

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 013**

51 Int. Cl.:

B01D 15/36 (2006.01)

B01D 15/20 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

B01J 49/00 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2008 PCT/EP2008/005768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2009 WO09010271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2008 E 08784776 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2173450**

54 Título: **Procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía**

30 Prioridad:

17.07.2007 EP 07013960

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

13.03.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstraße 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BURG, JOSEF;
REICHERT, KLAUS;
SCHROTH, AXEL;
SCHURIG, HARTMUT y
WESSNER, AXEL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 704 013 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía

- 5 La presente invención está en el campo de los procedimientos de separación cromatográficos útiles para la purificación de polipéptidos, en especial de polipéptidos PEGilados.

Antecedentes de la invención

- 10 Las proteínas desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Para su aplicación en humanos, cada proteína terapéutica tiene que cumplir criterios distintos. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos en humanos, en especial se han de retirar los subproductos que se acumulan durante el procedimiento de producción. Para cumplir las especificaciones reglamentarias, una o más etapas de purificación han de seguir el procedimiento de fabricación. Entre otras, la pureza, producción y rendimiento desempeñan un papel importante en la determinación de un procedimiento de purificación apropiado.

- 15 Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de sulfopropilo o carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio iónico mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

- 20 Se informa de conjugaciones, por ejemplo, para polietilenglicol (PEG) e interleucina-6 (documento EP 0 442 724), para PEG y eritropoyetina (documento WO 01/02017), para moléculas quiméricas que comprenden endostatina e inmunoglobulinas (documento US 2005/008649), para proteínas de fusión basadas en anticuerpos secretados (documento US 2002/147311), para polipéptidos de fusión que comprenden albúmina (documento US 2005/0100991; seroalbúmina humana documento US 5.876.969), para polipéptidos PEGilados (documento US 2005/0114037) y para fusiones de interferón.

- 25 Necina, R., *et al.* (Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698) informó de la captura de anticuerpos monoclonales humanos directamente de sobrenadantes de cultivo celular por medios de intercambio iónico que presentan una densidad de carga alta. En el documento WO 89/05157 se informa de un procedimiento para la purificación de inmunoglobulinas de producto sometiendo directamente el medio de cultivo celular a un tratamiento de intercambio catiónico. Se describe una purificación en una etapa de anticuerpos monoclonales IgG de ascitis de ratón por Danielsson, A., *et al.*, J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88. Se informa de un procedimiento para purificar un polipéptido por cromatografía de intercambio iónico en el documento WO 2004/024866 en el que se usa un lavado en gradiente para separar un polipéptido de interés de uno o más contaminantes. En el documento EP 0 530 447 se informa de un procedimiento para purificar anticuerpos monoclonales IgG por una combinación de tres etapas cromatográficas. Se informa de una purificación simple del antagonista del receptor de interleucina-1 monoPEGilada por Yu, G., *et al.*, en Process Biotechnol. 42 (2007) 971-977. Wang *et al.* (Wang, H., *et al.*, Peptides 26 (2005) 1213-1218) informa de la purificación de hTFF3 expresado en *E. coli* por una cromatografía de intercambio catiónico en dos etapas. Yun *et al.* (Yun, Q., *et al.*, J. Biotechnol. 118 (2005) 67-74) informan de la purificación de rhG-CSF PEGilado por dos etapas de cromatografía de intercambio iónico consecutivas. El documento EP 1 064 951 divulga conjugados de eritropoyetina con polietilenglicol que comprenden una glucoproteína eritropoyetina que tiene al menos un grupo amino libre y que tiene la actividad biológica *in vivo* de hacer que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y se seleccionan de grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos de la misma que tienen una secuencia de eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glucosilación o un reordenamiento de al menos un sitio de glucosilación; estando unida covalentemente dicha glucoproteína a "n" grupos polietilenglicol de fórmula C-O-(CH₂)_x(OCH₂CH₂)_m-OR formando el carbonilo de cada grupo polietilenglicol un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en el que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 900; n es de 1 a 3; y n y m se eligen de modo que el peso molecular del conjugado menos la glucoproteína eritropoyetina sea de 20 kilodalton a 100 kilodalton y procedimientos de producción y purificación de dicho conjugado.

Sumario de la invención

- 60 Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte después de la elución de compuestos de interés que comprende las siguientes etapas en este orden:
- 65 - eluir polipéptidos adsorbidos de la columna con una solución tamponada acuosa que comprende cloruro de sodio

a una concentración de al menos 500 mM,

- limpiar la columna con agua purificada,
- 5 - aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna,
- limpiar la columna con agua purificada,
- aplicar una solución que comprende dihidrogenofosfato de sodio 0,5 M y ácido fosfórico 1 M a la columna,
- 10 - limpiar la columna con agua purificada,
- aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna durante al menos 4 horas, y
- 15 - regenerar la columna de intercambio catiónico limpiando la columna con agua purificada.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se divulga un procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía de intercambio catiónico después de la elución de compuestos de interés que comprende las siguientes etapas:

- retirar los polipéptidos unidos residuales de la columna de intercambio catiónico con una solución tamponada acuosa que comprende cloruro de sodio,
- 25 - limpiar la columna con agua purificada,
- aplicar una solución de hidróxido de sodio a la columna,
- limpiar la columna con agua purificada,
- 30 - aplicar una solución que comprende dihidrogenofosfato de sodio y ácido fosfórico a la columna,
- limpiar la columna con agua purificada,
- 35 - aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna durante al menos 4 horas, y
- regenerar la columna de intercambio catiónico limpiando la columna con agua purificada.

El término "agua purificada" como se usa en la presente solicitud indica agua para inyectables de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos.

El término "material de intercambio iónico" como se usa en la presente solicitud indica una matriz de alto peso molecular inmóvil que porta sustituyentes cargados unidos covalentemente usada como fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico. Para la neutralidad de carga global, los contraiones no unidos covalentemente se unen a la misma. El "material de intercambio iónico" tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos covalentemente por iones cargados de manera similar de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, la "resina de intercambio iónico" se denomina resina de intercambio catiónico o resina de intercambio aniónico. Dependiendo de la naturaleza del grupo cargado (sustituyente), la "resina de intercambio iónico" se denomina, por ejemplo, en el caso de resinas de intercambio catiónico, resina de ácido sulfónico (S) o resina de sulfopropilo (SP) o resina de carboximetilo (CM). Dependiendo de la naturaleza química del grupo cargado/sustituyente, la "resina de intercambio iónico" se puede clasificar adicionalmente como resina de intercambio iónico fuerte o débil, dependiendo de la fuerza del sustituyente cargado unido covalentemente. Por ejemplo, las resinas de intercambio catiónico fuerte tienen un grupo ácido sulfónico, preferentemente un grupo sulfopropilo, como sustituyente cargado, las resinas de intercambio catiónico débil tienen un grupo carboxílico, preferentemente un grupo carboximetilo, como sustituyente cargado, y las resinas de intercambio aniónico débil tienen un grupo dietilaminoetilo como sustituyente cargado. En un modo de realización, la columna de cromatografía de intercambio catiónico contiene una resina de intercambio catiónico de sulfopropilo, es decir, es una columna de cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo.

