estrategias para solubilizar la proteína recombinante. Además de detergentes iónicos y no iónicos, tales como dodecil sulfato de sodio (SDS) o N-laurilsarcosina (sarcosilo), se han usado reactivos caotrópicos, tales como clorhidrato de guanidina (GuHCl) o urea, para solubilizar una proteína de interés. A menudo la solubilización se realiza en condiciones alcalinas (pH 8-12,5) en presencia de agentes reductores, tales como ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE) o 2-mercaptoetanol (ME) (Marston 1986, Rudolph 1990, Rudolph 1996, Dietrich

2003). Normalmente, la proteína solubilizada está al principio totalmente reducida e inactiva; y después se somete a repliegamiento antes de la purificación cromatográfica.

Por ejemplo, el documento EP0219874 divulga métodos genéricos para el repliegamiento de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Para la solubilización, se usaron los agentes caotrópicos GuHCl y arginina a pH elevado. El documento EP0219874 describe la formación de puentes disulfuro en condiciones rédox proporcionados por GSH/GSSG. Rudolph 1990 describe la siguiente secuencia de etapas: a) el uso de GuHCl o urea para la solubilización a pH 8-9 en condiciones reductoras (DTT, DTE o 2-ME), b) eliminación de reactivos mediante diálisis o cromatografía de gel (Sephadex G-25) y c) formación de disulfuro (=replegamiento) mediante sistemas de permutación de óxido o mediante modificación química inversa de tioles de proteínas, ambos basados en el efecto de GSH/GSSG añadido. Otra revisión (Rudolph 1996) puso énfasis en los aditivos usados durante el repliegamiento que pueden afectar a la solubilidad y estabilidad de la proteína desplegada, los productos intermedios de plegamiento y la proteína plegada nativa. Los autores sugieren un protocolo básico genérico para la solubilización y repliegamiento: solubilización con GuHCl 6 M y DTT 100 mM a pH 8. Se eliminan agentes reductores mediante diálisis y se ajusta el pH a 4,5. Se realiza plegamiento mediante dilución elevada (1:200) en un tampón con EDTA y GSH/GSSG, a pH de 7,5 a 8,5.

Dietrich 2003 describe la solubilización de proteínas a partir de cuerpos de inclusión *E. coli* con GuHCl 6 M en condiciones reductoras (DTE). La incubación de repliegamiento se definió a pH 9 en arginina 1 M en presencia de GSH/GSSG. Se realizó purificación final usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) seguido por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) usando SP Sepharose. Una nota de aplicación disponible de GE Healthcare 2007 (nota de aplicación 18-1112-33, 1-4) también revisó protocolos generales. La solubilización se recomienda con urea 8 M o GuHCl 6 M. Se mencionó el repliegamiento como diálisis lenta o dilución cercana a pH neutro. Alternativamente puede usarse una etapa cromatográfica para el repliegamiento. Los métodos cromatográficos sugeridos comprenden cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de intercambio iónico (IEX) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) que se sugiere en lugar de diálisis o dilución. El documento WO00/02901 describe un método general para replegar aplicando alta presión dentro de un tanque de repliegamiento. Opcionalmente, están presentes agentes caotrópicos y/o compuestos rédox (DTT/GSSG) en los tampones de repliegamiento.

Desde los años 80, existe una historia larga de desarrollo de métodos para producir G-CSF recombinante biológicamente activo. La mayoría de las publicaciones describen la producción en *E. coli*. En este huésped, G-CSF se expresa bien y se acumula normalmente en cuerpos de inclusión. Otros sistemas de expresión usados fueron, por ejemplo, células CHO (Holloway 1994), células humanas (documento WO01/04154), o levadura (documento US5055555). Zsebo 1986 describió la solubilización de G-CSF con sarcosilo al 2% y la purificación de G-CSF soluble mediante cromatografías AEX y CEX. El documento WO87/01132 describe G-CSF humano derivado de *E. coli* (filgrastim). Se describieron dos métodos alternativos para el repliegamiento/purificación: procedimiento 1): se solubilizó G-CSF con ácido láurico al 1% (un ácido graso C15 saturado) y se oxidó con  $\text{CuSO}_4$  40  $\mu\text{M}$  seguido por purificación por HPLC de un material C4. Procedimiento 2): se realizó solubilización con sarcosilo al 2% y oxidación con  $\text{CuSO}_4$  20  $\mu\text{M}$ . El G-CSF se precipitó con acetona, se solubilizó de nuevo con GuHCl 6 M y se desplegó por esta condición. Tras la eliminación de GuHCl mediante cromatografía de gel (Sephadex G-25, una etapa de repliegamiento), la posterior cromatografía fue CEX (CM-celulosa) seguido por una cromatografía de exclusión molecular final (SEC, Sephadex G-75). Se usó un agente solubilizante por Devlin 1988, que solubilizó el IB-sedimento con SDS al 10% y purificó el G-CSF cargado con SDS mediante SEC (Sephacryl S-200 en SDS al 0,1%) seguido por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC, Vydac C4).

Estas publicaciones tempranas se centraron en construir sistemas de expresión adecuados y obtener sustancia purificada para caracterización adicional de G-CSF, en vez de proporcionar procedimientos de repliegamiento y purificación adecuados para la producción comercial a gran escala de G-CSF recombinante. Se publicó un procedimiento más avanzado en el documento WO89/10932, que describe métodos para la purificación de G-CSF humano y bovino a partir de IB de *E. coli*. Los IB se trataron con detergentes (desoxicolato) para extraer contaminantes. Se usó sarcosilo para solubilizar G-CSF. Se realizó oxidación con  $\text{CuSO}_4$ . Se describieron procedimientos adicionales en Lu 1992 y Heidari 2001.

Se han publicado varias alternativas a los métodos anteriores para la solubilización y repliegamiento oxidativo, incluyendo el método del documento WO89/10932 usando sarcosilo al 2%/  $\text{CuSO}_4$  40  $\mu\text{M}$ . La mayoría de estas estrategias siguieron el enfoque general clásico de solubilización (Marston 1986, Rudolph 1990, Rudolph 1996, véase lo anterior), usando desnaturizantes fuertes tales como GuHCl y urea, rompiendo completamente enlaces de hidrógeno en condiciones reductoras a pH alcalino. Especialmente, las publicaciones más recientes preferían el repliegamiento de G-CSF solubilizado con GuHCl o urea. Por ejemplo, Wingfield 1988 describe la purificación de un G-CSF de tipo natural y una muteína de IB de *E. coli*. Se realizó la solubilización con GuHCl 6 M. Se realizó una primera purificación con proteína desplegada en SEC (Sephacryl S200) en presencia de GuHCl 4 M. Entonces se oxidó G-CSF y se replegó mediante diálisis contra urea 3 M y se purificó adicionalmente con CEX (CM-Sepharose) y SEC (Ultrogel AcA54). Un artículo de Kang 1998 describió la expresión de N-met-hu-G-CSF en IB de *E. coli*. G-CSF se solubilizó con urea 2 M en condiciones alcalinas. Se inició el repliegamiento mediante dilución e incubación durante 16 h a temperatura ambiente. Luego se redujo el pH a pH 5,5 y se eliminaron los precipitados emergentes.

Se realizaron dos cromatografías posteriores, una etapa de CEX (SP Sepharose) se siguió por una etapa de cromatofocalización (PBE94) usando politampones. El documento WO98/53072 divulga un G-CSF que lleva un péptido líder pequeño en el extremo N-terminal que se expresó en *E. coli* sin escisión del péptido señal y por tanto se acumuló en IB. Se realizó solubilización en urea 8 M en condiciones reductoras (DTT 10 mM). El G-CSF solubilizado se sometió a AEX (DEAE-Sepharose) seguido por SEC (Sephacryl 200). Se describió un replegamiento oxidativo que comprendía una incubación más bien corta en presencia de GSH 2 mM. En otra publicación (Wang 2005) los cuerpos de inclusión se solubilizaron con urea 8 M en presencia de 2-ME 100 mM y EDTA 5 mM a pH 8. Se realizó un replegamiento unido a matriz durante la posterior cromatografía AEX (Q-Sepharose). G-CSF se unió a la columna y mientras permanece unido, se redujo la concentración de urea en la fase móvil. El tampón contenía GSH/GSSG y el G-CSF eluido era biológicamente activo. Métodos adicionales se describen en los documentos WO01/87925 y WO2004/015124. El documento WO2004/001056 divulga un método que comprende una primera incubación a pH 8 durante 6 horas seguido por una segunda incubación a pH 4-5 durante 6-8 horas. El documento WO2006/097944 describe que se solubilizan IB con urea o GuHCl (2-6 M) a pH alcalino (8-11) y se realizó el replegamiento tras dilución a pH ácido durante 6-16 h a temperatura ambiente. El documento WO2006/135176 trata con muteínas de G-CSF que se purificaron para pegilación posterior. Se expresaron las variantes de G-CSF en *E. coli* y se solubilizaron a partir de IB usando urea 8 M a pH 11. Se realizó replegamiento diluyendo a urea 2 M y glicina 50 mM y se incubó a pH 9 durante la noche. El documento EP1630173 divulga métodos para aislar y replegar G-CSF (filgrastim) a partir de IB de *E. coli*. Los métodos se basan en la extracción con desnaturalizantes, preferiblemente GuHCl. Se realizó replegamiento en presencia de GSH/GSSG, pH elevado y bajas temperaturas. El documento EP1837346 describe métodos para aislar, replegar y purificar G-CSF (filgrastim) expresado en IB de *E. coli*. Se usó GuHCl para la solubilización y se realizó el replegamiento en presencia de GSH. Se aplicó una posterior cromatografía de gel (Sephadex G-25) para la eliminación de desnaturalizantes y tampón.

Rao 2008 describe un procedimiento para la producción de G-CSF a partir de IB de *E. coli*. Se disolvieron los IB en urea 2M en presencia de cisteína 25 mM a valores de pH inusualmente elevados (pH 12-12,8). Se describieron métodos similares para la solubilización, el replegamiento y la purificación de G-CSF (filgrastim) por Vanz 2008. Khalilzadeh 2008 sugirió modificaciones para el método usando sarcosilo/CuSO<sub>4</sub> descrito anteriormente. La solubilización de IB lavados se realizó con urea 8 M. Se realizó replegamiento mediante diálisis por etapas para reducir la urea desde 8 M hasta 0 M. La concentración de CuSO<sub>4</sub> osciló entre 5 y 60 mM, y se mostró un óptimo para 40 μM. La secuencia cromatográfica consiste en tres etapas, AEX (DEAE) seguido por HIC (Butil) y una SEC final (Sephadex G-25). El documento WO2008/096370 también describe el replegamiento y la purificación de huG-CSF a partir de IB de *E. coli*. Se solubilizó G-CSF con urea en presencia de DTT y se elevó el pH hasta pH 12-12,5. Finalmente, el documento WO2010/146599 divulga la solubilización de G-CSF con GuHCl 6 M y reducción con DTT. Para el replegamiento, se compuso un tampón complejo que consistía en urea 2 M, arginina 0,1 M, sacarosa al 10%, EDTA 2 mM y que incluía agentes de permutación de óxido tales como Na 10 mM-ascorbato/dihidroascorbato/DTT o GSH/GSSG o cisteína/cistina (rédox).

Existe una necesidad continua de métodos nuevos para obtener G-CSF a partir de cuerpos de inclusión.

#### 40 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a métodos nuevos para el replegamiento de factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante (G-CSF) extraído a partir de cuerpos de inclusión en moléculas biológicamente activas. Los métodos comprenden la solubilización de GCSF con un agente solubilizante, la oxidación y replegamiento parcial de G-CSF en presencia de un agente solubilizante de este tipo, la eliminación eficaz del agente solubilizante, y la finalización de replegamiento en ausencia de un agente solubilizante. Se divulgan diversos métodos para separar el agente solubilizante del G-CSF parcialmente replegado.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la combinación de dos etapas de replegamiento aumenta el rendimiento para G-CSF correctamente plegado de forma significativa.

Se divulgan nuevos métodos para el replegamiento de factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante (G-CSF) a partir de cuerpos de inclusión. Los métodos comprenden dos etapas de replegamiento. En particular, los métodos comprenden la solubilización de G-CSF con un agente solubilizante, el replegamiento oxidativo (primera etapa de replegamiento) de G-CSF en presencia del agente solubilizante y un agente oxidante, la eliminación eficaz del agente solubilizante, y una segunda etapa de replegamiento para completar el plegamiento de G-CSF en ausencia del agente solubilizante. Se describen diversos métodos para la eliminación eficaz del agente solubilizante de G-CSF parcialmente replegado. La divulgación proporciona además procedimientos para la posterior purificación de G-CSF replegado usando cromatografía de intercambio iónico.

La invención proporciona:

[1] Un método para replegar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de cuerpos de inclusión, que comprende:

a) solubilizar G-CSF en presencia de un agente solubilizante;

- b) realizar una primera etapa de replegamiento y oxidación, que comprenden incubar el G-CSF solubilizado en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante;
- 5 c) eliminar el agente solubilizante mediante adsorción con resina de intercambio iónico y/o cromatografía de intercambio iónico, y realizar opcionalmente una precipitación con ácido; y
- d) realizar una segunda etapa de replegamiento, que comprende diluir con un tampón de baja conductividad, o más preferiblemente agua, e incubar el G-CSF de la etapa (c),
- 10 en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza en un tampón de baja conductividad que tiene una conductividad de al menos por debajo de 2 mS/cm y durante más de 12 horas.
- [2] El método según [1], en el que los cuerpos de inclusión son de un microorganismo, preferiblemente de *E. coli*.
- 15 [3] El método según [1] o [2], en el que el G-CSF es metionil-G-CSF recombinante bovino o humano.
- [4] El método según uno cualquiera de [1] a [3], en el que el agente solubilizante es N-lauroilsarcosina.
- 20 [5] El método según uno cualquiera de [1] a [4], en el que el agente oxidante es CuSO<sub>4</sub>.
- [6] El método según uno cualquiera de [1] a [5], en el que la solubilización de G-CSF se realiza a un valor de pH mayor que pH 7.
- 25 [7] El método según uno cualquiera de [1] a [6], en el que el agente solubilizante es N-lauroilsarcosina a una concentración del 0,5% al 1,5%.
- [8] El método según uno cualquiera de [1] a [7], en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza durante al menos dos horas.
- 30 [9] El método según uno cualquiera de [1] a [8], en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza con flujo de aire y sin enfriamiento.
- [10] El método según uno cualquiera de [1] a [9], en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza a un valor de pH de 7-9 y/o a una temperatura de 20-28°C y/o durante 15-25 horas.
- 35 [11] El método según uno cualquiera de [1] a [10], en el que la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) comprende: AEX y CEX, opcionalmente en este orden.
- 40 [12] El método según uno cualquiera de [1] a [11], en el que la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) comprende:
- a) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o
- 45 b) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo y/o,
- c) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo directo.
- 50 [13] El método según uno cualquiera de [1] a [12], en el que el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:
- 55 (i) AEX,
- (ii) precipitación con ácido,
- (iii) AEX, y
- 60 (iv) CEX.
- [14] El método según uno cualquiera de [1] a [13], en el que el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:
- 65 a) unión del agente solubilizante a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF

con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración;

b) precipitación de impurezas reduciendo el pH por debajo de pH 5 y mediante la eliminación del precipitado por filtración;

5 c) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que el agente solubilizante residual se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo;

10 d) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante residual permanece en el flujo directo; y

e) elución de G-CSF unido de la resina de intercambio catiónico mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados.

