

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 381**

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2004 PCT/DK2004/000234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2004 WO04089504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2004 E 04725302 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 1613409**

54 Título: **Regeneración de fases estacionarias cromatográficas**

30 Prioridad:

08.04.2003 DK 200300536
15.04.2003 US 462949 P
26.01.2004 DK 200400098
27.01.2004 US 539875 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

LARSEN, PER;
SCHOU, OLE y
RASMUSSEN, EIGIL, SCHRODER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 746 381 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

Regeneración de fases estacionarias cromatográficas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la purificación cromatográfica. Más específicamente se refiere a un proceso para regenerar fases estacionarias cromatográficas.

10 Antecedentes de la invención

Los polipéptidos se usan cada vez más como medicamentos para el tratamiento de enfermedades dentro de todas las áreas principales de terapia. El tratamiento de la diabetes mediante la administración crónica de insulina se ha practicado durante más de 80 años, y las aplicaciones terapéuticas de polipéptidos dentro de los trastornos del crecimiento y el cáncer también se han practicado durante muchos años.

15 Los procesos económicos para la producción a gran escala de polipéptidos con una pureza suficientemente alta para las aplicaciones terapéuticas son cruciales para que otras terapias basadas en polipéptidos alcancen el mercado masivo y para que las terapias existentes se usen más ampliamente.

20 La purificación de un polipéptido a partir de una mezcla es una etapa que se usa normalmente varias veces durante el proceso de fabricación general de un polipéptido terapéutico. La cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) es el método preferido para la separación industrial de alta resolución de los polipéptidos, y el método ha demostrado ser versátil para la purificación a gran escala de muchos polipéptidos.

25 Dado que los polipéptidos para el uso terapéutico deben ser altamente purificados para no provocar eventos adversos tras la administración al paciente, es bastante común usar varias etapas de purificación cromatográficas en el proceso de fabricación. La fase estacionaria de las columnas cromatográficas en las plantas de fabricación es cara y por lo tanto se usa para varios ciclos cromatográficos. Sin embargo, con el tiempo, el rendimiento de la fase estacionaria cromatográfica disminuye, es decir, la caída de presión sobre la columna aumenta de manera prohibitiva y el factor de separación se afecta. Esto se ha atribuido a la acumulación gradual de depósitos.

30 Se ha sugerido que el problema se supera mediante un proceso de regeneración que comprende tampones alcalinos (J. Chrom. 461, 1989, 45-61), por ejemplo pH 7,4 y alta concentración de modificador orgánico.

35 Brange y otros (J. Pharm. Sci. 86 (1997) 517-525) describen la disolución de fibrillas de insulina en ácido y en base.

Durante muchos años el problema se ha aliviado mediante la regeneración de la fase estacionaria cromatográfica con solución alcalina, por ejemplo hidróxido de sodio 0,1 molar (*vide* Lilledahl, "Twelve years of silica-based HPLC purification with focus on peptides", en Tides 2000, 10 de mayo de 2000 en Las Vegas, EUA). Este proceso de regeneración puede aumentar la vida útil de la sílice usada para purificar la insulina a entre 100 y 600 ciclos. Sin embargo, los materiales de sílice no son estables cuando se exponen a condiciones alcalinas severas, y especialmente los materiales de sílice sustituidos pueden no ser susceptibles a la regeneración mediante soluciones alcalinas. Los procesos económicamente viables para purificar los productos farmacéuticos tales como polipéptidos terapéuticos deben incluir un proceso de regeneración que no degrade la fase estacionaria cromatográfica.

45 Un proceso general y complejo para regenerar materiales particulados (arcilla, arena, sílice, etc.) de una amplia variedad de fuentes se ha descrito en el documento núm. WO 00/61493. Es un proceso de 5 etapas que comprende poner en contacto el material con a) un extractor de material orgánico, b) un agente oxidante, seguido por c) una solución ácida, d) calentar el material y e) recuperar el material. El proceso es engorroso y no susceptible a la implementación en una planta de purificación cromatográfica. El proceso no puede regenerar geles de sílice sustituidos debido a la combustión a alta temperatura de los compuestos orgánicos.