Los diferentes tipos de materiales de intercambio iónico, es decir, fases estacionarias, están disponibles bajo diferentes nombres y a partir de una multitud de empresas tales como, por ejemplo, materiales de intercambio catiónico Bio-Rex® (por ejemplo, tipo 70), Chelex® (por ejemplo, tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo, tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo, tipo 50W, MP) todos disponibles de BioRad Laboratories, WCX 2 disponible de Cipergeren, Dowex® MAC-3 disponible de Dow Chemical Company, Mustang C y Mustang S disponibles de Pall Corporation, Cellulose CM (por ejemplo, tipo 23, 52), hyper-D, Partisphere disponible de Whatman plc., Amberlite® IRC (por ejemplo, tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo, tipo SP, CM, 650M) todos

disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, CM 1500 y CM 3000 disponibles de BioChrom Labs, SP-Sepharose™, CM-Sepharose™ disponibles de GE Healthcare, resinas Poros disponibles de PerSeptive Biosystems, Asahipak ES (por ejemplo, tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo, tipo 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (por ejemplo, tipo 420N, 825), IEC QA (por ejemplo, tipo LG, 825) disponible de Shoko America Inc., resina de intercambio catiónico 50W disponible de Eichrom Technologies Inc. En el procedimiento de la presente invención, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico fuerte tal como Macro-Prep® High S o 25S, o MacroCap SP, o Toyopearl® SP 650M, o Source S, o SP Sepharose, o POLYCAT A. Los materiales de intercambio aniónico ejemplares no usados en el procedimiento de la presente invención son Dowex® 1 disponible de Dow chemical company, AG® (por ejemplo, tipo 1, 2, 4), Bio-Rex® 5, DEAE Bio-Gel 1, Macro-Prep® DEAE todos disponibles de BioRad Laboratories, resina de intercambio aniónico tipo 1 disponible de Eichrom Technologies Inc., Source Q, ANX Sepharose 4, DEAE Sepharose (por ejemplo, tipo CL-6B, FF), Q Sepharose, Capto Q, Capto S todos disponibles de GE Healthcare, AX-300 disponible de PerkinElmer, Asahipak ES-502C, AXpak WA (por ejemplo, tipo 624, G), IEC DEAE todos disponibles de Shoko America Inc., Amberlite® IRA-96, Toyopearl® DEAE, TSKgel DEAE todos disponibles de Tosoh Bioscience GmbH, Mustang Q disponible de Pall Corporation.

El término "limpiar" como se usa en la presente solicitud indica el lavado de una columna con dos o más volúmenes de columna de una solución específica.

El término "mismo tipo de material de intercambio catiónico" indica dos etapas de cromatografía de intercambio iónico consecutivas que se realizan empleando un material de intercambio catiónico idéntico. Esto quiere decir que las etapas de cromatografía de intercambio catiónico consecutivas se llevan a cabo usando una primera porción del material de intercambio catiónico para la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico y usando la segunda porción del mismo material de intercambio catiónico para la segunda cromatografía de intercambio catiónico o bien usando el mismo material de intercambio catiónico para ambas etapas de cromatografía de intercambio catiónico.

Los términos "elución por etapas" y "procedimiento de elución por etapas", que se usan de manera intercambiable en la presente solicitud, indican un procedimiento en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que provoca elución, es decir, la disolución de un compuesto unido de un material, se eleva o reduce de una vez, es decir, directamente de un valor/nivel al siguiente valor/nivel. En esta "elución por etapas", una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, concentración de una sal y/o el flujo de una cromatografía, se cambian todas a la vez de un primer valor, por ejemplo, inicial, a un segundo valor, por ejemplo, final, es decir, las condiciones se cambian de forma incremental, es decir, gradual, al contrario que un cambio lineal. En el "procedimiento de elución por etapas" después de cada incremento en la fuerza iónica se recoge una nueva fracción. Esta fracción contiene los compuestos recuperados del material de intercambio iónico con el correspondiente incremento en la fuerza iónica. Después de cada incremento, se mantienen las condiciones hasta la siguiente etapa en el procedimiento de elución.

Los términos "elución continua" y "procedimiento de elución continua", que se usan de manera intercambiable en la presente solicitud, indican un procedimiento en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que provoca elución, es decir, la disolución de un compuesto unido de un material, se eleva o reduce continuamente, es decir, la concentración se cambia por una secuencia de pequeñas etapas, cada una no más grande que un cambio de un 2 %, preferentemente de un 1 %, de la concentración de la sustancia que provoca elución. En esta "elución continua", una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, concentración de una sal y/o el flujo de una cromatografía, se pueden cambiar de forma lineal o exponencial o asintótica. Preferentemente, el cambio es lineal.

El término "aplicar a" y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en la presente solicitud indica una etapa parcial de un procedimiento de purificación en la que una solución, por ejemplo, que contiene una sustancia de interés que se va a purificar, se pone en contacto con una fase estacionaria. Esto indica que a) se añade la solución a un dispositivo cromatográfico en el que se sitúa la fase estacionaria, o b) que se añade la fase estacionaria a la solución. En el caso a) la solución, por ejemplo, que contiene la sustancia de interés que se va a purificar, pasa a través de la fase estacionaria permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Dependiendo de las condiciones, tales como, por ejemplo, pH, conductividad, concentración de sal, temperatura y/o caudal, algunas sustancias de la solución se unen a la fase estacionaria y, por tanto, se retiran de la solución. Otras sustancias permanecen en solución o se desorben de la fase estacionaria. Las sustancias en solución se pueden encontrar en el flujo continuo. El "flujo continuo" indica la solución obtenida después del paso del dispositivo cromatográfico, que puede ser la solución aplicada que contiene la sustancia de interés o bien el tampón, que se usa para limpiar la columna o para provocar la elución de una o más sustancias unidas a la fase estacionaria. En un modo de realización, el dispositivo cromatográfico es una columna o un casete. La sustancia de interés se puede recuperar de la solución después de la etapa de purificación por procedimientos familiares para un experto en la técnica, tales como, por ejemplo, precipitación, precipitación salina, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad o reducción del volumen del disolvente para obtener la sustancia de interés en una forma sustancialmente homogénea. En el caso b) se añade la fase estacionaria, por ejemplo, como un sólido, a la solución, por ejemplo, que contiene la sustancia de interés que se va a purificar, permitiendo una interacción entre la fase estacionaria y las sustancias en solución. Después de la interacción, se retira la fase estacionaria, por ejemplo, por filtración, por lo que, por ejemplo, la sustancia de interés se une a la fase estacionaria y se retira con la misma de la solución o bien no se une a la fase estacionaria y permanece en la solución.