15 [15] El método según uno cualquiera de [1] a [14], en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza en condiciones de refrigeración.

20 [16] El método según uno cualquiera de [1] a [15], en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza a una temperatura de 2-8°C y/o durante al menos 24 horas.

[17] El método según uno cualquiera de [1] a [16], en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza a un valor de pH por encima de pH 7.

25 [18] El método según uno cualquiera de [1] a [17], en el que el método comprende además una etapa de pulido, que comprende una o más cromatografías de intercambio iónico en las que opcionalmente la una o más cromatografías de intercambio iónico en la etapa de pulido comprende(n) una cromatografía de intercambio aniónico seguida por una cromatografía de intercambio catiónico.

30 [19] El método de [18], en el que la una o más cromatografías de intercambio iónico comprende(n) las siguientes etapas:

a) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;

35 b) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con un pH disminuido o una concentración de sal aumentada;

c) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;

40 d) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados;

caracterizado porque los polímeros de estructura principal de las resinas de intercambio aniónico y catiónico, ambos comprenden derivados de metacrilato.

45 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para replegar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de cuerpos de inclusión, que comprende:

a) solubilizar G-CSF en presencia de un agente solubilizante;

50 b) realizar una primera etapa de replegamiento y oxidación, que comprende incubar el G-CSF solubilizado en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante;

55 c) eliminar el agente solubilizante mediante adsorción con resina de intercambio iónico y/o cromatografía de intercambio iónico, y realizar opcionalmente una precipitación con ácido; y

d) realizar una segunda etapa de replegamiento, que comprende diluir e incubar el G-CSF de la etapa (c) en ausencia de agente solubilizante.

60 Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse de un microorganismo, preferiblemente de *E. coli*. El G-CSF puede ser G-CSF recombinante bovino o humano, puede ser metionil-G-CSF bovino o humano. El agente solubilizante puede ser N-lauroilsarcosina. El agente oxidante puede ser CuSO<sub>4</sub>. La solubilización de G-CSF puede realizarse a un valor de pH mayor que pH 7.

65 En algunas realizaciones, el agente solubilizante es N-lauroilsarcosina a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5%.

En alguna realización, la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza durante al menos dos horas. En algunas realizaciones, la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza con flujo de aire y sin enfriamiento. En algunas realizaciones la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza a un valor de pH de aproximadamente 7-9 y a una temperatura de aproximadamente 20-28°C durante aproximadamente 15-25 horas.

5 En algunas realizaciones, la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) anterior comprende: AEX (intercambio aniónico) y CEX (intercambio catiónico), opcionalmente en este orden. En algunas realizaciones, la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) anterior comprende:

10 a) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o

b) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo y/o,

15 c) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo directo.

20 En algunas realizaciones, el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas: AEX, precipitación con ácido, AEX, y CEX.

En algunas realizaciones, el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:

25 a) unión del agente solubilizante a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración;

b) precipitación de impurezas reduciendo el pH por debajo de pH 5 y mediante la eliminación del precipitado por filtración;

30 c) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que el agente solubilizante residual se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo;

35 d) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante residual permanece en el flujo directo; y

e) elución de G-CSF unido de la resina de intercambio catiónico mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados.

40 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la segunda etapa de replegamiento se realiza en un tampón de baja conductividad y/o en condiciones de refrigeración y/o durante más de 12 horas. En algunas realizaciones, la segunda etapa de replegamiento se realiza a una conductividad por debajo de 2,0 mS/cm, y/o a una temperatura de aproximadamente 2-8°C y/o durante al menos 24 horas. En algunas realizaciones, la segunda etapa de replegamiento se realiza a un valor de pH por encima de pH 7. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además una etapa de pulido, que comprende una o más cromatografías de intercambio iónico. La una o más cromatografías de intercambio iónico en la etapa de pulido pueden comprender una cromatografía de intercambio aniónico seguida por una cromatografía de intercambio catiónico.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la purificación de G-CSF y/o eliminación de un agente solubilizante usado para la solubilización de G-CSF a partir de cuerpos de inclusión que comprende las siguientes etapas:

55 a) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;

b) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con un pH disminuido o una concentración de sal aumentada;

60 c) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;

d) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados;

65 caracterizado porque los polímeros de estructura principal de las resinas de intercambio aniónico y catiónico, ambos comprenden derivados de metacrilato.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos nuevos tal como se reivindica para replegar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, proporciona métodos nuevos tal como se reivindica para obtener G-CSF activo a partir de cuerpos de inclusión a alto rendimiento, lo que permite la producción industrial de G-CSF purificado.

Un objetivo de la presente invención era proporcionar un procedimiento de producción eficaz a una escala industrial para un principio activo de G-CSF recombinante de alta pureza (hasta grado farmacéutico), considerando las necesidades de calidad, economía y regulatorias. La presente invención proporciona un método nuevo tal como se reivindica para replegar y purificar G-CSF recombinante expresado en cuerpos de inclusión.

La técnica anterior describe varios métodos para solubilizar y replegar G-CSF a partir de cuerpos de inclusión. Tal como se señaló anteriormente (véanse los Antecedentes) la técnica anterior sobre la solubilización y el replegamiento de proteínas de IB (y en particular con respecto a G-CSF) puede dividirse en dos diferentes estrategias principales. El enfoque más clásico es el uso de un agente caotrópico fuerte (desnaturalizante) tal como urea o GuHCl, normalmente en condiciones reductoras y pH alcalino. La segunda estrategia, que también se usa comúnmente en el campo, es el uso de un surfactante fuerte, tal como sarcosilo o ácido laúrico para solubilización. Esporádicamente, también se describió el uso de dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente iónico fuerte, para la solubilización de G-CSF (Devlin 1988).

Cada uno de los métodos de la técnica anterior tiene determinadas desventajas. Tal como se demuestra en experimentos realizados por los inventores, SDS como agente solubilizante no era adecuado porque una eliminación eficaz era difícil, si no imposible. Por ejemplo, cuando se elimina SDS mediante cromatografía en hidroxapatita cerámica (CHT), cantidades traza de SDS permanecieron unidas a la proteína. SDS no pudo eliminarse completamente. La solubilización con GuHCl (Wingfield 1988, Dietrich 2003, documentos WO2006/097944, EP16301273, EP1837346, WO2010/146599) es problemática por otros motivos. Aunque GuHCl puede eliminarse por diálisis o cromatografía de gel, el método de solubilización de GuHCl requiere posteriormente grandes volúmenes provocado por la necesidad de una fuerte dilución para evitar la agregación de productos intermedios de plegamiento (Rudolph 1990, Rudolph 1996) durante la incubación de replegamiento. Se describieron diluciones de hasta 1:200 (Rudolph 1996). En los métodos de GuHCl sometidos a prueba por los inventores, se confirmó el requisito de una fuerte dilución y se requirió al menos una razón de dilución de 1:50 para rendimientos óptimos usando el método de GuHCl. Este tipo de solubilización requeriría grandes tanques de acero inoxidable para procedimientos a gran escala, lo que no resulta económico.

En lugar de GuHCl, se ha descrito otro desnaturalizante, urea, para su uso en la solubilización de G-CSF. Se aplicaron concentraciones casi saturadas tales como urea 8 M en la técnica anterior (documentos WO98/53072, WO01/87925, WO2006/135176, Khalilzadeh 2008, WO2008096370). Los mismos problemas que los comentados con respecto a GuHCl se aplican también a la urea. Además, el experto en la técnica conoce bien que la presencia de urea, especialmente a pH alcalino, puede favorecer una modificación de proteínas no deseada, tal como desamidación. Además, la presencia de ácido isocianico, que puede generarse a partir de cianato de amonio (que está siempre en equilibrio con urea en disolución), da como resultado la carbamitación de grupos amino primarios (Rudolph 1996). Finalmente, también se ha descrito en la técnica que puede haber un beneficio para el rendimiento cuando el inhibidor de la agregación arginina está presente como codesnaturalizante en alta concentración durante el replegamiento (documento EP0219874, Rudolph 1996, Dietrich 2003). Sin embargo, la arginina es un reactivo costoso y sería económicamente deseable abandonar el uso de arginina.

Tal como se mencionó anteriormente, el surfactante sarcosilo también puede usarse para la solubilización de G-CSF a partir de IB. Preferiblemente, se usó sarcosilo al 2% (Zsebo 1986, documentos WO8701132, WO8910932, Lu 1992, Heidari 2001). El sarcosilo es un tensioactivo aniónico con buena solubilidad. Una ventaja de usar sarcosilo es el menor factor de dilución (2 veces en lugar de 50-200 veces para GuHCl/urea) requerido durante la posterior incubación de replegamiento. Otra ventaja es la producción relativamente baja de productos químicos de residuo para el medio ambiente. Sin embargo, cuando se usa el método originalmente descrito, los presentes inventores observaron en sus experimentos rendimientos más bien bajos tras el replegamiento en relación con una variación elevada entre lotes. Surfactantes como el sarcosilo facilitan generalmente la solubilización aumentando la solubilidad de proteínas en general. Puesto que el sarcosilo no desnaturaliza y despliega proteínas como hacen los agentes caotrópicos, proteínas de IB plegadas inicialmente de manera incorrecta no pueden replegarse más tarde; por tanto, el rendimiento debe ser menor cuando se compara con el método de GuHCl/urea.

La presente invención supera las desventajas de la técnica anterior.

Los presentes inventores proporcionan un nuevo método para obtener G-CSF replegado, que aborda los problemas asociados con los métodos de la técnica anterior. Se encontró sorprendentemente que usando una primera etapa de replegamiento oxidativo en presencia de un agente solubilizante, seguido por una etapa de eliminación eficaz del agente solubilizante (por ejemplo, mediante adsorción de resina de intercambio iónico y/o precipitación con ácido y/o cromatografía de intercambio iónico), seguido por una segunda etapa de replegamiento que comprende diluir el G-

CSF e incubarlo en ausencia de agente solubilizante, pueden obtenerse rendimientos aumentados de G-CSF soluble monomérico, es decir, mediante los métodos descritos en el presente documento, se obtiene G-CSF replegado. La presente invención se refiere, por tanto, a métodos nuevos para producir G-CSF biológicamente activo a partir de precursores inactivos en cuerpos de inclusión. La sobreexpresión de polipéptidos recombinantes heterólogos en microorganismos a menudo da como resultado la formación de cuerpos de inclusión, en los que los polipéptidos se despliegan, se reducen y son inactivos, y al menos parcialmente insolubles en tampones acuosos comunes. En el presente documento se divulgan métodos nuevos para el replegamiento de factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante (G-CSF) a partir de cuerpos de inclusión. Particularmente, esta invención se refiere a un nuevo método de replegamiento que comprende dos etapas de replegamiento. Los métodos comprenden la solubilización de G-CSF con un agente solubilizante, el replegamiento oxidativo (una “primera etapa de replegamiento y oxidación”) de G-CSF en presencia del agente solubilizante y un agente oxidante, la eliminación eficaz del agente solubilizante, y una segunda etapa de replegamiento para completar el plegamiento de G-CSF en ausencia de un agente solubilizante.

La invención también se refiere a una nueva combinación de etapas de replegamiento y purificación. Tras una primera etapa de replegamiento, se introduce una etapa de purificación intermedia nueva para garantizar eliminación eficaz de los agentes solubilizantes y oxidantes, antes de que se realice la segunda etapa de replegamiento para completar el plegamiento de G-CSF. La presente invención también se refiere a métodos nuevos para la eliminación de agentes solubilizantes y otros usados en los procedimientos de replegamiento en general.

El principio principal de los métodos recientemente descritos se representa esquemáticamente en la figura 1 (junto con etapas de pulido posteriores opcionales). Brevemente, el método comprende:

a) solubilizar G-CSF a partir de cuerpos de inclusión usando un agente solubilizante (opcionalmente precedido por extracción y/o aislamiento y/o lavado de los cuerpos de inclusión); y

b) oxidar y replegar parcialmente G-CSF solubilizado mediante incubación en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante; y

c) eliminar el agente solubilizante (y otras impurezas); y

d) finalizar el replegamiento mediante dilución e incubación de G-CSF parcialmente replegado.

Por tanto, la segunda etapa de replegamiento se realiza en ausencia del agente solubilizante.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un método tal como se reivindica para replegar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), a partir de cuerpos de inclusión, que comprende:

(a) solubilizar G-CSF en presencia de un agente solubilizante; y

(b) una primera etapa de replegamiento y oxidación, que comprenden incubar el G-CSF solubilizado en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante; y

(c) eliminar el agente solubilizante mediante adsorción con resina de intercambio iónico y/o precipitación con ácido y/o cromatografía de intercambio iónico; y

(d) una segunda etapa de replegamiento, que comprende diluir e incubar el G-CSF de la etapa (c) en ausencia de un agente solubilizante.

Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse de un microorganismo. El microorganismo puede, por ejemplo, producir G-CSF de manera recombinante. Por tanto, el método puede comprender además opcionalmente una etapa de aislamiento de los cuerpos de inclusión a partir de una célula microbiana.