50 SANDERS G Y OTROS: "Psychological stress of exposure to uncontrollable noise increases plasma oxytocin in high emotionality women" PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY, OXFORD, GB, vol. 15, núm. 11 de enero de 1990 (1990-01-01), páginas 47-58, XP024386518, ISSN: 0306-4530, DOI: 10.1016/0306-4530(90)90046-C describe la regeneración de columnas que contienen fase estacionaria cromatográfica de sílice sustituida con soluciones de ácido fórmico.

60 Existe una necesidad en la técnica de maneras más eficientes de regenerar las fases estacionarias cromatográficas para aumentar la vida útil de estas materias primas costosas y evitar que la caída de presión sobre las columnas cromatográficas aumente. Especialmente, se necesitan procesos de regeneración que sean adecuados para la regeneración in situ de las fases estacionarias cromatográficas en las plantas de fabricación.

Breve descripción de la invención

65

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 70 °C con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 75 % p/p de agua, en donde dicho ácido orgánico es ácido fórmico, en donde la concentración de dicho ácido orgánico es al menos 25 % p/p.

En una modalidad, el presente proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida comprende poner en contacto dicha fase estacionaria cromatográfica con dicha solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 1 % p/p de agua.

En una modalidad la solución de regeneración contiene menos de 0,5 % de agua, preferentemente menos de 0,1 % de agua, con mayor preferencia menos de 0,02 % de agua y con la máxima preferencia menos de 0,001 % de agua.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica en donde dicha solución de regeneración comprende al menos un ácido orgánico, un solvente orgánico y menos que 1 % p/p de agua. En una modalidad de la invención el solvente orgánico es etanol. En otra modalidad de la invención el solvente orgánico es 2-propanol. En otra modalidad de la invención el solvente orgánico es acetonitrilo. En otra modalidad de la invención el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en metanol, 1-propanol y hexilenglicol.

En otra modalidad la solución de regeneración contiene menos de 0,5 % de agua, preferentemente menos de 0,1 % de agua, con mayor preferencia menos de 0,02 % de agua y con la máxima preferencia menos de 0,001 % de agua.

Breve descripción de los dibujos

La invención se ilustra además en los dibujos adjuntos en los cuales:

La Figura 1 muestra el principio confocal.

La Figura 2 muestra la imagen 2D de Source 30Q con fibrillas de insulina teñidas con Tioflavina T.

La Figura 3 muestra el principio de medir el área de fibrillas en Source 30Q. El área de coloreado claro muestra la luz verde que proviene de las fibrillas de insulina en las partículas de Source 30Q.

La Figura 4A-B muestra cromatogramas preparativos de la purificación cromatográfica III (Figura 4A, figura superior, antes de la regeneración con ácido fórmico, y la Figura 4B (figura inferior) después de la regeneración con ácido fórmico).

Definiciones

La siguiente es una definición detallada de los términos usados en la descripción.

La expresión "fase estacionaria cromatográfica", como se usa en la presente descripción, significa la fase sólida sobre la cual pasa la fase soluble, es decir, la matriz cromatográfica. La fase estacionaria cromatográfica se coloca normalmente dentro de una columna cromatográfica. Los ejemplos de fases estacionarias cromatográficas son sílice sustituida, tal como sílice C-4, sílice C-12 y sílice C-18, así como también los materiales poliméricos tales como poliestireno, Source 30Q y Sepharose. Los ejemplos adicionales de fases estacionarias cromatográficas son membranas, materiales monolíticos y filtros.