5 El término "en condiciones adecuadas para la unión" y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en la presente solicitud indica que una sustancia de interés, por ejemplo, un eritropoyetina PEGilada, se une a una fase estacionaria cuando se pone en contacto con ella, por ejemplo, un material de intercambio iónico. Esto no indica necesariamente que un 100 % de la sustancia de interés se una, sino que esencialmente un 100 % de la sustancia de interés se une, es decir, al menos un 50 % de la sustancia de interés se une, preferentemente al menos un 75 % de la sustancia de interés se une, preferentemente al menos un 85 % de la sustancia de interés se une, más preferentemente un 95 % de la sustancia de interés se une a la fase estacionaria.

10 El término "tamponada" como se usa en la presente solicitud indica una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas se equilibran por una sustancia tampón. Se puede usar cualquier sustancia tampón que dé como resultado un efecto de este tipo. En un modo de realización, se usan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfolina ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo. En un modo de realización preferente, se usan ácido fosfórico o sales del mismo, o ácido acético o sales del mismo, o ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio.

20 Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, *Chromatography*, 5.^a edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann (ed) Elsevier Science Publishing Company 1992 *Chromatography* 5.^a ed., 51A 1992; *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); *Chromatography Today*, Poole, C. F., y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Sambrook, J., *et al.* (ed), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M., *et al.* (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York.

30 La PEGilación de eritropoyetina normalmente da como resultado una mezcla de diferentes compuestos, tales como eritropoyetina poliPEGilada, eritropoyetina monoPEGilada, eritropoyetina no PEGilada, productos de hidrólisis del éster de PEG activado, así como productos de hidrólisis de la propia eritropoyetina. Para obtener una eritropoyetina monoPEGilada en forma sustancialmente homogénea, estas sustancias se tienen que separar y el compuesto de interés se tiene que purificar.

35 Por lo tanto, adicionalmente la presente invención proporciona un procedimiento para obtener una eritropoyetina monoPEGilada en forma sustancialmente homogénea que comprende las siguientes etapas:

- 40 a) PEGilar la eritropoyetina usando un reactivo de PEGilación activado de un peso molecular de 20 kDa a 40 kDa,
- b) purificar la eritropoyetina PEGilada obtenida en la etapa a) con dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte consecutivas, en el que la primera y segunda etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte emplean el mismo tipo de material de intercambio catiónico fuerte,
- 45 c) recuperar la eritropoyetina monoPEGilada de la segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico en forma sustancialmente homogénea,
- d) regenerar la columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte por un procedimiento de acuerdo con la invención.

50 Este procedimiento es especialmente útil para la purificación de polipéptidos recombinantes PEGilados, que están glucosilados, es decir, que se han producido por una célula de mamífero, preferentemente una célula CHO, célula HEK293, célula BHK, célula Per.C6[®] o célula HeLa y después de esto se PEGilan químicamente. El procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas en este orden:

- retirar polipéptidos unidos de la columna de intercambio catiónico con una solución tamponada acuosa que comprende cloruro de sodio a una concentración de al menos 500 mM,
- 60 - limpiar la columna con agua purificada, preferentemente con al menos dos volúmenes de columna,
- aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna, preferentemente al menos dos volúmenes de columna,
- 65 - limpiar la columna con agua purificada, preferentemente con al menos dos volúmenes de columna,

- aplicar una solución que comprende dihidrogenofosfato de sodio 0,5 M y ácido fosfórico 1 M a la columna, preferentemente al menos tres volúmenes de columna,
- limpiar la columna con agua purificada, preferentemente con al menos dos volúmenes de columna,
- aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna durante al menos 4 horas, preferentemente durante 4 horas, y
- regenerar la columna de intercambio catiónico limpiando la columna con agua purificada, preferentemente con al menos dos volúmenes de columna.

En la primera etapa del procedimiento está la eritropoyetina PEGilada. Las moléculas de polímero polietilenglicol (PEG) usadas en la reacción de PEGilación tienen un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a 40 kDa (por "peso molecular" como se usa aquí, se debe entender el peso molecular medio del PEG porque el PEG como compuesto polimérico no se obtiene con un peso molecular definido pero, de hecho, tiene una distribución de peso molecular; el término "aproximadamente" indica que en dichas preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular indicado, es decir, el término aproximadamente se refiere a una distribución de peso molecular en la que un 95 % de las moléculas de PEG tienen un peso molecular dentro de +/- 10 % del peso molecular indicado. Por ejemplo, un peso molecular de 30 kDa indica un intervalo de desde 27 kDa a 33 kDa).

El término "eritropoyetina" se refiere a una proteína que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una proteína o polipéptido sustancialmente homólogo a la misma, con propiedades biológicas que se relacionan con la estimulación de la producción de glóbulos rojos y la estimulación de la división y diferenciación de progenitores eritroides sensibilizados en la médula ósea. Se puede preparar eritropoyetina recombinante por medio de la expresión en células eucariotas, por ejemplo en células CHO, o células BHK, o células HeLa por tecnología de ADN recombinante o por activación de genes endógenos, es decir, la glucoproteína eritropoyetina se expresa por activación de genes endógenos, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.733.761, US 5.641.670, US 5.733.746, WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955. En un modo de realización, la eritropoyetina de acuerdo con la invención se basa en la secuencia de EPO humana. En un modo de realización preferente, la eritropoyetina humana tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, más preferentemente la eritropoyetina humana tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. El término "eritropoyetina" también indica variantes de la proteína de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en la que uno o más residuos aminoacídicos se han cambiado, delecionado o insertado, y que tiene la misma actividad biológica que la proteína no modificada, tal como, por ejemplo, la informada en los documentos EP 1 064 951 o US 6.583.272. Una variante puede tener la secuencia de aminoácidos de eritropoyetina humana que tiene de 1 a 6 sitios adicionales para la glucosilación. La actividad específica de la eritropoyetina PEGilada se puede determinar por diversos ensayos conocidos en la técnica. La actividad biológica de la eritropoyetina PEGilada purificada de la presente invención es tal que la administración de la proteína por inyección a pacientes humanos da como resultado células de médula ósea que incrementan la producción de reticulocitos y glóbulos rojos en comparación con grupos de sujetos no inyectados o de control. La actividad biológica de la eritropoyetina PEGilada obtenida y purificada de acuerdo con la presente invención se puede someter a prueba por procedimientos de acuerdo con Pharmeuropa Spec. Issue Biologicals BRP Erythropoietin Bio 97-2 (1997) 31-48.