#### Cuerpos de inclusión

La presente divulgación proporciona métodos para replegar G-CSF a partir de cuerpos de inclusión. En el pasado, se han sometido a prueba varios sistemas de expresión diferentes para determinar su capacidad de producir G-CSF en grandes cantidades. Todas las cepas bacterianas que se sometieron a prueba expresan la proteína de G-CSF en forma de cuerpos de inclusión (IB). Los cuerpos de inclusión (IB) contienen G-CSF en grandes cantidades, sin embargo, en forma desplegada e inactiva. Pueden usarse fracciones de cuerpos de inclusión aislados, y preferiblemente lavados, como material de partida para los métodos descritos en el presente documento. Tales preparaciones de cuerpos de inclusión pueden proporcionarse mediante sistemas de expresión adecuados, condiciones de fermentación, procedimientos de recogida y lisis, y métodos adecuados para el aislamiento y lavado de los IB. Tales métodos se divulgan en la técnica anterior (véase, por ejemplo, Rudolph 1990, Rudolph 1996, Heidari 2001, Khalilzadeh 2008, Rao 2008, Vanz 2008, documentos US5849883, EP0219874, EP1630173 o WO2004001056). Los procedimientos para extraer los cuerpos de inclusión a partir de las células huésped

- comprenden generalmente lisis y disrupción de las células seguido por centrifugación. Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse recogiendo las células en un separador (por ejemplo, mediante centrifugación, por ejemplo a 11000 g), alterando mecánicamente las células con un homogeneizador a alta presión (por ejemplo, a aproximadamente 1000 bar) y luego separando los cuerpos de inclusión de residuos celulares en un separador (por ejemplo, mediante centrifugación, por ejemplo a 11000 g). El sedimento que comprende una gran proporción de cuerpos de inclusión clásicos se lava habitualmente con detergentes. Los cuerpos de inclusión pueden congelarse y almacenarse antes de la solubilización de G-CSF. Se encontró que IB que se separaron de residuos celulares en un separador y se almacenaron en tampón reductor a -80°C eran estables hasta 8 meses.
- Los cuerpos de inclusión pueden obtenerse a partir de células microbianas. Los métodos descritos en el presente documento pueden, por tanto, comprender una etapa de extracción de los cuerpos de inclusión a partir de una célula huésped microbiana. La célula huésped microbiana usada para la expresión de G-CSF puede ser una célula de levadura, una célula de hongo filamentoso o una célula bacteriana. En realizaciones preferidas, los microorganismos son bacterias, en realizaciones más preferidas son bacterias gram-negativas, y lo más preferiblemente son *E. coli*. Los cuerpos de inclusión pueden, por tanto, obtenerse a partir de una célula de *E. coli*.

## G-CSF

- "G-CSF" tal como se usa en el presente documento en el contexto de la invención incluye especies ortólogas de G-CSF, tales como, por ejemplo, G-CSF humano, G-CSF bovino, etc. La secuencia de aminoácidos de G-CSF humano es (SEQ ID NO: 1):

```
TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCCHPEELVLLGHSGLGIPWA
PLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQP
```

- que, por ejemplo, puede encontrarse en Holloway, 1994, o en el n.º de registro Drugbank DB00099.

La secuencia de G-CSF bovino es (SEQ ID NO: 2):

```
TPLGPARS LPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCCHPEELMLLRHSLGIPQAP
LSSCSSQSLQLRGCLNQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQLDVTDFATNIWLQ
MEDLGAAPAVQPTQG AMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHRFLELAYRGLRYLAEP
```

- que puede encontrarse, por ejemplo, en la figura 7 del documento US US5849883, o en el n.º de registro PDB: 1BGC-A.

- En realizaciones preferidas, el G-CSF es G-CSF de mamífero, en realizaciones particularmente preferidas es G-CSF humano. En algunas realizaciones preferidas, el polipéptido recombinante es metionil-G-CSF (Met-G-CSF), tal como Met-G-CSF humano (r-met-hu-G-CSF = filgrastim). La secuencia de filgrastim es (SEQ ID NO: 3):

```
MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCCHPEELVLLGHSGLGIPWA
PLSSCPSQALQLAGCLSQ LHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQP
```

- Puede proporcionarse igualmente G-CSF bovino como metionil-G-CSF bovino.

- "G-CSF" tal como se usa en el presente documento en el contexto de la invención incluye variantes funcionales de G-CSF. La referencia a "variante" en el presente documento significa referencia a "variante funcional", a menos que el contexto indique lo contrario. Una variante de proteína de G-CSF se refiere a una proteína que difiere de la secuencia de proteínas de G-CSF, pero aún tiene la misma actividad biológica (variante funcional). Una "variante" de proteína de G-CSF se refiere a una proteína que difiere de la secuencia de proteínas de G-CSF de referencia (tal como la secuencia de G-CSF humano) en uno o más aminoácido(s). Una "variante" puede, alternativamente o además, tener otras modificaciones tales como, por ejemplo, metilación, pegilación, succinilación, adición de etiquetas o marcadores, etc. la variante puede ser G-CSF enzimática o químicamente modificado. Puede ser una proteína de fusión fusionada con otro péptido o polipéptido.

En realizaciones preferidas, el G-CSF está pegilado.

- "Variantes" pueden ser variantes naturales, incluyendo variantes alélicas o variantes de empalme (véase, por ejemplo, Zsebo 1986), incluyendo variantes alélicas, o variantes sintéticamente generadas. Se mostró en la técnica

anterior que formas modificadas de G-CSF se expresan en cuerpos de inclusión. Por ejemplo, el documento EP0719860 describe en los ejemplos 2 y 3 la construcción y producción de G-CSF bovino modificado, que se expresan en cuerpos de inclusión. Por tanto, pueden obtenerse variantes usando los métodos descritos en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, la variante de G-CSF es una proteína que comparte al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 (r-met-hu-G-CSF = filgrastim). La identidad de secuencia puede determinarse usando herramientas de análisis de secuencias convencionales, tales como por ejemplo Clustal, BLAST, etc. o algoritmos de alineación tales como por ejemplo el algoritmo de Needleman-Wunsch, algoritmo de Smith-Waterman, etc. La variante puede tener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una sustitución de aminoácido es conservadora, si un aminoácido se intercambia con un aminoácido que tiene propiedades similares, por ejemplo, un aminoácido polar con otro aminoácido polar, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, etc. Las sustituciones conservadoras es menos probable que afecten a las propiedades químicas y, por tanto, la función de la proteína. Las "variantes" con respecto a G-CSF incluyen por tanto proteínas que tienen una o más mutaciones, deleciones, sustituciones, inserciones y/o modificaciones de uno o más aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 3, siempre que la variante de G-CSF aún presente la misma función biológica que G-CSF (funcionalmente equivalente). Si una variante tiene la misma función biológica puede someterse a prueba en ensayos que determinan la actividad biológica de G-CSF (tal como se comenta a continuación). Puede usarse G-CSF comercialmente disponible como control de referencia. Puede considerarse que una variante tiene la "misma actividad biológica", es decir, que es "biológicamente activa" o "activa" si tiene al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o al menos el 99,5% de la actividad de la referencia de G-CSF comercialmente disponible.

25 Por tanto, la referencia a "G-CSF" en el presente documento incluye referencia a variantes y especies ortólogas, es decir, variantes funcionales, de G-CSF humano.

#### 30 Solubilización

El G-CSF de la fracción de IB se solubiliza en presencia de un agente solubilizante. Puede usarse cualquier agente solubilizante adecuado (es decir, cualquier agente que conduce a la solubilización de G-CSF tal como se describe en el presente documento). Tales agentes solubilizantes pueden seleccionarse del, por ejemplo, (pero no se limitan al) grupo de un desnaturalizante o un agente caotrópico, tal como por ejemplo (pero sin limitarse a) GuHCl o urea, o del grupo de un detergente, un tensioactivo o un surfactante, tal como por ejemplo (pero sin limitarse a) N-lauroilsarcosina (sarcosilo), ácido laúrico, dodecil sulfato de sodio (SDS) o cloruro de N-cetiltrimetilamonio.

40 Con respecto a sarcosilo, los presentes inventores encontraron que, al contrario de la concentración descrita frecuentemente de sarcosilo al 2%, ya se logra solubilización máxima a sarcosilo al 1% (p/v). Más ventajosamente, al contrario que otros detergentes iónicos como SDS, los presentes inventores encontraron que el sarcosilo puede eliminarse completamente del producto con una variedad de métodos de purificación. Finalmente, los presentes inventores encontraron que una segunda etapa de replegamiento tras la eliminación eficaz de sarcosilo conduce a rendimientos aumentados de G-CSF monomérico correctamente plegado.

45 Por consiguiente, en realizaciones preferidas de la presente invención el agente solubilizante es un detergente o surfactante. En realizaciones más preferidas, el agente solubilizante es un surfactante aniónico, y lo más preferiblemente es sarcosilo. La concentración preferida de sarcosilo durante solubilización es del 0,2-2,0% (p/v), en realizaciones más preferidas de aproximadamente el 0,5%-1% (p/v) y lo más preferiblemente de aproximadamente el 1% (p/v) o el 1% (p/v).

50 Se encontró además que la optimización de otros parámetros tales como temperatura, pH, tampón etc. puede mejorar adicionalmente el rendimiento. Pueden establecerse la temperatura, el pH, el tampón etc. óptimos en vista de la presente descripción usando los métodos descritos en el presente documento. En realizaciones preferidas, la solubilización se realiza a un pH alcalino, tal como por ejemplo a un pH dentro del intervalo de desde 7 hasta 10, o desde 7 hasta 9, o desde 7,5 hasta 8,5, o desde 7,8 hasta 8,2. En realizaciones preferidas, el pH es de aproximadamente 8 o es 8. En algunas realizaciones, la solubilización se realiza a temperatura ambiente, es decir entre 20-25°C. En la técnica se conocen bien tampones adecuados para usarse a intervalos de pH particulares para la solubilización. Por ejemplo, puede usarse Tris-HCl. Preferiblemente, se realiza solubilización con agitación.

60 En realizaciones preferidas, la solubilización se realiza con sarcosilo a pH alcalino, preferiblemente pH 8. El tampón preferido para la solubilización es Tris-HCl/pH 8, preferiblemente Tris-HCl 40 mM/pH 8.

65 Tras la solubilización, puede realizarse una etapa de dilución, tal como por ejemplo una dilución de cinco veces, o cuatro veces, o tres veces o preferiblemente dos veces. El disolvente preferido para la dilución es un tampón de baja conductividad o más preferiblemente tan solo agua. Baja conductividad significa una conductividad de al menos por debajo de 2 mS/cm, más preferiblemente por debajo de 1 mS/cm. Un sistema de tampón adecuado es por ejemplo

Tris/HCl a concentraciones de Tris 10 mM o menos con un valor de pH mayor de 7. También pueden usarse otros tampones con la misma baja conductividad y pH.

Primer replegamiento (plegamiento oxidativo)

5 La oxidación de las cisteínas reducidas y la formación de disulfuro es necesaria para el correcto plegamiento de G-CSF. El enfoque clásico es la oxidación en presencia de un par de agentes reductores/oxidantes (Rudolph 1990, Rudolph 1996, véanse los Antecedentes). Se ha publicado numerosas técnicas de replegamiento *in vitro*.  
10 Basándose en estos protocolos de replegamiento, los presentes inventores han derivados algunos principios generales que son comunes para proteínas que contienen disulfuros expresadas en cuerpos de inclusión. Debido a que las proteínas están en un estado reducido y desplegadas, el mecanismo detrás de un procedimiento de replegamiento de este tipo es principalmente un plegamiento oxidativo de la cadena de polipéptidos en la conformación nativa formando los puentes disulfuro naturales entre los grupos sulfhidrilo de los pares de cisteína. En un procedimiento de replegamiento típico, la concentración del agente solubilizante (agente caotrópico o detergente)  
15 disminuye en primer lugar por debajo de concentraciones de desnaturalización a menudo mediante dilución por etapas o mediante diálisis o mediante cromatografía de gel, por ejemplo, usando Sephadex G-25. La presencia de un oxidante tal como  $\text{CuSO}_4$  o un sistema rédox tal como forma red./ox. de glutatión (GSH/GSSG) promueve la formación de disulfuros durante la incubación de replegamiento. Generalmente las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante varias horas hasta días. Se describieron diversos aditivos adicionales que pueden usarse opcionalmente para aumentar la solubilidad de la proteína y/o evitar la agregación. La agregación, especialmente de productos intermedios parcialmente plegados, es un problema principal durante el replegamiento y se evita mejor mediante dilución por debajo de los niveles de concentración de proteína críticos (Rudolph 1990, Rudolph 1996). Para G-CSF, la técnica anterior también enseña la oxidación mediante el uso de  $\text{CuSO}_4$  en combinación con sarcosilo. El replegamiento se realizó en presencia de agente oxidante y agente solubilizante  
20 (Zsebo 1986, documentos WO8701132, WO8910932, Lu 1992, Heidari 2001).

Los inventores encontraron que en presencia de agente solubilizante, tal como sarcosilo, el plegamiento de G-CSF no podía lograrse completamente. Por tanto, una etapa de oxidación y plegamiento de este tipo sólo conduce a un replegamiento parcial de G-CSF. Los inventores han encontrado que la eliminación completa del agente solubilizante seguido por una segunda etapa de plegamiento en ausencia de agente solubilizante conduce a un rendimiento mejorado. Los presentes inventores también idearon métodos optimizados para la eliminación del agente solubilizante (véase a continuación). También se eliminan otros contaminantes, que también pueden contribuir al plegamiento incompleto.

35 Puede usarse cualquier agente oxidante adecuado, tal como oxígeno o flujo de aire (burbujeo), GSSG (forma ox. de glutatión), iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ...) peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En realizaciones preferidas, el agente de oxidación es  $\text{CuSO}_4$ . Además de  $\text{CuSO}_4$ , también pueden usarse otras sales de cobre (por ejemplo,  $\text{CuCl}_2$ ).

40 El agente solubilizante se usa en una cantidad eficaz. El experto en la técnica puede determinar y optimizar fácilmente la cantidad eficaz, es decir, la cantidad de agente solubilizante que logra solubilización eficaz de G-CSF. Se describen adicionalmente a continuación métodos para determinar la cantidad de G-CSF (véase, por ejemplo, el ejemplo 13.3).

45 La concentración preferida del agente solubilizante durante la primera etapa de replegamiento es del 0,2-2,0% (p/v), más preferiblemente es del 0,2%-1% (p/v) y lo más preferiblemente es de aproximadamente el 0,5% (p/v) o el 0,5% (p/v). Si se usa sarcosilo, en realizaciones preferidas, la concentración de sarcosilo está por debajo del 1% (p/v), preferiblemente del 0,5 % (p/v).

50 Los presentes inventores observaron además que largos periodos de oxidación pueden dar como resultado la aparición de 2-3 picos extra en los cromatogramas de RP-HPLC. Estos picos adicionales se deben probablemente a la oxidación de los residuos de metionina de G-CSF. Tales formas oxidativas son sustancias relacionadas con el producto no deseadas y su eliminación mediante cromatografía adecuada es difícil.

55 En algunas realizaciones, el replegamiento oxidativo (es decir, la primera etapa de replegamiento y oxidación) se realiza durante un periodo de 1-30 horas, o 2-25 horas, o 6-25 horas, o 10-25 horas, o 12-25 horas, o 14-25 horas, o 16-25 horas, o 18-22 horas, o 19-21, o 20-24 horas. En algunas realizaciones, la oxidación y el replegamiento parcial de G-CSF se realizan durante más de dos horas, preferiblemente durante más de doce horas, preferiblemente durante más de 20 horas, lo más preferiblemente durante 20-24 horas.