El término "eluyente cromatográfico" como se usa en la presente descripción significa la solución que se usa para la etapa de elución donde el polipéptido que se purifica se libera normalmente de la fase estacionaria cromatográfica hacia el eluyente. En el modo normal de cromatografía un ciclo completo comprende

- a) equilibración con un tampón de equilibrio para llevar la columna a un estado donde está lista para un ciclo,
- b) aplicación de la muestra que contiene el producto,
- c) una etapa de lavado opcional donde se lava la fase estacionaria cromatográfica con el producto unido,
- d) elución donde la afinidad del producto hacia la fase estacionaria cromatográfica disminuye y el producto abandona la columna en el eluato de la columna cromatográfica, y
- e) una regeneración opcional donde se intenta separar la fase estacionaria cromatográfica de las impurezas restantes mediante el uso de una solución de regeneración.

El término “tampón de equilibrio” como se usa en la presente descripción significa la solución que se usa para la etapa de equilibrio en donde la columna cromatográfica se prepara para un ciclo cromatográfico.

5 El término “solución de regeneración” como se usa en la presente descripción significa una solución que se usa para regenerar una fase estacionaria cromatográfica. El propósito de la regeneración es mantener un rendimiento satisfactorio de la separación cromatográfica en varios ciclos cromatográficos. Típicamente, los parámetros relacionados con el rendimiento crítico son la caída de presión en la columna cromatográfica y el factor de separación. Una etapa de regeneración puede comprender poner en contacto la fase estacionaria cromatográfica con una solución de regeneración única o con más de una solución de regeneración. En este último caso, cada una de las soluciones de regeneración así como también las mezclas resultantes de estas se abarcan por el término “solución de regeneración”.

15 El término “mezcla”, tal como se usa en la presente descripción, significa una composición de materia que comprende al menos dos ingredientes. Un eluato de la columna cromatográfica es una mezcla que comprende las sustancias químicas en el eluyente junto con el producto que se ha separado de la columna. Otro ejemplo de una mezcla es una solución de una sustancia química en un solvente, por ejemplo, solución salina. Aún otro ejemplo de una mezcla es agua y un solvente orgánico miscible en agua. Aún otro ejemplo de una mezcla es una solución o suspensión de un polipéptido en un solvente tal como agua o un solvente orgánico.

20 El término “aislar un polipéptido” como se usa en la presente descripción significa traer el polipéptido a un estado donde es de mayor concentración o mayor pureza que lo que estaba antes de aislarlo, es decir, en el material de partida. Por lo tanto, un ejemplo de aislar un polipéptido es precipitar o cristalizar el polipéptido a partir de una solución y separar el precipitado o cristales del licor madre.

25 El término “solvente orgánico” como se usa en la presente descripción significa un solvente que comprende al menos un átomo de carbono y que está en el estado fluido a lo largo del intervalo de temperaturas de 0 °C a 50 °C. Los ejemplos no limitantes de solventes orgánicos son alcoholes inferiores tales como metanol y etanol, alcoholes polihídricos, acetonitrilo, hexano y acetona.

30 El término “solvente orgánico miscible en agua” como se usa en la presente descripción significa un solvente orgánico que tiene una solubilidad en agua a 20 °C de al menos 1 g/L. Los ejemplos no limitantes de solventes orgánicos miscibles en agua son etanol, 1-propanol, 2-propanol, acetonitrilo y hexilenglicol.

35 El término “ácido orgánico” como se usa en la presente descripción significa un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo funcional con una constante de disociación, pK_a , de menos de 5,0. Los ejemplos de ácidos orgánicos son ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, etc.

40 El término “alcohol inferior” como se usa en la presente descripción significa un C_{1-6} -alcohol que se caracteriza por tener entre 1 y 6 átomos de carbono y un resto hidroxilo. El esqueleto de carbono en el alcohol inferior puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos no limitantes de alcoholes inferiores son etanol, n-propanol, isopropanol y t-butanol.

45 El término “alcohol polihídrico” como se usa en la presente descripción significa un alcohol que tiene al menos dos restos hidroxilo. Los ejemplos no limitantes de alcoholes polihídricos son hexilenglicol (4-metil-2,4-pentanodiol) y alcohol neopentílico (2,2-dimetil-1,3-propanodiol).