"PEG" o "grupo PEG" de acuerdo con la invención quiere decir un residuo que contiene polietilenglicol como parte esencial. Un PEG de este tipo puede contener otros grupos químicos, que son necesarios para las reacciones de unión, que resultan de la síntesis química de la molécula, o que son espaciadores para la distancia óptima de las partes de la molécula. Estos otros grupos químicos no se usan para el cálculo del peso molecular de la molécula de polímero PEG. Además, un PEG de este tipo puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que se unen entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se llaman PEG con múltiples ramas o ramificados. Se pueden preparar PEG ramificados, por ejemplo, por la adición de poli(óxido de etileno) a diversos polioles, incluyendo glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Se describen PEG ramificados, por ejemplo, en los documentos EP 0 473 084, US 5.932.462. Como PEG con un peso molecular de 20-35 kDa, se usan moléculas de PEG lineales en un modo de realización y como polímeros de PEG con un peso molecular de más de 35 kDa, en especial con 40 kDa, se usan PEG ramificados en otro modo de realización. Como PEG 40 kDa, es particularmente preferente un PEG de dos ramas.

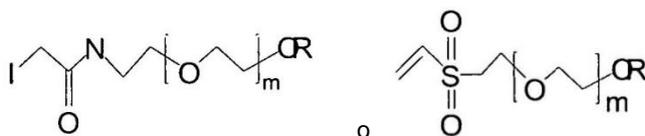
El término "PEGilación" quiere decir un enlace covalente de un residuo de polietilenglicol en el extremo N del polipéptido y/o un residuo de lisina interno. La PEGilación de proteínas es ampliamente conocida en el estado de la técnica y se revisa, por ejemplo, por Veronese, F.M., *Biomaterials* 22 (2001) 405-417. Se puede unir PEG usando diferentes grupos funcionales y polietilenglicoles con diferente peso molecular, PEG lineales y ramificados, así como diferentes grupos de enlace (véase también Francis, G.E., *et al.*, *Int. J. Hematol.* 68 (1998) 1-18; Delgado, C., *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* 9 (1992) 249-304). Se puede realizar la PEGilación de eritropoyetina en solución acuosa con reactivos de PEGilación como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/44785, en un modo de realización que usa moléculas de PEG lineales o ramificadas activadas con NHS de un peso molecular de entre 5 kDa y 40 kDa. También se puede realizar la PEGilación en la fase sólida de acuerdo con Lu, Y., *et al.*,

Reactive Polymers 22 (1994) 221-229. También se puede producir el polipéptido PEGilado de forma N terminal no aleatoriamente de acuerdo con el documento WO 94/01451.

5 Dichos procedimientos dan como resultado una eritropoyetina que está PEGilada en uno o más grupos amino ϵ de residuos de lisina y/o en el grupo amino N terminal. Se puede realizar la PEGilación selectiva en el aminoácido N terminal de acuerdo con Felix, A.M., *et al.*, ACS Symp. Ser. 680 (Poly(ethylene glycol)) (1997) 218-238. Se puede lograr la PEGilación N terminal selectiva durante la síntesis en fase sólida por acoplamiento de un derivado aminoácido PEGilado en N^o al aminoácido N-1 terminal de la cadena peptídica. Se puede realizar la PEGilación de la cadena lateral durante la síntesis en fase sólida por acoplamiento de derivados de lisina PEGilados en N^o a la cadena en crecimiento. La PEGilación combinada N terminal y de cadena lateral es factible como se describe anteriormente en la síntesis en fase sólida o bien por síntesis en fase de solución aplicando reactivos de PEG activados a un péptido con amino desprotegido.

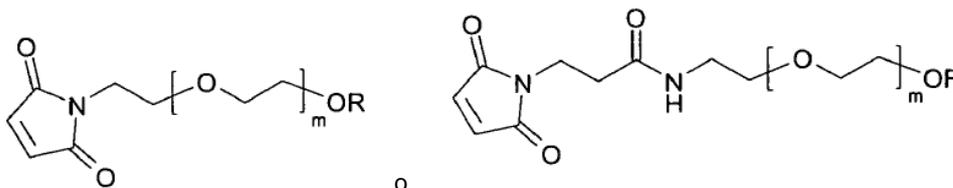
15 Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con, en un modo de realización, un peso molecular promedio de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 40 kDa, en un modo de realización preferente de desde aproximadamente 20 a aproximadamente 40 kDa, y en un modo de realización más preferente de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 35 kDa. Los derivados de PEG pueden ser PEG lineales o ramificados. Se puede obtener una amplia variedad de derivados de PEG adecuados para su uso en la preparación de conjugados de PEG-proteína y PEG-péptido de Shearwater Polymers (Huntsville, AL, EE. UU., www.nektar.com).

20 Los derivados de PEG activados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M., *et al.*, J. Bioconjug. Chem. 7 (1996) 363-368, para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son adecuadas para la preparación de los fragmentos PEGilados. Los ejemplos de reactivos de PEG reactivos son yodo-acetil-metoxi-PEG o metoxi-PEG-vinilsulfona (m es, en un modo de realización, un número entero de aproximadamente 450 a aproximadamente 900 y R es alquilo inferior, lineal o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono tal como metilo, etilo, isopropilo, etc., por lo que es preferente metilo):



30 El uso de estas sustancias activadas por yodo es conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, por Hermanson, G. T., en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148.

35 En un modo de realización, la especie de PEG es un éster de PEG activado, por ejemplo, propionato de N-hidroxisuccinimidilo, o butanoato de N-hidroxisuccinimidilo, o N-hidroxisuccinimidas tales como PEG-NHS (Monfardini, C., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69). En un modo de realización, el PEG se activa por el éster de N-hidroxisuccinimida



40 usando alcoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida, tal como metoxi-PEG-N-hidroxisuccinimida (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.), en el que R y m son como se define anteriormente. En un modo de realización, la especie de PEG es el éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido metoxi-poli(etilenglicol)-butírico. El término "alcoxi" se refiere a un grupo éter alquílico en el que el término "alquilo" quiere decir un grupo alquilo de cadena lineal o cadena ramificada que contiene un máximo de cuatro átomos de carbono, tal como metoxi, etoxi, n-propoxi y similares, preferentemente metoxi.