60 En realizaciones preferidas, la etapa de replegamiento oxidativo (es decir, la primera etapa de replegamiento y oxidación) se realiza a un pH alcalino, tal como por ejemplo a un pH dentro del intervalo de desde 7 hasta 10, o desde 7 hasta 9, o desde 7,5 hasta 8,5, o desde 7,8 hasta 8,2. En realizaciones preferidas, el pH es de aproximadamente 8 o es 8. En algunas realizaciones, el valor de pH de la primera etapa de replegamiento es más de pH 7, preferiblemente pH 8.

65 La etapa de replegamiento oxidativo también puede realizarse usando G-CSF que ya está (parcialmente) purificado.

En algunas realizaciones, el G-CSF que se usa para el replegamiento oxidativo, tiene una pureza de más del 50%, preferiblemente una pureza de aproximadamente el 60-70%, o incluso mayor.

5 El replegamiento oxidativo se realiza preferiblemente sin enfriamiento, preferiblemente a temperatura ambiente, preferiblemente a 18-30°C, preferiblemente a 20-28°C, preferiblemente a 20-26°C, preferiblemente a 20-24°C, preferiblemente a 21-23°C, lo más preferiblemente a aproximadamente 22°C o a 22°C.

El replegamiento oxidativo puede realizarse con flujo de aire continuo.

10 Las condiciones más preferidas para el replegamiento oxidativo (primera etapa de replegamiento y oxidación), basándose en diversos experimentos de optimización, son las mostradas en la tabla I debajo de la columna "1<sup>er</sup> replegamiento".

15 La etapa de replegamiento oxidativo puede detenerse mediante la adición de un agente de detención, tal como por ejemplo EDTA. En algunas realizaciones la oxidación se detiene mediante la adición de EDTA, preferiblemente a una concentración final de aproximadamente 1 mM, pero pueden usarse otras concentraciones. EDTA elimina los iones  $\text{Cu}^{2+}$  (en el caso de que  $\text{CuSO}_4$  se use como agente oxidante), deteniendo así la oxidación. Pueden usarse otros agentes complejantes de  $\text{Cu}^{2+}$  que EDTA y/u otras concentraciones. Según el agente oxidante, pueden usarse otros agentes quelantes, tales como ligandos terdentados, tales como N-picolinoil-etilendiamina, glicina-2-piridilmetilamida,  $\text{N}^{\alpha}$ -(2-piridilmetil)-glicinamida y  $\text{N}^{\alpha}$ -(2-piridilmetil)-glicina-etilamida.

20 Tal como se comentó anteriormente, los inventores han encontrado que la presencia de sarcosilo evita que porciones de GCSF significativas se replieguen totalmente. Los inventores consideran que esto puede estar en parte provocado por un replegamiento más lento en presencia del agente solubilizante. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, el tiempo de incubación no puede ampliarse a voluntad, porque la calidad del producto puede alcanzar niveles inaceptables a tiempos de incubación más largos.

25 Los inventores han encontrado sorprendentemente que el replegamiento puede optimizarse y completarse mediante una segunda incubación, tras la eliminación completa de los agentes solubilizantes y oxidativos, que dio como resultado inesperadamente rendimientos mayores de G-CSF soluble, puro, biológicamente activo.

Eliminación del agente solubilizante y oxidante y eliminación de otros contaminantes

35 En una etapa de purificación intermedia, el G-CSF oxidado y parcialmente replegado se purifica adicionalmente. De manera importante, el agente solubilizante debe eliminarse completamente, antes de que se realice la segunda etapa de replegamiento. Además, el agente oxidante y parcialmente contaminantes/impurezas adicionales se eliminan.

40 En la técnica anterior se describen varios procedimientos para la eliminación de los agentes solubilizantes y oxidantes o bien mediante diálisis/ultrafiltración o bien mediante métodos cromatográficos. Sin embargo, los inventores han encontrado que mediante una única etapa de adsorción por lotes no puede lograrse la eliminación completa del agente solubilizante, tal como sarcosilo. En experimentos realizados por los inventores, el sarcosilo permaneció en concentraciones de 0,01-0,04 mg/ml tras esta etapa (tabla III), que se encontró que influía negativamente en el rendimiento de G-CSF correctamente plegado.

45 Para mejorar el rendimiento de G-CSF activo soluble, el agente solubilizante debe eliminarse completamente, es decir, por debajo de los niveles de detección de los métodos de detección descritos en el presente documento. Por ejemplo, la concentración de agente solubilizante residual puede medirse mediante HPLC y detección mediante UV. El límite de detección en el ensayo realizado por los inventores fue de 0,01 mg/ml. El método se describe en más detalle en Burgess, R. R. 1996. Purification of over produced *E. coli* RNA polimerase  $\sigma$  factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. *Methods Enzymol.* 273:145-149.

50 Puede usarse cualquier método de eliminación adecuado. Por ejemplo, puede lograrse suficiente eliminación mediante adsorción de resina de intercambio iónico, y/o precipitación con ácido, y/o cromatografía de intercambio iónico. Aplicar una cualquiera o una combinación de estas técnicas según la invención da como resultado una concentración del agente solubilizante, tal como sarcosilo, que no interferirá con o inhibirá el replegamiento en la segunda etapa de replegamiento, preferiblemente por debajo de 0,01 mg/ml, preferiblemente por debajo del límite de detección. Estas etapas de purificación pueden aplicarse en cualquier orden y/o en cualquier combinación, siempre que conduzca a una eliminación completa del agente solubilizante. También pueden usarse otros métodos de purificación adecuados. Los métodos descritos en el presente documento comprenden, por tanto, una etapa de eliminar completamente el agente solubilizante. Es decir, el agente solubilizante se elimina hasta un grado suficiente de manera que cualquier cantidad residual no interfiere o inhibe la segunda etapa de plegamiento. La segunda etapa de replegamiento se realiza, por tanto, en ausencia del agente solubilizante, es decir el agente solubilizante está presente en una cantidad que no interfiere con la segunda etapa de replegamiento, es decir el agente solubilizante está por debajo del límite de detección.

65

En una realización de la invención se proporciona un método en el que el agente solubilizante se elimina mediante una o más de las siguientes etapas:

5 i) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o

10 ii) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo o, viceversa, G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo directo.

En una realización de la invención se proporciona un método en el que el agente solubilizante (y otras impurezas) se elimina mediante una o más de las siguientes etapas:

15 i) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o

ii) precipitación con ácido.

20 En una realización de la invención se proporciona un método en el que el agente solubilizante (y otras impurezas) se elimina mediante una o más de las siguientes etapas:

i) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o

25 ii) precipitación con ácido, y/o

30 iii) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo o, viceversa, G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo directo.

En una realización preferida el agente solubilizante (y otras impurezas) se elimina mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:

35 a) unión del agente solubilizante a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración

b) precipitación de impurezas reduciendo el pH por debajo de pH 5 y mediante la eliminación del precipitado por filtración

40 c) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que el agente solubilizante residual se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo

45 d) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante residual permanece en el flujo directo

e) elución de G-CSF unido de la resina de intercambio catiónico mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados.

Adsorción de resina de intercambio iónico

50 Puede usarse adsorción de resina de intercambio iónico para eliminar el agente solubilizante.

Como primera etapa de eliminación del agente solubilizante, puede realizarse una adsorción de resina de intercambio iónico. En la técnica se conocen métodos adecuados. Tal como se describió anteriormente, para la eliminación del agente solubilizante, tal como sarcosilo, un método es un adsorción por lotes a resinas de intercambio aniónico Dowex (Dow Chemicals, EE.UU.), preferiblemente con Dowex 1X4 (documento WO8910932, Lu1992, Heidari 2001). La resina que captura el surfactante unido se elimina mediante filtración. Productos muy similares a las resinas Dowex son resinas AG de BioRad (tal como AG-1X8), que pueden usarse de la misma manera.

60 Los métodos descritos anteriormente se aplican a todos aquellos agentes solubilizantes que se cargan en la disolución. Muchos surfactantes son anfífilos, otros son aniónicos o catiónicos. Según el tipo de agente solubilizante y el valor de pH de la disolución, las cargas pueden ser positivas o negativas. El uso de un material de AEX tal como Dowex o AG-1 depende de agentes solubilizantes cargados negativamente, por ejemplo sarcosilo o SDS. En cambio, la cromatografía de intercambio iónico según la selección del tipo de resina, puede unir ambos, agentes solubilizantes cargados negativa o positivamente. Los agentes solubilizantes cargados negativamente se unirán a

resinas de AEX pero no a resinas de CEX. Los agentes solubilizantes cargados positivamente se comportan al contrario. Por ejemplo, agentes tales como lípidos catiónicos, cetil trimetil amonio, o arginina pueden eliminarse mediante cromatografía de intercambio catiónico. Además del agente solubilizante, también otros contaminantes se eliminarán al menos parcialmente por los métodos. Estos otros contaminantes/impurezas pueden comprender impurezas relacionadas con el procedimiento tales como, por ejemplo, proteínas de células huésped (HCP), ADN/ARN, endotoxinas (por ejemplo, LPS), agentes oxidantes (por ejemplo,  $\text{Cu}^{2+}$ ), productos químicos relacionados con el procedimiento (por ejemplo, EDTA), e impurezas relacionadas con el producto, tales como por ejemplo agregados.

En algunas realizaciones el agente solubilizante es un detergente o tensioactivo aniónico que se adsorbe a una resina de AEX en un modo por lotes. Preferiblemente, el detergente o tensioactivo es sarcosilo. En algunas realizaciones, el sarcosilo se adsorbe a una resina de AEX de grado analítico (AG) (BioRad, EE.UU.), preferiblemente una resina de la serie AG 1-X, lo más preferiblemente la resina es AG 1-X8. En algunas realizaciones, la resina se usa como material desechable.

En realizaciones preferidas, la adsorción por lotes del agente solubilizante con resina AG 1-X se realiza en tampones con pH alcalino, preferiblemente de manera aproximada pH 8. Los sistemas de tampón adecuados pueden basarse en fosfato, carbonato, borato, Tris, HEPES, MOPS, HEPPS, EPPS, CAPS, CAPSO, CHES, TES, BES, TAPS, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, tricina, bicina, acetamidoglicina, glicinamida u otras sustancias tampón biocompatibles que tienen una pKa por encima de 7. Un tampón preferido para la adsorción es Tris-HCl/pH 8, preferiblemente Tris 20 mM-HCl/pH 8. Lo más preferido es Tris-HCl/pH8 + EDTA 1 mM.

Preferiblemente, la cantidad de AG 1-X8 es de 10-60 g de resina seca por gramo de sarcosilo, lo más preferiblemente 20 g/g de sarcosilo. En algunas realizaciones, la concentración de sarcosilo inicial es del 0,5%.

En realizaciones preferidas, la etapa de adsorción de resina de intercambio iónico elimina más del 90%, más del 95%, más preferiblemente más del 96%, más preferiblemente más del 97%, más preferiblemente más del 98%, más preferiblemente más del 99%, más preferiblemente más del 99,2%, más preferiblemente más del 99,3%, más preferiblemente más del 99,4%, más preferiblemente más del 99,5%, más preferiblemente más del 99,6%, más preferiblemente más del 99,7%, más preferiblemente más del 99,8%, más preferiblemente más del 99,9% del agente solubilizante. En realizaciones preferidas, el agente solubilizante es sarcosilo. En algunas realizaciones, la etapa de adsorción de resina de intercambio iónico elimina más del 95% del sarcosilo mediante adsorción por lotes de AG 1-X8; más preferiblemente al menos el 99% de sarcosilo. En algunas realizaciones la resina AG 1-X8 con el sarcosilo capturado se separa de la disolución mediante filtración. Preferiblemente, la etapa de filtración usa mallas de acero inoxidable de 100  $\mu\text{m}$ . Más preferiblemente, la etapa de filtración usa mallas de filtro de bolsa de nailon de 100  $\mu\text{m}$ .

Si la etapa de adsorción de resina de intercambio iónico no da como resultado una eliminación lo suficientemente completa del agente solubilizante, pueden seguir etapas de purificación adicionales, tales como precipitación con ácido y/o cromatografía de intercambio iónico.

Precipitación con ácido

Opcionalmente, puede realizarse etapa de precipitación con ácido para eliminar otros posibles contaminantes. Sorprendentemente, los inventores encontraron que mediante simple precipitación con ácido, puede eliminarse fácilmente una porción significativa de contaminantes. GCSF, especialmente filgrastim, se sabe que tiene la mejor solubilidad y estabilidad a pH ácido e incluso permanece soluble al disminuir el pH por debajo del punto isoeléctrico (pI de filgrastim = 5,65). Puede realizarse precipitación con ácido de contaminantes reduciendo el pH hasta un valor de entre 6,5 y 6,0, entre 6,0 y 5,5, entre 5,5 y 5,0, entre 5,0 y 4,5, entre 4,5 y 4,0, entre 4,4 y 3,5, entre 3,5 y 3,0, etc.

A pesar de la presencia de agente solubilizante residual, los inventores encontraron que la adición de urea puede tener un efecto beneficioso adicional sobre el procedimiento de precipitación. Al disminuir el valor de pH, a veces pueden producirse coprecipitaciones no específicas e indeseadas de G-CSF, que pueden conducir a pérdidas no deseadas en los rendimientos finales. Los inventores han encontrado que esta desventaja puede superarse mediante el uso de una concentración subdesnaturalizante de urea añadida a la disolución antes del ajuste del pH. La urea evita eficazmente la coprecipitación de G-CSF. La optimización de esta etapa reveló los mejores resultados reduciendo el pH lentamente y de manera uniforme con ácido acético o acetato de sodio. Valores de pH por debajo de 5,0 fueron ya eficaces. Una concentración de urea más bien baja, que es de aproximadamente 1 M, es suficiente.

En algunas realizaciones, la concentración de sarcosilo residual antes de la precipitación ácida es de entre 0,01 y 0,04 mg/ml. En algunas realizaciones, el valor de pH se reduce añadiendo acetato de sodio o ácido acético concentrados. En realizaciones preferidas, el valor de pH se reduce por debajo de pH 5,0, preferiblemente por debajo de 4,8, lo más preferiblemente hasta pH 4,3-4,5. En algunas realizaciones, la acidificación se realiza en presencia de urea, preferiblemente a una concentración por debajo de urea 3 M, lo más preferiblemente a urea 1 M. En algunas realizaciones, los precipitados se eliminan mediante filtración en profundidad.

Cromatografía de intercambio iónico

También puede usarse intercambio iónico para eliminar el agente solubilizante. La etapa de eliminar el agente solubilizante puede comprender una o más etapas de intercambio iónico.