El término “excipiente” como se usa en la presente descripción significa compuestos que se añaden a las composiciones farmacéuticas para estabilizar y preservar la composición. Los excipientes típicos son tampones, conservantes y modificadores de tonicidad.

50 El término “composición farmacéutica” como se usa en la presente descripción significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal de este junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante y modificador de tonicidad, dicha composición farmacéutica es útil para tratar una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, una composición farmacéutica se conoce también en la técnica como una formulación farmacéutica.

55 El término “tampón” como se usa en la presente descripción significa un compuesto químico que se usa en una solución para reducir la tendencia del pH de la solución a cambiar con el tiempo como ocurriría de otra manera debido a las reacciones químicas. Los tampones incluyen sustancias químicas tales como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

60 El término “modificador de tonicidad” como se usa en la presente descripción significa un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica de manera que la presión osmótica se acerque a la del plasma humano. Los modificadores de tonicidad incluyen NaCl, glicerol, D-manitol etc.

65 El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente descripción significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, no provoca eventos adversos en pacientes, etc.

El término "insulina humana" como se usa en la presente descripción significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son bien conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas que se conectan por puentes de disulfuro entre residuos de cisteína, a saber la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas se conectan mediante tres puentes disulfuro : uno entre las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A, el segundo entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el tercero entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.

El término "polipéptido" como se usa en la presente descripción significan un compuesto formado por al menos diez aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético, así como también aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético son, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados mediante síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), y β -alanina.

El término "polipéptido terapéutico" como se usa en la presente descripción significa un polipéptido para el cual existe una utilidad potencial reconocida como un agente terapéutico. Los polipéptidos terapéuticos típicamente están altamente purificados y se someten a estudios clínicos como parte del proceso de aprobación regulatoria. Los ejemplos de polipéptidos terapéuticos son la insulina humana, la trombopoyetina, la eritropoyetina y la hormona del crecimiento humano.

El término "producto polipeptídico" como se usa en la presente descripción significa una composición que comprende el polipéptido. Los ejemplos de productos polipeptídicos son polipéptido cristalizado, polipéptido precipitado, y una solución del polipéptido.

El término "análogo", como se usa en la presente descripción en relación con un polipéptido parental, significa un polipéptido modificado en donde uno o más residuos de aminoácidos del polipéptido parental se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado del polipéptido parental y/o en donde se han añadido uno o más residuos de aminoácidos al polipéptido. Dicha adición o delección de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del polipéptido o en el C-terminal del polipéptido o dentro del polipéptido. Un ejemplo de un análogo es Arg³⁴-GLP-1(7-37) que es un polipéptido GLP-1(7-37) en donde la Lys en la posición 34 se han sustituido con una Arg. Otros ejemplos son la insulina porcina o bovina que son análogos de la insulina humana.

El término "precursor" como se usa en la presente descripción en relación con un polipéptido significa una versión modificada del polipéptido que se produce. Los precursores de un polipéptido son típicamente versiones extendidas con aminoácidos del polipéptido, o versiones truncadas del polipéptido. Estos precursores pueden servir para mejorar la expresión celular, comprender etiquetas de afinidad para la purificación, proteger determinados grupos reactivos del polipéptido que se produce, etc.

El término "derivado", como se usa en la presente descripción en relación con un polipéptido parental, significa un polipéptido parental modificado químicamente o un análogo de este, en donde al menos un sustituyente no está presente en el polipéptido parental o en un análogo de este, es decir, un polipéptido parental que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Los ejemplos de derivados de la insulina humana son el éster^{B30} treonina metilo insulina humana y N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana.

El término "sustituyente lipofílico" como se usa en la presente descripción significa un sustituyente que comprende de 4-40 átomos de carbono y que tiene una solubilidad en agua a 20°C en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/100 ml de agua a aproximadamente 250 mg/100 ml de agua, tal como en el intervalo de aproximadamente 0,3 mg/100 ml de agua a aproximadamente 75 mg/100 ml de agua. Por ejemplo, el ácido octanoico (C8) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 68 mg/100 ml, el ácido decanoico (C10) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 15 mg/100 ml, y el ácido octadecanoico (C18) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 0,3 mg/100 ml.