50 El término "forma sustancialmente homogénea" como se usa en la presente solicitud indica que la eritropoyetina PEGilada obtenida, contenida o usada es la que tiene un número definido de grupos de PEG unidos. En un modo de realización, la eritropoyetina PEGilada es una eritropoyetina monoPEGilada. La preparación puede contener eritropoyetina sin reaccionar (es decir, que carece de grupo PEG), eritropoyetina poliPEGilada, así como fragmentos del polipéptido generado durante la reacción de PEGilación. El término "forma sustancialmente homogénea" indica que una preparación de una eritropoyetina monoPEGilada contiene al menos un 50 % (p/p) de la eritropoyetina monoPEGilada, al menos un 75 % de la eritropoyetina monoPEGilada, al menos un 90 % de la eritropoyetina monoPEGilada, o más de un 95 % de la eritropoyetina monoPEGilada. Los valores en porcentaje se basan en el % de área del cromatograma correspondiente a la cromatografía de intercambio catiónico a partir de la que se obtiene la eritropoyetina monoPEGilada.

La presente invención informa de un procedimiento para la purificación de una eritropoyetina monoPEGilada para obtener una forma sustancialmente homogénea de una eritropoyetina monoPEGilada. Se ha descubierto sorprendentemente que la combinación de dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico consecutivas que emplean el mismo tipo de material de intercambio catiónico proporciona una forma sustancialmente homogénea de una eritropoyetina monoPEGilada. Por lo tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento para la purificación de una eritropoyetina monoPEGilada que comprende las etapas de proporcionar una solución que comprende eritropoyetina mono, poli y no PEGilada, realizar dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte consecutivas, recuperar la eritropoyetina monoPEGilada purificada en la segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte, en el que el mismo tipo de material de intercambio catiónico fuerte se usa en ambas etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte, y regenerar la columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte por el procedimiento de acuerdo con la invención.

La recuperación de la eritropoyetina monoPEGilada purificada en la segunda etapa de cromatografía de intercambio fuerte es por elución de la eritropoyetina monoPEGilada del segundo material de cromatografía de intercambio catiónico fuerte. En un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, las dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte difieren en el procedimiento de elución empleado. La primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte se realiza en un modo de realización como procedimiento de elución por etapas, es decir, la fuerza iónica del tampón usado se incrementa gradualmente, es decir, de una vez, de un valor de fuerza iónica al siguiente valor de fuerza iónica. El procedimiento de elución por etapas se realiza en un modo de realización como un procedimiento de elución en tres etapas. En la primera etapa, se eluye principalmente eritropoyetina poliPEGilada de la columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte. El segundo incremento en la fuerza iónica básicamente eluye la eritropoyetina monoPEGilada con una pureza de más de un 60 % en base al área del correspondiente cromatograma de exclusión por tamaño (% de área). El tercer incremento en la fuerza iónica eluye principalmente la eritropoyetina no PEGilada restante de la columna.

La segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte se realiza en un modo de realización como procedimiento de elución continua, es decir, la fuerza iónica del tampón incrementa continuamente. Las fracciones eluidas que contienen la eritropoyetina monoPEGilada se combinan para obtener una eritropoyetina monoPEGilada en forma sustancialmente homogénea, que contiene en un modo de realización menos de un 0,5 % de formas de bajo peso molecular en base al área del correspondiente cromatograma. El tampón está presente en un modo de realización en una concentración de desde 10 mM a 250 mM, preferentemente de desde 50 mM a 150 mM, más preferentemente a aproximadamente 100 mM.

Por lo tanto, en el procedimiento de acuerdo con la invención las dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte consecutivas son las siguientes etapas:

- a) aplicar una solución tamponada acuosa que comprende una mezcla de eritropoyetina mono, poli y no PEGilada a una primera columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte en condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina monoPEGilada al material de intercambio catiónico fuerte contenido en dicha primera columna,
- b) recuperar una eritropoyetina monoPEGilada de la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte por un procedimiento de elución por etapas con un incremento gradual de la fuerza iónica del tampón con flujo continuo, en el que el contenido relativo de eritropoyetina monoPEGilada se incrementa en comparación con la mezcla aplicada de la etapa a),
- c) aplicar la eritropoyetina monoPEGilada recuperada de la etapa b) a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte en condiciones adecuadas para la unión de dicha eritropoyetina al material de intercambio catiónico fuerte contenido en dicha segunda columna, por lo que el material de intercambio catiónico fuerte contenido en dicha segunda columna es del mismo tipo que el material de intercambio catiónico fuerte en la primera columna,
- d) recuperar la eritropoyetina monoPEGilada purificada en una forma sustancialmente homogénea de dicha segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte por un procedimiento de elución continua con un incremento continuo de la fuerza iónica del tampón de flujo continuo.

La PEGilación de un polipéptido normalmente no proporciona el producto de PEGilación en forma homogénea. Además, se obtiene como una mezcla de producto monoPEGilado, poliPEGilado y no PEGilado. Por lo tanto, la solución de la eritropoyetina PEGilada aplicada en la etapa a) del procedimiento es una mezcla de eritropoyetina mono, poli y no PEGilada y formas o fragmentos de bajo peso molecular en un tampón acuoso. El contenido relativo de las diferentes sustancias se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC). La suma del área de los máximos correlacionados, es decir, el área bajo los picos, en el cromatograma de exclusión por tamaño es el área total del cromatograma de exclusión por tamaño. La fracción de un único máximo se da como % de área, es decir, como fracción de área relativa del área total del cromatograma.

Los procedimientos cromatográficos generales, su uso y los términos relacionados son conocidos por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Chromatography, 5.^a edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann (ed.), Elsevier Science Publishing Company, Chromatography 5.^a ed., 51 A (1992) y otros libros de texto relacionados. Durante la cromatografía, un tampón fluye a través de la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Este "tampón de flujo continuo" se ajusta de acuerdo con los requisitos de las etapas del procedimiento de cromatografía. Transporta la sustancia de interés al (aplicar) y del (eluir) material cromatográfico.

En la primera etapa de la cromatografía de intercambio catiónico, se aplica la mezcla de eritropoyetina monoPEGilada, poliPEGilada y no PEGilada a una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml a la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico en una solución acuosa tamponada con fosfato de potasio aproximadamente 100 mM a aproximadamente pH 3,0. El término "aproximadamente" como se usa en la presente solicitud actual indica un intervalo de un 10 % alrededor del valor dado, es decir, $\pm 10\%$. Antes y después de la aplicación, se lava la primera columna con la misma solución tampón. Para la primera etapa en el procedimiento de elución por etapas, se cambia el tampón a un tampón con fosfato de potasio aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio aproximadamente 90 mM a aproximadamente pH 3,0. Con este tampón, se eluyen el reactivo de PEG hidrolizado, es decir, el correspondiente ácido carbónico PEGilado, el reactivo de acoplamiento sin reaccionar y la eritropoyetina poliPEGilada de la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Para la segunda etapa en el procedimiento de elución en tres etapas, se cambia el tampón a un tampón con fosfato de potasio aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio aproximadamente 250 mM a aproximadamente pH 3,0. En esta etapa, se recupera la eritropoyetina monoPEGilada de la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico. Se diluye el tampón de flujo continuo recogido de esta etapa de elución aproximadamente de 1:5 a 1:8 con agua purificada. Después de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, la eritropoyetina monoPEGilada recuperada está libre de PEG libre.