5 Si el uso de adsorción de resina de intercambio iónico (con o sin precipitación con ácido) no ha dado como resultado una eliminación completa del agente solubilizante, puede realizarse una o más etapas de cromatografía de intercambio iónico para eliminar completamente el agente solubilizante. La(s) etapa(s) de intercambio iónico puede(n) comprender un AEX y/o CEX, en cualquier orden. Puede usarse cualquier tecnología de intercambio iónico.

10 El uso de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de G-CSF se describe en la técnica anterior. Muchos procedimientos usan AEX y CEX, o ambos métodos en cualquier orden, o una etapa de IEX en combinación con otros métodos cromatográficos tales como HIC, IMAC, SEC o RP-HPLC (véanse los Antecedentes).

15 Con respecto a sarcosilo, los inventores encontraron que si una concentración baja de sarcosilo residual permanecía tras una adsorción por lotes de AEX y precipitación con ácido, podía eliminarse completamente mediante una posterior etapa de intercambio iónico.

20 Los inventores encontraron que tras la etapa de precipitación ácida el G-CSF permanece en el sobrenadante y el pH está por debajo de su pI. En estas condiciones de pH G-CSF es catiónico y se unirá a las resinas de CEX y no de AEX. Esto se confirmó mediante los experimentos.

25 En algunas realizaciones, la etapa de intercambio iónico comprende un AEX seguido por un CEX. El hallazgo de que puede usarse AEX en un modo no de unión (G-CSF en el flujo directo) mientras que contaminantes tales como agente solubilizante residual o ADN se unen a la resina, impulsaron al inventor a desarrollar, como una realización de la invención, una etapa en tándem de dos columnas acopladas en serie en el orden de AEX seguido por CEX. La función primaria de la resina de AEX es unirse a sarcosilo residual y la función primaria de la resina de CEX es sólo un intercambio de tampón (en la preparación hasta el 2º replegamiento). El G-CSF que pasa la primera columna se une luego a la segunda resina y la proteína puede eludirse a partir de la columna de CEX mediante métodos adecuados. El experto en la técnica conoce tales métodos. Los métodos de elución para la desorción de G-CSF unido pueden comprender un aumento de la concentración de sal o bien mediante una elución por etapas o bien elución en gradiente o, alternativamente, la elución de G-CSF puede, por ejemplo, lograrse aumentando el valor de pH por encima del pI. De nuevo, esto puede lograrse o bien mediante una elución por etapas o mediante un gradiente de pH. Si se aplica la elución por etapas de pH, esto ofrece adicionalmente la posibilidad de un intercambio rápido de tampón y pH.

35 Se conocen grupos funcionales adecuados para resinas de AEX usados para cromatografía de polipéptidos. Estos grupos comprenden dietilaminoetilo (DEAE), trimetilaminoetilo (TMAE), aminometilo cuaternario (Q) y aminoetilo cuaternario (QAE). Estos son grupos de intercambio aniónico funcionales comúnmente usados para procedimientos biocromatográficos. Los productos comercialmente disponibles adecuados incluyen, por ejemplo, Macro-Prep High Q, Macro-Prep DEAE, Nuvia Q (BioRad, EE.UU.), TOYOPEARL DEAE-650, TOYOPEARL SuperQ-650, TOYOPEARL QAE-550 (Tosoh Bioscience, Japón), Fractogel EMD DEAE, Fractogel EMD TMAE (Merck, Alemania), Biosepra Q Ceramic HyperD, Biosepra DEAE Ceramic HyperD (Pall Corporation, EE.UU.), DEAE-Sepharose FF, DEAE-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose FF, Q-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose HP, Q-Sepharose XL, perlas grandes de Q-Sepharose, QAE-Sephadex, DEAE-Sephadex, Capto DEAE, Capto Q, Capto Q ImpRes, Source 15Q, Source 30Q, y DEAE Sephacel (GE Healthcare, EE.UU.).

50 En realizaciones preferidas, la resina de AEX es DEAE. DEAE es un grupo de intercambio aniónico débil clásico, que en los experimentos del inventor mostró excelente resolución y perfiles de equilibrio rápidos.

Los grupos funcionales adecuados usados para resinas de CEX comprenden carboximetilo (CM), sulfonato (S), sulfopropilo (SP) y sulfoetilo (SE). Estos son grupos funcionales de intercambio catiónico comúnmente usados para procedimientos biocromatográficos. Los productos comercialmente disponibles adecuados incluyen, por ejemplo, Macro-Prep High S, Macro-Prep CM, Nuvia S (BioRad, EE.UU.), TOYOPEARL CM-650, TOYOPEARL SP-650, TOYOPEARL SP-550 (Tosoh Bioscience, Japón), Fractogel EMD COO-, Fractogel EMD SO3- (Merck, Alemania), Biosepra CM Ceramic HyperD, Biosepra S Ceramic HyperD (Pall Corporation, EE.UU.), CM-Sepharose FF, SP-Sepharose FF, S-Sepharose FF, SP-Sepharose HP, SP-Sepharose XL, perlas grandes de SP-Sepharose, CM-Sephadex, Capto S, Capto SP ImpRes, Source 15S, Source 30S (GE Healthcare, EE.UU.).

60 En realizaciones preferidas, la resina de CEX es una resina con SP como grupo funcional. SP es un grupo de intercambio catiónico fuerte clásico y en el experimento del inventor dio excelente resolución, rápido equilibrio y excelente reproducibilidad.

65 Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención la cromatografía de AEX usada para la eliminación de agente solubilizante (y agente oxidante y eliminación de otros contaminantes) se realiza en el modo no de unión y el flujo directo resultante se dirige directamente, sin ninguna propagación, a la posterior columna. En realizaciones

preferidas, las dos columnas (AEX+CEX) se conectan directamente y G-CSF se une a la resina de CEX. En algunas realizaciones de la presente invención, la resina de AEX es un intercambiador aniónico débil y preferiblemente lleva grupos funcionales DEAE. Lo más preferiblemente la resina es DEAE Macro-Prep (BioRad, EE.UU.). En algunas realizaciones la carga de muestra se realiza a un valor de pH por debajo de 5, preferiblemente a pH 4,3-4,5, lo más preferiblemente en un tampón de acetato de sodio pH 4,5. En algunas realizaciones de la presente invención, la resina de CEX es un intercambiador catiónico fuerte y preferiblemente lleva grupos funcionales SP. Lo más preferiblemente, la resina es Toyopearl SP-650 (Tosoh, Tokio). En realizaciones preferidas, la elución de G-CSF a partir de la resina de CEX se realiza aumentando el valor de pH en el tampón de elución. Más preferiblemente, la elución se realiza con un gradiente por etapas de pH. En algunas realizaciones el tampón de elución de CEX tiene un pH alcalino, preferiblemente pH 8, lo más preferiblemente el tampón de elución es Tris 20 mM-HCl/pH 8. En la mayoría de realizaciones preferidas, una columna DEAE Macro-Prep se conecta directamente a una columna Toyopearl SP-650, la carga de muestra se realizó en tampón de acetato de sodio pH 4,5 y la elución de G-CSF se realizó mediante una etapa de pH usando tampón Tris-HCl pH 8. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:

- a) AEX,
- b) precipitación con ácido,
- c) AEX, y
- d) CEX.

En la etapa a), el agente solubilizante se une a una resina de intercambio aniónico. El material de resina puede eliminarse por filtración. En la etapa b), el pH puede estar por debajo de pH 5, por ejemplo entre 4 y 5. El precipitado puede eliminarse por filtración, en la etapa c), el agente solubilizante residual se une a la resina. G-CSF permanece en el flujo directo. En la etapa d) el G-CSF se une a la resina. El agente solubilizante residual permanece en el flujo directo. Esto puede estar seguido por una etapa de elución de G-CSF unido, o variante funcional del mismo, a partir de la resina de CEX mediante elución por etapas o en gradiente. El tampón de elución puede tener un aumento del pH o de la concentración de sal. Un aumento del pH significa un pH mayor que en la etapa b), es decir un pH por encima de 5, o por encima de 6, o por encima de 7.

Segundo replegamiento (finalización de plegamiento)

Tal como ya se mencionó, se observó sorprendentemente que los rendimientos de G-CSF monomérico, soluble y activo pueden aumentarse significativamente cuando se realiza un segundo ciclo de replegamiento. Los experimentos sugirieron que el G-CSF obtenido usando el método de sarcosilo/CuSO<sub>4</sub> "clásico" no estaba totalmente replegado.

La segunda etapa de replegamiento comprende diluir y después incubar el G-CSF parcialmente replegado.

El disolvente preferido para la dilución es un tampón de baja conductividad o más preferiblemente agua. La dilución puede ser una dilución de cinco veces, o cuatro veces, o tres veces o preferiblemente de dos veces. Baja conductividad significa una conductividad de al menos por debajo de 2 mS/cm, más preferiblemente por debajo de 1 mS/cm. Un sistema de tampón adecuado es, por ejemplo, Tris/HCl a concentraciones de Tris 10 mM o por debajo con un valor de pH mayor de 7. También pueden usarse otros tampones con la misma baja conductividad y pH.

Sin querer limitarse a ninguna teoría, los inventores realizaron las siguientes observaciones. Tal como se conocía en la técnica anterior (Lu 1992) la formación del segundo puente disulfuro de G-CSF tiene una cinética relativamente lenta. Productos intermedios no completamente replegados que llevan restos libres de cisteína reducidos corren el riesgo de agregación y/o precipitación (Rudolph 1990, Rudolph 1996). En el caso de G-CSF el producto intermedio con tres cisteínas no apareadas puede existir durante un tiempo más bien largo, según la concentración de Cu<sup>2+</sup> y temperaturas (Lu 1992). La agregación y las precipitaciones provocan pérdidas de G-CSF durante las etapas de filtración y cromatografía. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que una eficacia de plegamiento mejorada podría dar como resultado rendimientos mejorados en el procedimiento posterior. Los presentes inventores encontraron que una segunda etapa de replegamiento mejoró el rendimiento.

Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que la incubación durante la segunda etapa de replegamiento a pH ligeramente alcalino es beneficiosa. Esto es particularmente sorprendente dado el hecho de que G-CSF, especialmente filgrastim, es una proteína relativamente hidrófoba que es menos soluble y estable a valores de pH por encima de su pI (5,65). La mejor solubilidad y estabilidad es en medio ácido a pH 4 o menos. Por tanto, procedimientos de purificación clásicos tales como cromatografías se realizan a valores de pH bajos, preferiblemente a pH 4-5,5 en tampones acetato. En cambio, los presentes inventores encontraron que la incubación a un pH alcalino facilita adicionalmente un rendimiento aumentado. Los presentes inventores consideran que el pH alcalino en ausencia de un agente oxidante es importante para la oxidación completa de sulfhidrilos y, por tanto,

para formar ambos puentes disulfuro naturales de G-CSF.

Por tanto, la segunda etapa de replegamiento puede realizarse a pH alcalino, es decir a un pH de 7 o más. El pH puede estar por encima de 7. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse a un pH de entre 7 y 10, o entre 7 y 9, o entre 7 y 8,5, o entre 7 y 8, o entre 7,5 y 10, o entre 7,5 y 9, o entre 7,5 y 8,5, o a un pH de aproximadamente 8 o a un pH de 8.

La incubación de la segunda etapa de replegamiento se realiza en ausencia de agentes solubilizantes.

En realizaciones preferidas:

La segunda etapa de replegamiento puede realizarse, por ejemplo, en uno de los siguientes tampones: fosfato, carbonato, borato, Tris, HEPES, MOPS, HEPPS, EPPS, CAPS, CAPSO, CHES, TES, BES, TAPS, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, tricina, bicina, acetamidoglicina, glicinamida u otras sustancias tampón biocompatibles que tienen una pKa por encima de 7. Un tampón preferido para la segunda etapa de replegamiento es Tris-HCl/pH 8, preferiblemente Tris 10 mM-HCl/pH 8. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse, por ejemplo, a una concentración baja de detergente residual, tal como 0,01 mg/ml o menos. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse, por ejemplo, a una concentración iónica en la disolución de 0,02 mol/l o menos. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse, por ejemplo, a un intervalo de temperatura 0°-20°C, o 2°-8°C, o 2°-5°C. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse, por ejemplo, durante un periodo de incubación de al menos 24 h, o más de 24 h, o 30-48 h, o 32-42 h. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse a una baja conductividad en la disolución, tal como 0,1-2 mS/cm, o 0,2-1,5 mS/cm, o 0,5-1,0 mS/cm. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse con enfriamiento. La segunda etapa de replegamiento puede realizarse con agitación continua. Uno o más de estos parámetros pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones se usa G-CSF parcialmente purificado para la finalización del replegamiento, preferiblemente con una pureza de aproximadamente el 80-90%. Preferiblemente, el replegamiento se completa mediante una incubación del G-CSF parcialmente replegado en un tampón de baja conductividad en condiciones de refrigeración durante más de 12 horas. Preferiblemente, la finalización de replegamiento se realiza a una conductividad por debajo de 2 mS/cm; lo más preferiblemente la conductividad está por debajo de 1 mS/cm. En algunas realizaciones, la finalización de replegamiento se realiza a un valor de pH por encima de 7, preferiblemente a (aproximadamente) pH 8. El tampón para la segunda incubación de plegamiento puede ser Tris 10 mM-HCl, preferiblemente a (aproximadamente) pH 8. En algunas realizaciones, la incubación para el segundo plegamiento se realiza en condiciones de refrigeración, preferiblemente a 2-8°C. En realizaciones preferidas, el tiempo de incubación del 2° plegamiento es más de 12 horas, más preferiblemente más de 24 horas, lo más preferiblemente 32-42 horas.

Condiciones particularmente preferidas para la finalización del plegamiento (2° replegamiento), basadas en diversos experimentos de optimización, son las mostradas en la tabla I debajo de la columna "2° replegamiento".

#### *Purificación final (etapa(s) de pulido)*

La combinación descrita anteriormente de una primera y una segunda etapa de replegamiento da como resultado rendimientos aumentados de G-CSF monomérico activo.

Opcionalmente, y según el uso previsto del G-CSF obtenido, pueden realizarse procedimientos posteriores después, tales como una o más etapas de pulido. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además una o más etapas de pulido. La(s) etapa(s) de pulido da(n) como resultado purificación adicional del G-CSF replegado tras la segunda etapa de replegamiento.

Los procedimientos posteriores subsiguientes (pulido) pueden comprender el uso de cromatografías de AEX y CEX, u otros métodos usados en la técnica para pulido/purificación de G-CSF, tales como, HIC, IMAC, SEC o RP-HPLC (véanse las referencias de la sección Antecedentes). La(s) etapa(s) de pulido también puede(n) comprender combinaciones de dos o más de estos métodos.