El término "sistema de tuberías y control" como se usa en la presente descripción significa los medios físicos (tuberías y válvulas de control) y el software que controla las tuberías y válvulas de un equipo del proceso.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 70 °C con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 75 % p/p de agua, en donde dicho ácido orgánico es ácido fórmico, en donde la concentración de dicho ácido orgánico es al menos 25 % p/p.

La presente invención también se refiere a un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 1% p/p de agua.

5 La presente invención también se refiere a un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con una solución de regeneración que tiene una concentración de ácido orgánico que es al menos 25 % p/p.

10 Puede usarse varios ácidos orgánicos en la solución de regeneración del proceso. Otro ácido orgánico para la solución de regeneración es ácido acético, por ejemplo ácido fórmico y ácido acético.

15 La solución de regeneración puede comprender además un solvente orgánico. Preferentemente, el solvente orgánico también se usa en el tampón de equilibrio o eluyente cromatográfico. En una modalidad de la invención el solvente orgánico es etanol. En otra modalidad el solvente orgánico es 2-propanol. En otra modalidad el solvente orgánico es acetonitrilo. En otra modalidad el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en metanol, 1-propanol y hexilenglicol.

20 En otra modalidad, el ácido orgánico es ácido fórmico y el solvente orgánico es etanol. En otra modalidad, el ácido orgánico es ácido fórmico y el solvente orgánico es acetonitrilo. En aún otra modalidad, el ácido orgánico es ácido fórmico y el solvente orgánico es 2-propanol. En aún otra modalidad, el ácido orgánico es ácido fórmico y el solvente orgánico es hexilenglicol.

25 En otra modalidad, la presente invención se refiere a un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 0,5 % de agua, preferentemente menos que 0,1 % de agua, con mayor preferencia menos que 0,02 % de agua y con la máxima preferencia menos que 0,001 % de agua.

30 La fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto preferentemente con la solución de regeneración dentro de la columna cromatográfica. De esta manera se pierde un mínimo de capacidad de producción debido al tiempo de inactividad en relación con la etapa de regeneración. Por lo tanto, el proceso de regeneración de la fase estacionaria cromatográfica puede llevarse a cabo sin volver a empaquetar la columna. En una modalidad, la fase estacionaria cromatográfica se fluidica durante dicha regeneración. En otra modalidad el eluyente cromatográfico o el tampón de equilibrio se desplaza por un disolvente orgánico miscible en agua antes de que dicha fase estacionaria se ponga en contacto con dicha solución de regeneración. Preferentemente dicho solvente orgánico miscible en agua también está presente en el eluyente cromatográfico o el tampón de equilibrio. Preferentemente dicho solvente orgánico miscible en agua también está presente en la solución de regeneración.

40 En otra modalidad la fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración fuera de la columna cromatográfica. Este procedimiento es más engorroso que llevar a cabo el proceso de regeneración dentro de la columna, pero puede ser útil, sin embargo, si el material precipitado queda atrapado entre las partículas de la fase estacionaria cromatográfica. En este último caso, el material precipitado puede eliminarse de la fase estacionaria cromatográfica sin disolver dicho material.

45 En una modalidad, la fase estacionaria cromatográfica es una matriz de RP-HPLC. La fase estacionaria cromatográfica para RP-HPLC son materiales mecánicamente muy rígidos que son la sílice sustituida tales como C4, C6, C8, C10, C12, C16, C18, C30 o sílice de fenilo. La fase estacionaria cromatográfica puede estar presente además en las columnas como barras monolíticas con macroporos y mesoporos.