El tampón de flujo continuo recogido de la segunda etapa de la primera cromatografía de intercambio catiónico contiene la eritropoyetina monoPEGilada en un contenido relativo incrementado, es decir, la fracción en peso o en % de área (en el cromatograma de una cromatografía de exclusión por tamaño del tampón de flujo continuo recogido de la segunda etapa) de la eritropoyetina monoPEGilada se ha incrementado en comparación con antes de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico. En un modo de realización, el contenido relativo de eritropoyetina monoPEGilada es de al menos un 60 % de área. En un modo de realización preferente, el contenido relativo de eritropoyetina monoPEGilada es de al menos un 80 % en área.

Para la purificación adicional de la eritropoyetina monoPEGilada se realiza una segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Para la segunda cromatografía de intercambio catiónico, se ajusta el tampón de flujo continuo recogido y diluido de la segunda etapa de elución a una concentración de fosfato de potasio de aproximadamente 100 mM y a un pH de aproximadamente pH 3,0 se aplica a una segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico que contiene un material de intercambio catiónico del mismo tipo que la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico. En un modo de realización, la segunda columna de intercambio catiónico y el material de intercambio catiónico contenido en la misma son los mismos que en la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico. La eritropoyetina monoPEGilada se recupera de la segunda columna de cromatografía de intercambio catiónico aplicando un gradiente lineal que comienza con un tampón de fosfato de potasio de una concentración de aproximadamente 100 mM con cloruro de sodio aproximadamente 50 mM a aproximadamente pH 3,0 y termina con un tampón de fosfato de potasio de una concentración de aproximadamente 100 mM con cloruro de sodio aproximadamente 500 mM a aproximadamente pH 3,0. El cambio en la concentración de cloruro de sodio es lineal en diez volúmenes de columna. El tampón de flujo continuo se fracciona y cada fracción se diluye con hidrogenofosfato de dipotasio 1 M para incrementar el valor de pH a aproximadamente pH de 6 a 8.

Después de la segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico se obtiene la eritropoyetina monoPEGilada en forma sustancialmente homogénea, preferentemente con una pureza de al menos un 95 % por área.

Un experto en la técnica está familiarizado con la tecnología de la cromatografía de intercambio iónico. En la etapa de recuperación del polipéptido unido al material de intercambio catiónico, se incrementa la fuerza iónica, es decir, la conductividad, del tampón/solución que pasa a través de la columna de intercambio iónico. Esto se puede lograr por un incremento en la concentración salina del tampón o por la adición de otras sales, llamadas sales de elución, a la solución tampón. Dependiendo del procedimiento de elución, la concentración de tampón/sal se incrementa de una vez (procedimiento de elución por etapas) o de forma continua (procedimiento de elución continua) por la adición fraccionada de una solución de sal de elución o tampón concentrada. En un modo de realización, la sal de elución es citrato de sodio, cloruro de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, u otras sales de ácido cítrico o ácido fosfórico, o cualquier mezcla de estos componentes. En un modo de realización preferente, la sal de elución es citrato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio o mezclas de los mismos.

En el procedimiento actual, el material de intercambio catiónico fuerte es, en un modo de realización preferente Toyopearl[®] SP 650 M, en otro modo de realización preferente un material de intercambio catiónico de sulfopropilo. La concentración de la sal, que provoca la elución, está en un modo de realización en el intervalo de desde 5 mM a 500 mM, en un modo de realización preferente de desde 5 mM a 400 mM, y en un modo de realización

especialmente preferente de desde 5 mM a 250 mM. En otro modo de realización de la invención, la sal que provoca la elución se usa al mismo tiempo como sustancia tampón, por ejemplo, ácido cítrico o sales del mismo o ácido fosfórico o sales del mismo.

5 Se puede usar la eritropoyetina monoPEGilada en composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han descrito composiciones apropiadas en los documentos WO 97/09996, WO 97/40850, WO 98/58660 y WO 99/07401. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables preferentes para formular los productos de la invención están seroalbúmina humana, proteínas plasmáticas humanas, etc. Los compuestos de la presente invención se pueden
10 formular en tampón de fosfato de sodio/potasio 10 mM a pH 7 que contiene un agente de tonicidad, por ejemplo cloruro de sodio 132 mM. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener un conservante. La composición farmacéutica puede contener diferentes cantidades de eritropoyetina monoPEGilada, por ejemplo, 10 - 1000 µg/ml, por ejemplo, 50 µg o 400 µg.

15 La administración de los productos de la glucoproteína eritropoyetina de la presente invención da como resultado la formación de glóbulos rojos en seres humanos. Por lo tanto, la administración del producto de la glucoproteína eritropoyetina monoPEGilada repone esta proteína eritropoyetina que es importante en la producción de glóbulos rojos. Las composiciones farmacéuticas que contienen los productos de la glucoproteína eritropoyetina monoPEGilada se pueden formular con una fuerza eficaz para su administración por diversos medios a un paciente
20 humano que experimenta trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o defectuosa, solos o bien como parte de una afección o enfermedad. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por inyección, tal como por inyección subcutánea o intravenosa. Las cantidades promedio del producto de la glucoproteína eritropoyetina monoPEGilada pueden variar. La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de afección que se está tratando, la afección del paciente
25 que se está tratando, así como los otros ingredientes en la composición. Por ejemplo, se puede administrar de 0,01 a 10 µg por kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 1 µg por kg de peso corporal, por ejemplo, una vez a la semana.

Se ha descubierto sorprendentemente que se puede regenerar una columna de cromatografía de intercambio
30 catiónico con un procedimiento de acuerdo con la invención sin una disminución considerable en la eficacia de separación. Se ha demostrado que con un procedimiento de regeneración de acuerdo con la invención se puede usar una columna de cromatografía de intercambio catiónico durante al menos 40 ciclos de separación, en un modo de realización durante al menos 50 ciclos de separación, en otro modo de realización durante al menos 60 ciclos de separación sin una disminución considerable en la eficacia de separación (véase la figura 1) y el rendimiento (véase la figura 2). El término "ciclo de separación" como se usa en la presente solicitud indica la secuencia i) equilibrio de la columna, ii) aplicación de la solución que se va a separar en la columna, iii) lavado de la columna, iv) recuperación de los compuestos adsorbidos de la columna, v) lavado de la columna, vi) regeneración de la columna. También se ha descubierto que con el procedimiento de regeneración de acuerdo con la invención no solo se puede evitar una
35 disminución en la eficacia de separación sino que también se puede evitar una disminución en la capacidad de carga (véase la figura 2).