Tras la segunda etapa de plegamiento, la pureza de G-CSF es normalmente del 80-90% (tabla III). Esto no cumple con una calidad farmacéutica. Si el producto va a usarse como principio farmacéutico activo, se realiza al menos una etapa de pulido adicional para lograr la pureza deseada. Una etapa de pulido de este tipo elimina contaminantes residuales que resultan del huésped o del procedimiento. Además, se elimina cualquier sustancia relacionada con el producto e impurezas relacionadas.

#### AEX

El pulido posterior puede comprender una o más etapas de AEX. La etapa de pulido puede comprender AEX.

El experto en la técnica puede seleccionar un AEX adecuado. La selección de la resina puede realizarse basándose en el rendimiento de separación, tiempos de procedimiento, robustez de la limpieza, reproducibilidad, capacidad de

unión, uniformidad entre lotes, y economía global, etc deseados.

En realizaciones preferidas, se usa el grupo funcional DEAE. El experto en la técnica apreciará que además del grupo funcional, la naturaleza de la estructura principal de la resina de AEX así como el tamaño de las perlas necesita considerarse. En realizaciones particularmente preferidas, se usa una matriz basada en derivados de metacrilato (por ejemplo Macro-Prep® y Toyopearl®). Una matriz de este tipo mostró una resolución y reproducibilidad particularmente buenas. Los materiales de metacrilato son más rígidos y tienen mejores ciclos de vida que, por ejemplo, las matrices de agarosa reticuladas usadas con frecuencia (por ejemplo Sepharose®). Puesto que AEX puede usarse ahora en un modo de unión (en contraste con la etapa previa para la eliminación de agentes solubilizantes), pueden usarse condiciones de elución selectivas, o bien proporcionadas por un aumento de la concentración de sal por etapas o en gradientes, o bien disminuyendo el pH en el tampón de elución por etapas o en gradientes.

Los materiales de la resina de AEX se han comentado anteriormente.

El experto en la técnica puede elegir los métodos de pulido posteriores adecuados, según las condiciones usadas previamente, tales como el tampón, etc. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la segunda etapa de replegamiento se realiza en tampón de baja conductividad a aproximadamente pH 8. Esto es una situación inicial ideal para una etapa de pulido de AEX en el modo de unión y permitiría eliminación adicional de contaminantes y un intercambio de tampón fácil a un tampón de pH bajo, si se desea, en el que G-CSF es más soluble y más estable.

CEX

El pulido posterior puede comprender una o más etapas de pulido mediante CEX. La etapa de pulido puede comprender CEX.

Como alternativa (o adicionalmente) a una etapa de AEX, también puede usarse una cromatografía CEX como etapa de pulido eficaz. Para este método se requiere una adaptación del pH a pH inferior a 5,5 antes de cargar la muestra para permitir una cromatografía en el modo de unión, lo cual es importante para obtener una separación de proteínas suficiente. El grupo de intercambio catiónico funcional y la matriz pueden seleccionarse según los mismos criterios que los mencionados para AEX. En realizaciones preferidas, se usan grupos funcionales SP y CM en estructuras principales de metacrilato (Toyopearl®, Macro-Prep®). En realizaciones particularmente preferidas, se usa Toyopearl CM-650, más preferiblemente se usa Toyopearl SP-650.

Anteriormente se han mencionado materiales de resina de CEX.

Una vez unido a la resina de CEX, puede eluirse G-CSF con condiciones selectivas, o bien proporcionadas aumentando la concentración de sal en etapas o gradientes o bien aumentando el pH en el tampón de elución en etapas o gradientes.

El experto sabe cómo optimizar la resolución de una cromatografía.

En algunas realizaciones, una etapa de cromatografía, AEX o CEX, es suficiente para lograr la calidad deseada del producto de G-CSF.

En otras realizaciones, el procesamiento posterior comprende dos o más etapas de pulido. Por ejemplo, el pulido puede comprender dos o más etapas de cromatografía. Por tanto, si se desea o es necesario, pueden realizarse dos o más etapas de pulido por intercambio iónico. Cuando se usan dos etapas de pulido, se prefiere usar AEX seguido por CEX. En tal caso, ambas etapas se realizan en modo de unión. Una ventaja de este orden es que se obtiene G-CSF a un pH ácido al final, lo que por ejemplo permite el almacenamiento a largo plazo de G-CSF concentrado. Se demostró que el uso de dos etapas de pulido mediante IEX daba como resultado una pureza particularmente alta (tabla IV).

La(s) etapa(s) de pulido posterior(es) da(n) como resultado una pureza de G-CSF de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 98,5%, el 99% o el 99,5%.

Para el cálculo de la pureza según la presente invención (véase el ejemplo 13) se usaron cromatogramas de HPLC, que se integraron para el pico principal (áreas). Cualquier "impureza" restante son las denominadas "impurezas relacionadas con el producto", lo que significa que son moléculas de G-CSF con modificaciones, tales como oxidación (diferentes especies), desamidación, dimerización, agregación o isomerizaciones no aclaradas estructuralmente hasta ahora (tabla IV). Evidentemente, estas sustancias relacionadas con el producto sólo están presentes en trazas. Debe observarse que en las preparaciones de G-CSF finalmente purificadas las "impurezas relacionadas con el procedimiento", tales como HCP, ADN o endotoxinas bacterianas sólo pueden detectarse a niveles en ppm muy bajos o no pueden detectarse en absoluto (tabla IV). Tal pureza se describirá en otra parte como homogeneidad aparente. Los métodos analíticos para la determinación de la pureza se divulgan en el ejemplo 13. La figura 3 muestra un ejemplo de un cromatograma de SEC-HPLC de un lote de G-CSF purificado (3B) en

comparación con una especialidad farmacéutica aprobada en la UE comercialmente adquirida usada como referencia (3A). Pueden observarse trazas de agregados a la izquierda del pico principal. El pico a la derecha del pico principal está provocado por el disolvente y no una impureza. Estos cromatogramas destacan la calidad suficiente del G-CSF, incluso para grado farmacéutico, purificado según los métodos descritos.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, el G-CSF completamente replegado se purifica adicionalmente al comprender una o más cromatografías de intercambio iónico.

10 Preferiblemente, las cromatografías de intercambio iónico comprenden una cromatografía de intercambio aniónico seguida por una cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, G-CSF parcialmente purificado que tiene una pureza de aproximadamente el 80-90% se purifica adicionalmente hasta una pureza de más del 95% usando dos etapas de pulido: AEX y CEX.

15 En algunas realizaciones, la etapa de AEX va seguida por la etapa de CEX. Preferiblemente, ambas etapas se realizan en modo de unión.

20 Usando los métodos descritos en el presente documento, puede obtenerse G-CSF a calidad de grado farmacéutico. Tales preparaciones de G-CSF son adecuadas para aplicaciones terapéuticas o pueden usarse como productos intermedios para posteriores conjugaciones, por ejemplo con polietilenglicol.

25 En un aspecto la invención proporciona un procedimiento para la purificación de G-CSF. El procedimiento también puede usarse para eliminar los agentes solubilizantes entre la primera y la segunda etapa de replegamiento comentadas en el presente documento. En el presente documento se proporciona un procedimiento para la purificación de G-CSF y/o eliminación de un agente de solubilización usado para la solubilización de G-CSF a partir de cuerpos de inclusión, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

e) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina; y

30 f) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con un pH disminuido o una concentración de sal aumentada; y

g) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina; y

35 h) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados.

“pH disminuido/aumentado” o “concentración de sal aumentada” se refieren al tampón usado para la elución en comparación con el tampón para el equilibrado de columna, carga de muestra o lavado.

40 Con respecto a AEX y CEX, anteriormente se han comentado condiciones y materiales adecuados. En realizaciones preferidas, el procedimiento se caracteriza porque los polímeros de estructura principal de las resinas de intercambio aniónico y catiónico, ambos comprenden derivados de metacrilato.

45 En algunas realizaciones los grupos funcionales de la resina de AEX son grupos dietilaminoetilo (DEAE).

En algunas realizaciones los grupos funcionales de la resina de CEX son grupos carboximetilo (CM).

50 En algunas realizaciones los polímeros de estructura principal de las resinas de intercambio aniónico y catiónico no comprenden agarosa reticulada, tal como por ejemplo Sepharose®.

En realizaciones preferidas los polímeros de estructura principal de las resinas de AEX y/o CEX de intercambio aniónico y/o catiónico comprenden derivados de metacrilato.

55 En realizaciones más preferidas la resina de AEX es DEAE Macro-Prep (BioRad) y la resina de CEX es Toyopearl CM-650 (Tosoh).

60 En algunas realizaciones la columna de AEX se equilibra con tampón de baja conductividad a pH superior a 7, preferiblemente con Tris-HCl 10 mM/pH 8.

En algunas realizaciones el G-CSF se eluye de la columna de AEX aumentando la concentración de sal, preferiblemente con un gradiente, lo más preferiblemente con un gradiente lineal. Preferiblemente la elución se realiza con un gradiente lineal de NaCl en tampón Tris HCl/pH 8.

65 En algunas realizaciones, antes de la etapa de CEX, se ajusta el valor de pH del G-CSF eluido de la columna de AEX, preferiblemente se ajusta el pH a un pH inferior a 5,5, lo más preferiblemente a (aproximadamente) pH 4,5.

Preferiblemente el G-CSF eluido de la columna de AEX se diluye 2 veces con agua y se ajusta el pH a (aproximadamente) 4,5 mediante titulación con ácido acético al 50%.

5 En algunas realizaciones la columna de CEX se equilibra con un tampón de baja conductividad de pH inferior a 5,5, preferiblemente con acetato de sodio 20 mM/pH 5,3.

En algunas realizaciones el G-CSF se eluye de la columna de CEX con sal creciente, preferiblemente con un gradiente, lo más preferiblemente con un gradiente lineal.

10 Preferiblemente la elución de G-CSF de la columna de CEX se realiza con un gradiente lineal de acetato de sodio a pH 5,3.

15 En realizaciones preferidas el G-CSF se solubiliza a partir de IB, se repliega y se purifica según el orden de etapas divulgado en el esquema de purificación de la figura 2.

En algunas realizaciones de la invención el G-CSF finalmente purificado tras el pulido se formula mediante cromatografía en gel, preferiblemente usando Sephadex G-25.

20 En algunas realizaciones el tampón de formulación contiene sorbitol y polisorbato; más preferiblemente el tampón de formulación comprende acetato de sodio 10 mM/pH 4/sorbitol al 5% (p/v)/polisorbato 80 al 0,006% (p/v).

### Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 representa la estrategia de replegamiento en dos etapas, con etapas de pulido posteriores opcionales para la producción de G-CSF biológicamente activo. En los ejemplos se divulgan detalles adicionales.

30 La figura 2 divulga una realización preferida, es decir una secuencia de etapas comenzando a partir de cuerpos de inclusión que contienen G-CSF y conduciendo a G-CSF completamente replegado y purificado. En los ejemplos se divulgan detalles adicionales.

35 La figura 3 compara cromatogramas de SEC-HPLC a partir de un análisis de pureza de un producto terminado de filgrastim comercialmente disponible (3A) usado como referencia y el producto purificado según la secuencia resumida en la figura 2 (3B). En los ejemplos se describen en detalle detalles adicionales de los métodos.

### Breve descripción de las tablas

40 La tabla I indica condiciones preferidas para las dos etapas de replegamiento. Las concentraciones en la 1ª incubación de replegamiento resultan de la dilución doble del G-CSF solubilizado con agua. La 2ª incubación de replegamiento carece de reactivos sarcosilo y CuSO<sub>4</sub> del primer replegamiento. En los ejemplos se mencionan detalles adicionales.

45 La tabla II muestra la pureza y los rendimientos de tres series de producción comenzando con 650 g de cuerpos de inclusión lavados y congelados. El cálculo de rendimientos se refiere a la masa húmeda de los cuerpos de inclusión. La pureza final se calcula a partir del área de pico principal en RP-HPLC excluyendo sustancias relacionadas con el producto (isómeros de G-CSF) e impurezas relacionadas con el producto. En los ejemplos se mencionan detalles adicionales.

50 La tabla III muestra los valores de pureza total y de dos impurezas relacionadas con el procedimiento seleccionadas (sarcosilo, endotoxinas) durante la purificación de G-CSF. Los intervalos indican los resultados del análisis de tres lotes de producción de G-CSF usando diferentes métodos analíticos. En los ejemplos se mencionan detalles adicionales.

55 La tabla IV muestra los resultados analíticos de diferentes métodos sobre impurezas específicas y la actividad biológica de tres lotes de producción de G-CSF posteriores. Los datos se toman a partir de pruebas de liberación de lote rutinarias. En los ejemplos se mencionan detalles adicionales.

### Ejemplos

60 *Ejemplo 1: Fermentación y expresión*

65 Se produjo el G-CSF (filgrastim) con el clon C2523 T7 pol pRG/GCSFa de *E. coli* recombinante (*E. coli* transformada con un vector de expresión que comprende G-CSF). En condiciones asépticas, se inocularon los medios de cultivo sembrados preparados con 0,10-0,15 cm<sup>3</sup> de suspensiones celulares obtenidas a partir de un vial de banco de células de trabajo descongelado que se almacenó en nitrógeno líquido. Se incubaron los frascos de cultivo sembrados inoculados en un incubador agitador giratorio a 37°C a 185 rpm durante 24-28 horas. Cuando el valor

medio de la densidad óptica a 600 nm (DO) de los seis cultivos en frascos con agitación alcanzó 0,9-1,1, se recogió el contenido del frasco en un frasco estéril de 5 dm<sup>3</sup> equipado con un tubo de silicona. Se transfirió el volumen de 3 dm<sup>3</sup> recogido de cultivo sembrado con una bomba M323U/R al fermentador de 100 dm<sup>3</sup> llenado hasta 75 dm<sup>3</sup> con medio de producción estéril y complementado (GBA, medio sintético con glicerol como fuente de carbono). El cultivo se realizó en condiciones aerobias estrictas en un cultivo sumergido a 37°C. Cuando se agotó la fuente de carbono del medio, se añadió una disolución de alimentación de glicerol al cultivo a tasas apropiadas. Se mantuvo la tensión de oxígeno disuelto a un nivel de no menos del 30% durante todo el periodo de cultivo. Cuando el valor de DO del cultivo alcanzó 30, se redujo la temperatura hasta 32°C y se añadió IPTG 0,33 mM para inducir la expresión de G-CSF. Se cultivaron adicionalmente las bacterias para producir G-CSF durante 5 horas hasta una DO de 80-95.

#### *Ejemplo 2: Recogida de bacterias*

Se detuvieron la agitación, aeración y alimentación de fuentes de carbono, se enfrió el cultivo por debajo de 15°C y se recogieron las bacterias mediante separación a 11000g. Se sedimentaron las células en el rotor y retiraron mediante lavado (descargaron) con agua. Se recogió el concentrado de células bacterianas, se diluyó de nuevo hasta la mitad de su volumen con agua y se añadió NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M hasta una concentración final de 10 mM. La masa total de las células bacterianas húmedas (biomasa) era de aproximadamente 10-11,5 kg.