50 El material de sílice adecuado para su uso como fase estacionaria cromatográfica es partículas esféricas con una distribución de tamaño de poro estrecha y tamaños de partícula en el intervalo de 3 μm a 100 μm , tal como de 5 μm a 100 μm , tal como de 8 μm a 30 μm , tal como 10 μm , 13 μm , 15 μm , 16 μm , 18 μm y 20 μm . Típicamente, se usan tamaños de poro en el intervalo de 60 Å a 300 Å, tales como 100 Å, 120 Å, 150 Å, 175 Å, 200 Å o 300 Å. Para los materiales poliméricos estables a la presión, el tamaño de los poros puede ser de 10 Å o incluso mayor, por ejemplo 50 Å, 100 Å, 400 Å, 600 Å, 1000 Å o 3000 Å. La columna cromatográfica se empaca con la fase estacionaria y después de la prueba apropiada de la calidad del empaque, la columna se equilibra con el tampón usado en el modo de unión. Las columnas cromatográficas a escala de producción tienen típicamente diámetros de 15 a 100 cm, y tales sistemas pueden tener compresión axial dinámica. Para la producción de polipéptidos de volumen pequeño las columnas de producción pueden tener un diámetro de, por ejemplo, 15 cm, 20 cm o 25 cm. Para la producción de polipéptidos de volumen grande las columnas de producción pueden tener un diámetro de, por ejemplo, 40 cm, 60 cm, 80 cm o mayor.

60 En otra modalidad de la invención, la fase estacionaria cromatográfica que se regenera es una membrana, materiales monolíticos, filtros o similares.

65 En una modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración durante al menos 1 segundo, preferentemente

durante al menos 1 minuto, con mayor preferencia durante al menos 5 minutos, tal como de 1 minuto a 24 horas, de 1 minuto a 5 horas, de 1 minuto a 2 horas, de 10 minutos a 60 minutos.

5 En otra modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración hasta que la caída de presión en la longitud de la columna cromatográfica a una velocidad de flujo normal disminuye en al menos 10 %, preferentemente al menos 25 %, incluso con mayor preferencia al menos 50 %.

10 En otra modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, el contacto de dicha fase estacionaria cromatográfica con la solución de regeneración se realiza a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 70 °C, de 5 °C a 50 °C, tal como de 10 °C a 40 °C, tal como de 15 °C a 30 °C, o de 18 °C a 25 °C.

15 En otra modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, el tiempo de vida de dicha fase estacionaria cromatográfica es al menos 500 ciclos cromatográficos, preferentemente al menos 700 ciclos cromatográficos, con mayor preferencia al menos 1000 ciclos cromatográficos, con la máxima preferencia al menos 2000 ciclos cromatográficos.

20 En otra modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, dicho proceso se aplica a dicha fase estacionaria cromatográfica por cada ciclo cromatográfico, al menos una vez cada 2 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 5 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 20 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 50 ciclos cromatográficos, o al menos una vez cada 100 ciclos cromatográficos.

25 En otra modalidad de la invención, el número de procesos de regeneración realizados a una fase estacionaria cromatográfica es al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 400 o al menos 1000.

En otra modalidad del proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica, dicho proceso se aplica a dicha fase estacionaria cromatográfica siempre que la caída de presión en la longitud de la columna cromatográfica exceda un valor umbral.