El término "eficacia de separación" como se usa en la presente solicitud indica la capacidad de una columna de cromatografía de intercambio catiónico para separar los compuestos de una solución. El término "sin una
40 disminución considerable" como se usa en la presente solicitud indica que la columna de cromatografía de intercambio catiónico proporciona la misma separación de compuestos, es decir, en una variación de un +/- 5 %, en un modo de realización en una variación de +/- 2,5 %, en cromatografías consecutivas de una solución que contiene los mismos compuestos. El término "capacidad de carga" como se usa en la presente solicitud indica la cantidad de un compuesto de interés que se recupera de una columna de cromatografía de intercambio catiónico.

50 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

55 Figura 1 Pureza de eritropoyetina monoPEGilada en el conjunto de tampones de flujo continuo de la primera cromatografía durante la validación del número de ciclos del procedimiento de regeneración.

Figura 2 Rendimiento de eritropoyetina monoPEGilada en el conjunto de tampones de flujo continuo de la primera cromatografía durante la validación del número de ciclos del procedimiento de regeneración.
60

Materiales y procedimientos

SE-HPLC

65 SE-HPLC separa las proteínas de acuerdo con su peso molecular aparente. Por lo tanto, el procedimiento puede detectar la presencia de eritropoyetina monoPEGilada, formas y fragmentos de bajo peso molecular, formas

poliPEGiladas y agregados superiores de eritropoyetina. La HPLC se equipa con un detector de 220 nm y una columna Superose 6 HR (dimensiones 10 x 300 mm, Pharmacia Biotech, n.º de cat: 17-0537-01) o una columna Superose 6 10/300 GL (Pharmacia Biotech, n.º de cat: 17-5172-01). Se hace funcionar la columna en condiciones isocráticas a temperatura ambiente, usando un caudal de aproximadamente 0,4 ml/min. El tampón de fase móvil es un tampón de fosfato de sodio 50 mM con cloruro de sodio 300 mM a pH 6,8. Dependiendo del sistema HPLC usado, se puede realizar el procedimiento con un volumen de aplicación de muestra de 100 µl o 500 µl. Se diluyen las muestras con el tampón de fase móvil hasta una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 mg/ml (carga de 100 µl) o 0,1 mg/ml (carga de 500 µl). Se pueden usar muestras con una concentración de proteína de menos de 0,1 mg/ml sin diluir. Se detectan las proteínas eluidas a una longitud de onda del detector de 220 nm.

RP-HPLC:

Se analiza la pureza por RP-HPLC, que separa la eritropoyetina monoPEGilada de oligoformas y sustancias relacionadas. Se realiza el ensayo en una columna Poroshell usando un gradiente de acetonitrilo/TFA acuoso. Se controla el perfil de elución como absorbancia UV a 220 nm. Se calcula el porcentaje de eritropoyetina monoPEGilada y de sustancias u oligoformas relacionadas en base al área máxima total de las proteínas eluidas.

Ejemplo 1

Purificación de eritropoyetina monoPEGilada

Se puede producir eritropoyetina, por ejemplo, de acuerdo con el documento WO 01/87329, y se puede purificar como se informa en el documento WO 96/135718. Se puede producir eritropoyetina PEGilada, por ejemplo, de acuerdo con el documento WO 03/029291.

a) Primera cromatografía en SP Toyopearl 650 M

Se realiza la primera etapa de cromatografía en una columna de sulfopropilo (SP) rellena con SP Toyopearl® 650M. Se hizo funcionar la columna a TA. Se define la capacidad de carga máxima de la primera columna como 1,5 g de proteína por litro de volumen de columna (VC). Se equilibró la columna con un tampón de fosfato de potasio 100 mM con pH de 2,9 a 3,1 (tampón SP-A). Después de la etapa de carga, se lavó la columna y se eluyó con una serie de tampones de fosfato de potasio que contenían cantidades crecientes de NaCl. Se retiraron ácido carbónico PEGilado libre, es decir, reactivo de PEG hidrolizado y formas poliPEGiladas en el flujo continuo y la etapa de lavado posterior con tampón SP-A y tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 2,9 a 3,1, que contenía cloruro de sodio 90 mM (tampón SP-B), respectivamente. Se eluyó eritropoyetina monoPEGilada aplicando un tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro de sodio 250 mM (tampón SP-C), se recogió en un recipiente y se diluyó directamente 1:5 con agua purificada. Este eluido recogido se denomina "conjunto de eluido SP I". Se lavó posteriormente la columna con tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro de sodio 750 mM (tampón SP-D) para retirar la eritropoyetina sin reaccionar y se regeneró la columna.

b) Segunda cromatografía en SP Toyopearl 650 M

Se hizo funcionar la segunda columna a TA. Después del equilibrio con el tampón SP-A, se aplicó el conjunto de eluido SP I a la columna y después de esto se lavó la columna con tampón SP-A. Se eluyó la eritropoyetina monoPEGilada aplicando un gradiente lineal con una pendiente de cloruro de sodio de desde 50 a 500 mM en diez volúmenes de columna tamponados con tampón de fosfato de potasio 100 mM a pH de 2,9 a 3,1. Se fraccionó el máximo de producto en hasta 8 fracciones individuales y se diluyó directamente cada fracción con hidrogenofosfato de dipotasio 1 M para incrementar el pH a de 6 a 8. Después de completar la elución de eritropoyetina monoPEGilada, se puede incrementar la pendiente del gradiente dando lugar a un lavado de columna inmediato con fosfato de potasio 100 mM, pH de 2,9 a 3,1, que contenía cloruro de sodio 500 mM.

c) Regeneración de las columnas SP Toyopearl 650 M

Se regeneraron las resinas de ambas columnas en una secuencia de siete etapas. Se limpiaron las columnas con agua purificada seguido de una solución de hidróxido de sodio 0,5 M. Se desplazó la solución alcalina con agua purificada seguido de un lavado ácido (dihidrogenofosfato de sodio 0,5 M, ácido fosfórico 1 M). Después de otra etapa de agua purificada, se despirogenaron las columnas con hidróxido de sodio 0,5 M durante ≥ 4 horas. Después de la regeneración cáustica, se lavaron las columnas con agua purificada de nuevo. Se produjo el agua purificada (PW III) por ultrafiltración. La calidad de PW III es equivalente a la del agua para inyectables de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos. Se realizan las pruebas de acuerdo con Ph. Eur. y USP. Durante los desarrollos de control realizados de acuerdo con la primera etapa de cromatografía explicada anteriormente, no se pudo detectar proteína residual ni restos de PEG en los respectivos tampones de flujo continuo. El análisis de SDS-PAGE de la resina después de 60 ciclos no mostró proteína residual ni resto de PEG en el gel. En base a estos datos, se puede excluir un arrastre de lote a lote de proteínas residuales y resto de PEG y, por tanto, la regeneración de la columna es muy eficaz (véase también la figura 1). La determinación del rendimiento obtenido en cada cromatografía no mostró disminución (véase también la figura 2).