#### *Ejemplo 3: Lisis de bacterias y preparación de cuerpos de inclusión*

Se alteraron las bacterias separadas y lavadas a presión (100 MPa) haciéndolas pasar a través de un homogeneizador tres veces. Se separaron los cuerpos de inclusión de residuo celular mediante sedimentación en un separador a 11000g. Se descargaron los cuerpos de inclusión sedimentados en tampón de lavado que contenía DTT 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 5 mM y Tween 20 al 2% a pH 7,2. Se diluyó dos veces la suspensión de IB concentrada con el mismo tampón y volvió a sedimentarse. Se repitió este procedimiento de lavado dos veces usando tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, al final del segundo procedimiento sin dilución. Se almacenó el sedimento final de IB congelado a -80°C.

#### *Ejemplo 4: Solubilización de cuerpos de inclusión*

Se descongelaron los cuerpos de inclusión congelados (650 g de masa húmeda) y se disolvieron en tampón de solubilización que contenía Tris-HCl 40 mM, pH 8 y N-lauroilsarcosina (sarcosilo) al 1% (p/v) en un volumen total de 32,5 dm<sup>3</sup>. Se incubó la suspensión a temperatura ambiente con agitación continua.

#### *Ejemplo 5: Replegamiento oxidativo (1<sup>er</sup> replegamiento)*

Se diluyó 2 veces la suspensión de IB solubilizada con agua hasta sarcosilo al 0,5% y Tris-HCl 20 mM como concentraciones finales en un volumen total de 65 dm<sup>3</sup>. Se añadió CuSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 40 µM. Se oxidó G-CSF y se replegó parcialmente durante la agitación continua y flujo de aire en el espacio de cabeza a temperatura ambiente durante al menos 20 horas. Se terminó la oxidación mediante la adición de EDTA a una concentración final de 1 mM.

#### *Ejemplo 6: Eliminación de sarcosilo mediante adsorción de lote de AEX*

Se adsorbió sarcosilo en una resina de intercambio aniónico (AEX) en un modo discontinuo. Se aplicó una cantidad de 20 g de resina AG 1-X8 (BioRad, EE.UU.) por gramo de sarcosilo y se añadió a la disolución. Se agitó la suspensión durante dos horas para unir la mayor parte del sarcosilo. Se eliminó la resina mediante filtración a través de una malla de filtro de bolsa de nailon con un tamaño de poro de 100 µm. Se eliminó completamente el sarcosilo restante en el filtrado a partir del producto con las etapas de purificación posteriores (ejemplos 7 y 8).

#### *Ejemplo 7: Precipitación de contaminantes a pH ácido*

Mediante precipitación ácida a pH 4,3-4,5 se eliminaron fácilmente algunas impurezas mientras que G-CSF permanece soluble. Se impidió cualquier posible precipitación conjunta no específica y no deseada de G-CSF mediante adición de urea 1 M en concentración final. La urea se proporcionó mediante una disolución madre 6 M y se añadió lentamente al filtrado del ejemplo 6 a una velocidad de 1 dm<sup>3</sup>/min. Posteriormente, se redujo el pH añadiendo un volumen de 1/20 de acetato de sodio 1 M pH 4,8. Se redujo adicionalmente el pH a 4,3-4,5 mediante titulación con ácido acético al 50%. Se permitió la precipitación durante al menos una hora. Después se eliminó el material precipitado mediante filtración a través de un filtro profundo (Pall K700/KS50 de doble capa).

#### *Ejemplo 8: Eliminación de sarcosilo residual e intercambio de tampón mediante cromatografías AEX + CEX conectadas en serie*

Se usó tampón de acetato de sodio 50 mM/pH 4,5 para el equilibrado de 1) una columna de 4 dm<sup>3</sup> acondicionada con resina de AEX DEAE Macro-Prep (Bio-Rad, EE.UU.), y 2) una columna de 8 dm<sup>3</sup> columna acondicionada con resina de CEX Toyopearl SP-650C (Tosoh, Japón). Se conectaron ambas columnas directamente con un sistema de

5 cromatografía de procedimiento ÄKTA (GE Healthcare, Suecia) en una disposición en tándem. Tras el aclaramiento a través de un filtro estéril de 0,2 µm, se cargó el filtrado del ejemplo 7 sobre la primera columna. El sarcosilo residual se unió a la resina de DEAE, mientras que G-CSF permaneció sin unirse (modo sin unión) y apareció en el flujo directo de la primera columna. Se cargó este flujo directo directamente en la segunda columna (resina de SP), a la que se unió G-CSF (modo de unión). Una simple elución en etapas con Tris-HCl 20 mM/pH 8 desorbió el G-CSF de la resina. Además de la eliminación de sarcosilo residual, también se logró un intercambio de tampón de acetato de Na/pH 4,5 a Tris-HCl/pH 8 mediante este método.

10 *Ejemplo 9: 2º replegamiento (finalización del plegamiento)*

15 En esta fase se completó el plegamiento de aproximadamente la mitad de la fracción de proteína, mientras que la proteína restante se plegó de manera incompleta o se plegó de manera errónea. La disolución de G-CSF eluyó de Toyopearl SP-650C en Tris-HCl 20 mM, pH 8 y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,2 µm al interior de un recipiente de acero inoxidable. Se diluyó 2 veces la disolución filtrada con agua. Se llevó a cabo la segunda incubación para el plegamiento de proteína (2º replegamiento) en un entorno de baja conductividad (< 1 mS/cm) a pH 8 con enfriamiento a 2-8°C durante 32-42 horas.

20 *Ejemplo 10: Purificación mediante cromatografía de AEX (etapa de pulido 1)*

25 Se acondicionó una columna con DEAE Macro-Prep (Bio-Rad, EE.UU.) y se equilibró con Tris-HCl 10 mM/pH 8. Se cargó la disolución que resultó a partir del 2º replegamiento (ejemplo 9) en la columna de DEAE. Se eluyó el G-CSF plegado de manera correcta mediante un gradiente lineal creciente de NaCl de desde 0 mM hasta 200 mM en Tris-HCl 10 mM/pH 8. Se combinó el G-CSF eluido y se diluyó 2 veces con agua. Se ajustó el pH a 4,5 mediante titulación con ácido acético al 50%.

30 *Ejemplo 11: Purificación mediante cromatografía de CEX (etapa de pulido 2)*

35 Para la etapa de pulido final se aplicó directamente la combinación de G-CSF recogida de la cromatografía de AEX (ejemplo 10) que consistía en proteína plegada de manera correcta a una columna de CEX acondicionada con resina Toyopearl CM-650S. Se equilibró la columna mediante acetato de sodio 20 mM, pH 5,3. Se eluyó el G-CSF unido mediante un gradiente lineal creciente de sal de acetato de sodio a desde 20 mM hasta 400 mM en 24 volúmenes de columna a pH 5,3. Se recogieron fracciones con G-CSF puro y se combinaron para la formulación.

40 *Ejemplo 12: Formulación de G-CSF purificado mediante cromatografía en gel*

45 Se filtró el G-CSF purificado tal como se eluyó de la columna de CEX (ejemplo 11) a través de un filtro estéril de 0,2 µm y se hizo pasar a través de una columna de 14 dm<sup>3</sup> acondicionada con resina fina Sephadex G-25 equilibrada con tampón de formulación (acetato de sodio 10 mM, pH 4, sorbitol al 5% y polisorbato 80 al 0,006%). Se usó el mismo tampón como tampón de corrida. G-CSF se eluyó en el volumen vacío en tampón de formulación. Para un lote completo (35-48 g de G-CSF) se realizaron tres series de formulación posteriores con Sephadex G-25, cada una con un tercio del eluato de CEX filtrado. Se ajustó el G-CSF formulado a una concentración de 0,9-1,0 mg/ml mediante dilución con tampón de formulación y finalmente se filtró a través de una cápsula de filtro estéril de 0,2 µm. El G-CSF formulado como disolución estéril es muy estable y puede almacenarse a 2-8° durante muchos meses si no años.

50 *Ejemplo 13: Métodos analíticos*

55 Se realizaron métodos analíticos convencionales bien conocidos en cumplimiento con la farmacopea europea (Ph. Eur.), que contiene una monografía para filgrastim que describe métodos analíticos específicos (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM) (2010): Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 7.0, 2015-2018). Para técnicas básicas la monografía presenta referencias cruzadas a otros capítulos dentro de la farmacopea europea. Estos capítulos a los que se hace referencia específicamente, que proporcionan una descripción más detallada de las técnicas, se mencionan entre corchetes en los siguientes ejemplos. Los patrones de referencia usados o bien eran productos terminados autorizados comercialmente adquiridos (filgrastim), aprobados por la Unión Europea para uso medicinal, o bien eran patrones internos que se calibraron usando estas referencias comerciales. Para el análisis de la potencia relativa en cuanto a unidades internacionales (UI) se usó adicionalmente el patrón de G-CSF internacional de la organización mundial de la salud (OMS). Los métodos de prueba usados para analizar la pureza, las impurezas específicas, las proteínas relacionadas con G-CSF y la actividad biológica (potencia) se aplicaron según la monografía de la Ph. Eur. con tan sólo unas pocas modificaciones. Por tanto, a continuación, sólo se describen brevemente estos métodos analíticos convencionales que se conocen en la técnica.

65 *Ejemplo 13.1 – Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):* [Ph. Eur. 7, 2.2.31]. Se usó SDS-PAGE para determinar el tamaño molecular, la identidad de G-CSF y la pureza. Los geles tenían PA al 12% e incluían dodecilsulfato de sodio (SDS). Se usó el método en condiciones reductoras y no reductoras. Se tiñeron los geles con Sypro ruby. Para calcular las masas moleculares relativas (Mr) se usó un panel de proteínas marcadoras con masas

definidas.

*Ejemplo 13.2 - Cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (SEC-HPLC):* [Ph. Eur. 7, 2.2.30]. Se usó SEC para detectar impurezas o sustancias relacionadas con G-CSF con masas moleculares superiores a la de filgrastim (dímeros, agregados). La detección de las proteínas se basó en absorción UV. Se expresaron la pureza (pico principal) y las impurezas (dímeros, agregados) en % de área de sustancia activa para cada componente. Se calcularon los resultados de prueba a partir del promedio de mediciones repetidas. La figura 3 muestra un ejemplo de un cromatograma de SEC de un lote de G-CSF purificado (3B) en comparación con el patrón de referencia (3A). Pueden observarse trazas de agregados a la izquierda del pico principal. El pico a la derecha del pico principal está provocado por el disolvente y no una impureza.

*Ejemplo 13.3 – Cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa (RP-HPLC):* [Ph. Eur. 7, 2.2.29]. Se usó RP-HPLC para determinar la identidad de G-CSF, para calcular el contenido de G-CSF y la pureza. También se usó el método para identificar y cuantificar sustancias relacionadas con el producto. La detección de las proteínas se basó en la absorción UV. Se expresaron las impurezas de proteína relacionadas en porcentaje de sustancia activa (% de área). Se calcularon los resultados de prueba a partir del promedio de mediciones repetidas.

*Ejemplo 13.4 – Electroforesis en gel con isoelectroenfoque (IEF):* [Ph. Eur. 7, 2.2.54]. Se usó este método para detectar impurezas o sustancias relacionadas con el producto con cargas que diferían de G-CSF (por ejemplo G-CSF desaminado). Se llevó a cabo la separación en geles de poliacrilamida que contenían gradientes de pH inmovilizados basados en anfolitos. Adicionalmente se calculó el punto isoelectrónico (pI) de cada banda de proteína usando un conjunto de proteínas marcadoras que tenían pI definidos.

*Ejemplo 13.5 – Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):* Se usó este método para la determinación cuantitativa de niveles de proteína de célula huésped (HCP) de *E. coli*. Se realizó la prueba usando un kit de ensayo inmunoenzimático adquirido comercialmente (genérico) (Cygnus Technologies, n.º F410). Se recubrió la fase sólida de tiras de microtitulación con anticuerpos policlonales anti-*E. coli* purificados por afinidad que capturaban HCP de las muestras de prueba. Un anticuerpo anti-*E. coli* indicador marcado con peroxidasa del rábano (HRP) se unió simultáneamente a HCP y el sándwich resultante resistió los procedimientos de lavado. Se detectó HCP unido, respectivamente HRP, mediante oxidación del sustrato tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno. Se midió la densidad óptica mediante un lector de ELISA. Se realizó la cuantificación con un gráfico de calibración obtenido midiendo calibradores de HCP (proporcionados por el kit) en diferentes concentraciones. Se realizó el método exactamente según las instrucciones del proveedor. Se expresaron las concentraciones de HCP en ng/ml o ng/mg (ppm).

*Ejemplo 13.6 – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR):* Se usó este ensayo para la determinación de ADN de célula huésped *E. coli*. Se aplicó un kit comercialmente disponible denominado “sistema de cuantificación de ADN residual de *E. coli* resDNASEQ™” que se basa en tecnología de qPCR TaqMan® en tiempo real (Applied Biosystems). El método es muy sensible y específico en la detección de contaminación por ADN. El ensayo se basa en la amplificación específica de secuencia y la detección de fluorescencia en tiempo real de fragmentos de ADN bien definidos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos de secuencia (SSP) y sondas de hibridación marcadas con fluorescencia (TaqMan®). Todo el método, incluyendo instrumentación, reactivos, toma de muestras y cálculo basado en software, se realizó según las instrucciones del proveedor.

*Ejemplo 13.7 – Endotoxinas bacterianas:* [Ph. Eur. 7, 2.6.14, método C]. La detección de endotoxinas bacterianas gram-negativas son métodos convencionales globalmente armonizados basados en lisados de amebocitos de cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Se llevó a cabo esta prueba de *Limulus* (“prueba LAL”) usando la técnica de cinética turbidimétrica (método C) según la farmacopea europea. Se expresaron los resultados en unidades internacionales (UI) relacionadas con el patrón de endotoxina internacional BRP.

*Ejemplo 13.8 – Ensayo para determinar la actividad biológica (potencia relativa):* Se sometió a prueba la actividad biológica de muestras de G-CSF en un ensayo de proliferación *in vitro* basado en células tal como se describe en la monografía de filgrastim con las siguientes modificaciones. El método de bioensayo se basó en la comparación del cambio de la proliferación celular de células NFS-60, que se originaron de una línea celular mieloblástica murina. Se trataron células NFS-60 con series de dilución de la muestra de prueba y la disolución de referencia en paralelo. La proliferación de las células NFS-60 puede estimarse de manera significativa y específica con G-CSF. Se realizó la propagación de las células en placas de microprueba durante 72 horas. Se detectó el efecto proliferativo usando el sustrato resazurina (alamar®Blue) que se convirtió mediante células viables en el colorante de fluorescencia resorufina. La señal de fluorescencia podía detectarse con alta sensibilidad. Se usó el cálculo del ensayo de líneas paralelas de las dos curvas de dosis-respuesta, con al menos tres puntos en la parte lineal de las curvas, como evaluación estadística. El intervalo aceptable era de entre el 80% y el 125% en comparación con la disolución de referencia. Se expresó la potencia relativa en unidades internacionales (UI) que se definieron mediante patrones internos calibrados con respecto al patrón internacional de la OMS para filgrastim. El G-CSF humano, puro, completamente activo, presenta una actividad biológica específica de  $1,0 \times 10^8$  UI/mg.