30 El proceso de la presente invención es útil para la producción de un polipéptido terapéutico o un precursor de este, en donde la fase estacionaria cromatográfica se regenera mediante un proceso de regeneración como se describió anteriormente. El proceso de la presente invención es útil para la producción de un polipéptido terapéutico o un precursor de este, dicho polipéptido terapéutico es un derivado que comprende un sustituyente lipofílico. El proceso es útil además para la producción de un polipéptido terapéutico o un precursor de este, dicho polipéptido terapéutico es un derivado que comprende un sustituyente lipofílico unido al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina. El proceso es útil para la producción de un polipéptido terapéutico o un precursor de este, dicho polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en glucagón, péptido similar al glucagón 1, péptido similar al glucagón 2, exendina-4, péptidos TFF, insulina humana, análogos de estos y derivados de estos. En otro ejemplo dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en Lys²⁶(N ^{ϵ} -(γ -Glu(N ^{α} -hexadecanoil))-GLP-1(7-37), Arg³⁴-GLP-1(7-37), exendina-4, Lys¹⁷Arg³⁰-GLP-2(1-33), Arg³⁰Lys¹⁷N ^{ϵ} (β -Ala(N ^{α} -hexadecanoil)) GLP-2(1-33) y Gly²-GLP-2(1-33). En otro ejemplo dicho polipéptido es exendina-4. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende albúmina de suero humano o un fragmento de esta. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre GLP-1(7-37) o un análogo de este y un fragmento de la albúmina de suero humano o un análogo de esta. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre exendina-4(1-39) o un análogo de este y un fragmento de la albúmina de suero humano o un análogo de esta. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende la porción Fc de una inmunoglobulina o un fragmento de esta. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre GLP-1(7-37) o un análogo de este y un fragmento de la porción Fc de una inmunoglobulina o un análogo de esta. En otro ejemplo dicho polipéptido es un polipéptido de fusión entre exendina-4(1-39) o un análogo de este y un fragmento de la porción Fc de una inmunoglobulina o un análogo de esta.

50 En otro ejemplo dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en insulina humana, un precursor de insulina humana, un análogo de insulina humana, un precursor del análogo de insulina humana, un análogo GLP-1(7-37), un análogo de exendina-4(1-39), y sus derivados. En otro ejemplo dicho polipéptido se selecciona de un derivado de la insulina humana que comprende al menos un resto metoxi o etoxi. En otro ejemplo dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en

treonina metil éster^{B30} insulina humana,

treonina etil éster^{B30} insulina humana,

60 Asp^{G28} insulina humana,

treonina metil éster^{B30} Asp^{B28} insulina humana,

65 treonina etil éster^{B30} Asp^{B28} insulina humana,

Lys^{G28} Pro^{G29} insulina humana,

Met^{B-1}Arg^{B0}Lys^{G28} Pro^{G29} proinsulina humana,

5 Lys^{B3} Glu^{G29} insulina humana,

Gly^{A21} Arg^{B31} Arg^{B32} insulina humana,

des(B30) insulina humana,

10 N^{εB29}-tetradecanoil des(B30) insulina humana,

N^{εB29}-litocoloilo-γ-glutamil des(B30) insulina humana,

15 N^{εB29}-octanoil des(B30) insulina humana, y

N^{εB29}-octanoil insulina humana.

20 Aún en otro ejemplo dicho polipéptido se selecciona de albúmina de suero humano, eritropoyetina, TNF-α, una interleucina, IGF-1, IGF-2, hormona de crecimiento humano, somatostatina, amilina humana y análogos de estos.

Los polipéptidos que se purifican en fases estacionarias cromatográficas regeneradas mediante los procesos de la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica de producción de polipéptidos. Los polipéptidos mayores que 3000 Dalton se producen usualmente mediante fermentación o cultivo celular, mientras que polipéptidos más pequeños pueden producirse mediante síntesis química de péptidos. Otros factores importantes que determinan el método de producción óptimo también son la cantidad de polipéptido a producir y la estructura del polipéptido, por ejemplo, enlaces disulfuro y otras modificaciones. Los polipéptidos derivados de la fermentación o del cultivo celular se producen comúnmente mediante el cultivo de células huésped recombinantes, por ejemplo, bacterias, hongos, células de mamíferos, células de insectos o células vegetales en medios de cultivo adecuados. El medio de cultivo puede ser un medio más o menos definido químicamente que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y la formación de producto de las células huésped, por ejemplo, azúcar, fuente de nitrógeno, sales, vitaminas y otros factores de crecimiento. Una vez que los microorganismos o las células se han cultivado en el medio y se han lisado opcionalmente, el medio de cultivo contiene el producto deseado en una mezcla con componentes remanentes del medio, impurezas derivadas de la célula huésped e impurezas relacionadas con el producto. Las impurezas derivadas de la célula huésped son principalmente polipéptidos, ácidos nucleicos y restos celulares. El producto se separa de estas impurezas no relacionadas en las etapas de recuperación o purificación temprana. En las etapas finales de purificación (pulido) donde las impurezas estrechamente relacionadas con el polipéptido producto se separan del polipéptido producto, las etapas cromatográficas se usan ampliamente.