Tabla 1: Resumen de parámetros para la regeneración de columnas.

Parámetros de columna			
Etapas	Solución tampón	Volúmenes de columna	Caudal [l/min]
Aclarado	PW III	≥ 2	1,6 - 2,1
Regeneración de columna cáustica I	0,5 mol/l de NaOH	≥ 2	1,6 - 2,1
Aclarado	PW III	≥ 2	1,6 - 2,1
Regeneración de columna ácida	1 mol/l de ácido fosfórico 0,5 mol/l de dihidrogenofosfato de sodio	≥ 3	1,6 - 2,1
Aclarado	PW III	≥ 2	1,6 - 2,1
Regeneración de columna cáustica II	0,5 mol/l de NaOH	≥ 3	n. a.
Aclarado	PW III	≥ 2	1,6 - 2,1

- 5 Como se muestra en las figuras 1 y 2, la pureza y el rendimiento de la eritropoyetina monoPEGilada en el conjunto de tampones de flujo continuo de la primera etapa de cromatografía para todos los ciclos está claramente dentro del intervalo de al menos un 80 % de pureza y al menos un 35 % de rendimiento. Además, no se puede observar ninguna tendencia en la pureza de la eritropoyetina monoPEGilada durante la vida útil de la columna.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Procedimientos cromatográficos
- <130> 24383 WO
- <150> EP 07013960.5
- 10 <151> 17/07/2007
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

25

ES 2 704 013 T3

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

- <210> 2
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125

10 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la regeneración de una columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte después de la elución de compuestos de interés que comprende las siguientes etapas en este orden:
 - eluir polipéptidos adsorbidos de la columna con una solución tamponada acuosa que comprende cloruro de sodio a una concentración de al menos 500 mM,
 - limpiar la columna con agua purificada,
 - aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna,
 - limpiar la columna con agua purificada,
 - aplicar una solución que comprende dihidrogenofosfato de sodio 0,5 M y ácido fosfórico 1 M a la columna,
 - limpiar la columna con agua purificada,
 - aplicar una solución de hidróxido de sodio 0,5 M a la columna durante al menos 4 horas, y
 - regenerar la columna de cromatografía de intercambio catiónico limpiando la columna con agua purificada.

2. Procedimiento para obtener una eritropoyetina por la que un residuo de polietilenglicol se une covalentemente al extremo N de eritropoyetina y/o un residuo de lisina interno que comprende las siguientes etapas:
 - a) unir covalentemente un residuo de polietilenglicol al extremo N de eritropoyetina y/o un residuo de lisina interno de eritropoyetina usando un reactivo activado para unir covalentemente un residuo de polietilenglicol al extremo N de eritropoyetina y/o un residuo de lisina interno de un peso molecular de desde 20 kDa a 40 kDa,
 - b) purificar la eritropoyetina por la que un residuo de polietilenglicol se une covalentemente al extremo N de eritropoyetina y/o un residuo de lisina interno obtenido en la etapa a) con dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte consecutivas, en el que la primera y segunda etapas de cromatografía de intercambio catiónico fuerte emplean el mismo tipo de material de intercambio catiónico fuerte,
 - c) recuperar la eritropoyetina por la que un residuo de polietilenglicol se une covalentemente al extremo N de eritropoyetina y/o un residuo de lisina interno en la segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte en una forma sustancialmente homogénea,
 - d) regenerar la columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicha columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte es una columna de cromatografía de intercambio catiónico de sulfopropilo.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho tampón es ácido fosfórico o sales del mismo, o ácido acético o sales del mismo, o ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 5, caracterizado por que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de desde 20-35 kDa y es lineal.

7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 5, caracterizado por que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular de 40 kDa y está ramificado.

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5 a 7, caracterizado por que dicha primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte se realiza como una elución por etapas y dicha segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico fuerte se realiza como una elución lineal.

9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicha columna de cromatografía de intercambio catiónico fuerte se puede usar al menos para 40 ciclos de separación.

Fig. 1

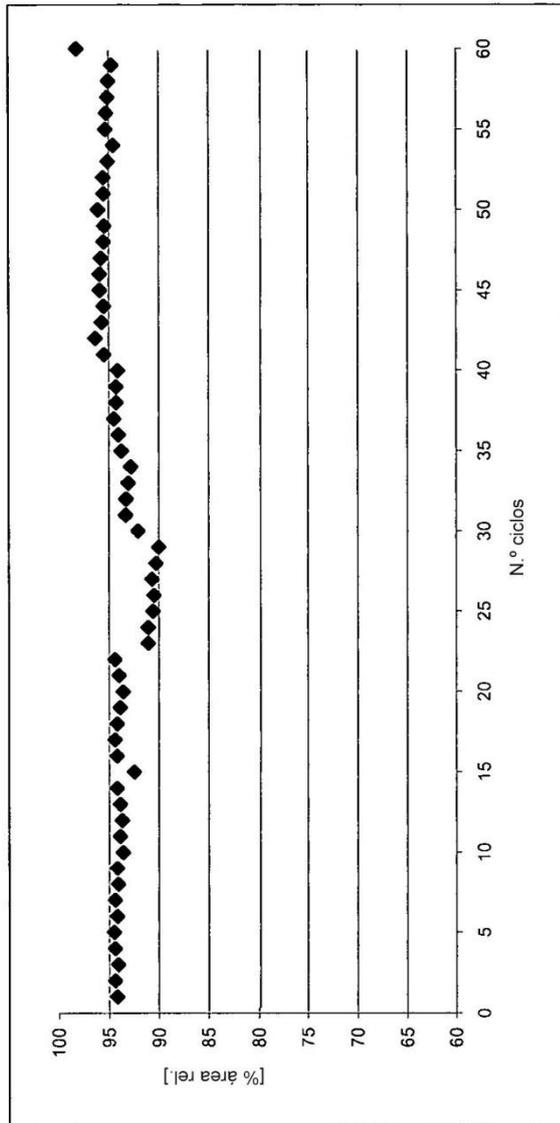


Fig. 2