*Ejemplo 13.9 – Mapeo de péptidos:* [Ph. Eur. 7, 2.2.55]. Se usó el mapeo de péptidos seguido por análisis por espectroscopía de masas (EM) para el análisis de los puentes disulfuro. Se desarrolló el procedimiento de escisión enzimática de los enlaces peptídicos basándose en la monografía de la Ph. Eur. para filgrastim. La proteasa usada para la escisión era glutamil endopeptidasa (EndoGlu-C). Se llevó a cabo la incubación a 37°C durante 24 horas y se detuvo mediante adición de GuHCl 8 M y ebullición. Se realizó el procedimiento de mapeo de péptidos en condiciones reducidas y no reducidas. Las diferencias resultantes en el espectro de EM de los perfiles peptídicos para condiciones reducidas y no reducidas demostraron la posición de los enlaces disulfuro. El G-CSF intacto completamente plegado (filgrastim) tiene dos puentes disulfuro en las posiciones Cys37-Cys43 y Cys65-Cys75, mientras que un residuo de cisteína está libre en la posición 18.

Alternativamente, se separaron péptidos obtenidos a partir de muestras de G-CSF tras la digestión proteolítica en un sistema de RP-HPLC y se detectaron en UV. Este método proporciona datos comparativos, ya que el cromatograma de tipo huella obtenido con la disolución de prueba se compara con el cromatograma obtenido con el material de referencia.

#### Lista de referencias

1. R. R. Burgess, 1996 "Purification of over produced *E. coli* RNA polymerase  $\sigma$  factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl". *Methods Enzymol.* 273, 145-149
2. David C. Dale, 2002 "Colony-Stimulating Factors for the Management of Neutropenia in Cancer Patients", *Aids International Limited Drugs 2002*; 62 Sup. 1, 1-15
3. P.E. Devlin, 1988, "Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows processing by methionine aminopeptidase in *Escherichia coli*", Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) *Gene*, 65, 13-22
4. Arndt Dietrich *et al.*, enero de 2003 "Industrial Protein Folding", [www.g-itverlag.com/go/bioint](http://www.g-itverlag.com/go/bioint) BIOforum Europe, 1-3
5. European Pharmacopoeia, julio de 2010 "Filgrastim concentrated solution"; 2015-2018
6. Elanders Österval, abril de 2007 "Purification and renaturation of recombinant proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies, [www.gelifesciences.com/protein-purifaction](http://www.gelifesciences.com/protein-purifaction) Application note 18-1112-33 AC, 1-4
7. M. Heidari *et al.*, mayo de 2001, "Expression, purification, and *in vitro* biological activities of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor", [www.elsevier.com/locate/vetimm](http://www.elsevier.com/locate/vetimm) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81, 45-57
8. Holloway C.J, 1994, "Applications of Recombinant DNA Technology in the Production of Glycosylated Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor", *European Journal of Cancer* Vol. 30 A, Sup. 3, S2-S6
9. Soo-Hyung Kang *et al.*, julio de 1995, "High Level Expression and Simple Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in *E. coli*", *Biotechnology Letters* Volume 17 N.º 7 687-692
10. Khalilzadeh R. *et al.*, julio de 2008, "Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*", *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 1643-1650
11. Fiona A. O. Marston, 1986, "The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*", *Biochem. J.* (1986) Vol. 240, 1-12
12. G. Molineux, 2004, "The Design and Development of Pegfilgrastim", *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 1235-1244
13. Dasari Venkata Krishna Rao *et al.*, 2008, "A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli* and its characterization", *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2008) 50, 77-87
14. Harald Tschesche, 1990, "Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research", Walter de Gruyter, Berlin, NY, 149-171
15. Rainer Rudolph *et al.*, enero de 1996, "In vitro folding on inclusion body proteins", *The FASEB Journal* Vol. 10, 49-56
16. Ana LS Vanz *et al.*, abril de 2008, "Human granulocyte colony stimulating factor 8hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization", *Microbial Cell Factories* 2008,

www.micorbialcellfactories.com/content/7/1/13, 1-12

17. Chao Zhan WANG *et al.*, 2005, "Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor from *Escherichia coli*", Chinese Chemical Letters Vol. 16 N.º 3  
5 www.imm.ac.cn/journal/ccl.html, 389-392
18. Karl Welte *et al.*, septiembre de 1996, "blood", Blood Vol. 88 N.º 8, American Society of Hematology, www.bloodjournal.org, 1907-1929
19. Paul WINGFIELD *et al.*, 1988, "Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)", Biochem. J. Vol. 256, 213-218  
10
20. Krisztina M. Zsebo *et al.*, 1986, "Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor: Molecular and Biological Characterization", Immunobiol., Vol. 173, 175-184  
15
21. Lu *et al.*, 1992, The Journal of biological Chemistry, Vol 267:8770-8777
22. Documento WO 03/051922 A1
23. Documento WO 01/87925 A2  
20
24. Documento WO 01/04154 A1
25. Documento WO 00/02901  
25
26. Documento US 6.489.450 B2
27. Documento US 5.849.883
28. Documento US 5.681.720  
30
29. Documento US 5.055.555
30. Documento EP 1 837 346 A2  
35
31. Documento EP 1 630 173 A2
32. Documento EP 0 219 874 A2
33. Documento WO 2010/146599 A1  
40
34. Documento WO 2008/096370 A3
35. Documento WO 2006/135176 A1  
45
36. Documento WO 2006/097944 A2
37. Documento WO 2004/015124 A1
38. Documento WO 2004/001056 A1  
50
39. Documento WO 98/53072
40. Documento WO 89/10932  
55
41. Documento WO 87/01132

**Lista de secuencias**

- <110> Richter Gedeon Nyrt.  
60
- <120> MÉTODOS PARA REPLEGAR G-CSF A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN
- <130> HE 162 844  
65
- <150> Documento HU P1200172

<151> 19-03-2012

<160> 3

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10

<211> 174

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 1

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe  
145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
165 170

20

<210> 2

<211> 174

ES 2 664 231 T3

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

5

<400> 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln  
20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met  
35 40 45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Arg Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly  
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser  
85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp  
100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro  
115 120 125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe  
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe  
145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170

10 <210> 3

<211> 175

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15

20

ES 2 664 231 T3

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
 20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
 35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser  
 50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His  
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile  
 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala  
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala  
 115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
 145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 165 170 175

**REIVINDICACIONES**

1. Método para replegar factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de cuerpos de inclusión, que comprende:
  - a) solubilizar G-CSF en presencia de un agente solubilizante;
  - b) realizar una primera etapa de replegamiento y oxidación, que comprende incubar el G-CSF solubilizado en presencia de un agente oxidante y el agente solubilizante;
  - c) eliminar el agente solubilizante mediante adsorción con resina de intercambio iónico y/o cromatografía de intercambio iónico, y realizar opcionalmente una precipitación con ácido; y
  - d) realizar una segunda etapa de replegamiento, que comprende diluir con un tampón de baja conductividad, o más preferiblemente agua, e incubar el G-CSF de la etapa (c),  
 en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza en un tampón de baja conductividad que tiene una conductividad de al menos por debajo de 2mS/cm y durante más de 12 horas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que los cuerpos de inclusión son de un microorganismo, preferiblemente de *E. coli*.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el G-CSF es metionil-G-CSF recombinante bovino o humano.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente solubilizante es N-lauroilsarcosina.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente oxidante es CuSO<sub>4</sub>.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solubilización de G-CSF se realiza a un valor de pH mayor que pH 7.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente solubilizante es N-lauroilsarcosina a una concentración del 0,5% al 1,5%.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza durante al menos dos horas.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza con flujo de aire y sin enfriamiento.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera etapa de replegamiento y oxidación se realiza a un valor de pH de 7-9 y/o a una temperatura de 20-28°C y/o durante 15-25 horas.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) comprende: AEX y CEX, opcionalmente en este orden.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la eliminación del agente solubilizante en la etapa (c) comprende:
  - a) unión a un material de resina de intercambio aniónico mezclando la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración, y/o
  - b) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que el agente solubilizante se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo y/o,
  - c) cromatografía de intercambio iónico en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante permanece en el flujo directo.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:
  - (i) AEX,

- (ii) precipitación con ácido,
- (iii) AEX, y
- 5 (iv) CEX.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente solubilizante y otras impurezas se eliminan mediante la aplicación secuencial de las siguientes etapas:
- 10 a) unión del agente solubilizante a un material de resina de intercambio aniónico mediante el mezclado de la disolución de G-CSF con el material de resina en suspensión y eliminación del material de resina por filtración;
- 15 b) precipitación de impurezas mediante la reducción del pH por debajo de pH 5 y mediante la eliminación del precipitado por filtración;
- c) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que el agente solubilizante residual se une a la resina y G-CSF permanece en el flujo directo;
- 20 d) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina y el agente solubilizante residual permanece en el flujo directo; y
- e) elución de G-CSF unido de la resina de intercambio catiónico mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados.
- 25 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza en condiciones de refrigeración.
- 30 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza a una temperatura de 2-8°C y/o durante al menos 24 horas.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda etapa de replegamiento se realiza a un valor de pH por encima de pH 7.
- 35 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además una etapa de pulido, que comprende una o más cromatografías de intercambio iónico en las que opcionalmente la una o más cromatografías de intercambio iónico en la etapa de pulido comprende(n) una cromatografía de intercambio aniónico seguida por una cromatografía de intercambio catiónico.
- 40 19. Método según la reivindicación 18, en el que la una o más cromatografías de intercambio iónico comprende(n) las siguientes etapas:
- 45 a) cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;
- b) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con un pH disminuido o una concentración de sal aumentada;
- 50 c) cromatografía de intercambio catiónico llevada a cabo en condiciones en las que G-CSF se une a la resina;
- d) elución de G-CSF unido mediante elución por etapas o en gradiente usando un tampón de elución con pH o concentración de sal aumentados;
- 55 caracterizado porque los polímeros de estructura principal de las resinas de intercambio aniónico y catiónico, ambos comprenden derivados de metacrilato.

**Tabla I:**

Condiciones preferidas de las dos etapas de replegamiento

Condición	1 <sup>er</sup> replegamiento	2 <sup>o</sup> replegamiento
Pureza de G-CSF	60-70 %	80-90 %
Concentración de sarcosilo	0.5 %	0
Concentración de CuSO <sub>4</sub>	40 µM	0
Tris-HCl (pH8)	20 mM	10 mM
Valor de pH	8	8
Temperatura	TA	2-8°C
Tiempo de incubación	20-24 h	32-42 h

**Tabla II:**

Rendimientos de tres lotes de producción de G-CSF

Parámetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Cuerpos de inclusión (masa húmeda)	650 g	650 g	650 g
G-CSF purificado (tamaño de lote)	48.5 g	35.0 g	34.5 g
Rendimiento (por masa húmeda de IB)	7.5 %	5.4 %	5.3 %
Pureza final (HPLC)	97.5 %	96.9 %	97.0%

**Tabla III:**

Purificación de G-CSF: Controles en proceso seleccionados (intervalo de tres lotes de producción)

Etapa	Pureza (%) HPLC (pico principal)	Sarcosilo (mg/ml)	Endotoxina (UE/mg)
1 <sup>er</sup> replegamiento	60.5 – 72.9	5.0 (#)	n.t.
AG 1X8 (método discontinuo)	n.t.	0.01 – 0.04	n.t.
Precipitación ácida	77.6 – 90.0	n.d.	47.9 – 62.0
2 <sup>o</sup> replegamiento	80.3 – 90.4	n.t.	2.6 – 60.5
Pulido (DEAE → CM)	96.5 – 97.4	n.t.	n.d.
G-CSF formulado	97.0 – 97.5	n.d.	n.d.

(#) valor calculado; n.d.=no detectable/inferior al límite de detección; n.t.=no sometido a prueba

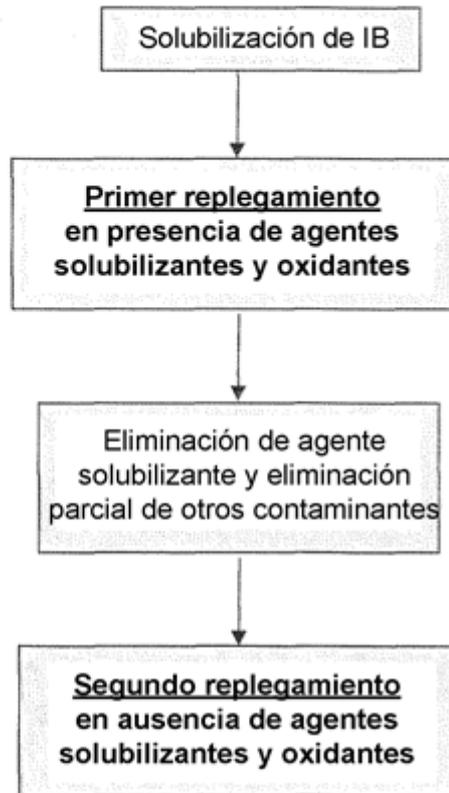
Tabla IV:

Pureza y actividad biológica de 3 lotes de producción de G-CSF

Parámetro	Método de ensayo	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Impurezas (total)	SDS-PAGE (reductor/no reductor)	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas (total)	IEF	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas relacionadas con el producto (total)	RP-HPLC	2.5%	1.6%	3.1%
Impurezas relacionadas con el producto (agregados)	SEC-HPLC	0.20%	0.18%	0.14%
Proteínas de células huésped	ELISA	2.7 ppm	n.d.	n.d.
ADN de célula huésped	qPCR	n.d.	n.d.	5 ppm
Endotoxinas	Prueba LAL	0.288 UE/ml	n.d.	n.d.
Actividad biológica (potencia)	Ensayo de proliferación celular <i>in vitro</i>	107%	99%	107%

n.d. = no detectable / inferior al límite de detección

**Figura 1:** Estrategia de replegamiento en dos etapas para la producción de G-CSF biológicamente activo



Etapa(s) de pulido opcional(es)



Figura 2: Ejemplo de un esquema de replegamiento y purificación para G-CSF a partir de cuerpos de inclusión (IB) según la invención