40 La síntesis de polipéptidos también puede realizarse mediante síntesis en fase sólida mediante química de tipo Merrifield, mediante métodos en fase de solución o mediante métodos semisintéticos conocidos en la técnica.

Pueden realizarse una o más etapas de conversión química en medio de las etapas de recuperación y final de la purificación. Tales modificaciones químicas pueden ser mediante la hidrólisis de un polipéptido precursor en donde la extensión de aminoácidos en el polipéptido se escinde del polipéptido. Tales extensiones de aminoácidos pueden usarse para aumentar la expresión de la célula huésped en el caso de polipéptidos derivados de cultivo, o puede usarse para purificar específicamente el polipéptido, tal como mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo, purificación IMAC de polipéptidos etiquetados con histidina. La conversión química puede ser además la modificación química para producir un polipéptido que es un derivado, por ejemplo por acilación, PEGilación o esterificación. Tales modificaciones químicas se conocen bien en la técnica (ver por ejemplo, los documentos núms. WO 98/08871, WO 99/43706, US 5,424,286, WO 00/09666, WO 00/66629, WO 01/04156 y WO 02/90388).

55 El proceso de la presente invención también es útil para regenerar una fase estacionaria cromatográfica para disminuir la caída de presión en la longitud de la columna cromatográfica.

El proceso de la presente invención también es útil para regenerar una fase estacionaria cromatográfica para la fabricación de un polipéptido terapéutico.

EJEMPLOS

60 Se usan los siguientes acrónimos para sustancias químicas y materiales disponibles comercialmente:

HCOOH : Ácido fórmico

65 EtOH : Etanol

AcOH : Ácido acético

ODDMS : Partículas de sílice sustituida de octadecildimetilo (sílice ODDMS)

5 El ácido fórmico usado para los ejemplos 1-7, 12-43, 53, 54, 70-71, 73-74 y 76 tiene una pureza especificada de 98-100 % (de acuerdo con el fabricante), y el ácido fórmico usado para el ejemplo 72 tiene una pureza de 99,9 %.

La abreviatura CV significa Volúmenes de Columna como se conoce en el campo de la cromatografía.

10 Ejemplos 1-68 (ejemplos 8-11, 44-52, 55-68 no de acuerdo con la invención).

La totalidad de la configuración de los experimentos del ejemplo 1-68 fue la siguiente:

1) Determinación de la contrapresión y altura del valle de una columna sin problemas de presión (una nueva columna sin usar).

2) Introducción de presión y problemas de rendimiento.

3) Determinación de la contrapresión y altura del valle de una columna con problemas de presión.

4) Regeneración de la columna.

5) Determinación de la contrapresión y altura del valle de una columna después de la regeneración.

25 Determinación de la contrapresión y altura del valle :

Se usó el mismo tipo de gel de sílice para todos los experimentos mencionados en esta sección. El gel de sílice es un gel de sílice ODDMS 200 Å, 15 µm. Principalmente, se usó el mismo lote de gel (lote núm. 205144) (todas las columnas comenzaron con 874-).

30 El gel de sílice se empaquetó en columnas de acero de 10 mm x 250 mm y se probó en una prueba de funcionalidad mediante el uso de insulina DesB30 como sustancia de prueba y se eluyó con mezclas de agua-etanol que contienen sales de cloruro de calcio y cloruro de potasio (véase la tabla 1). La contrapresión bajo elución y la altura del valle entre la insulina DesB30 y la impureza más cercana (frente al pico de insulina) se usaron como los parámetros de prueba para cuán bien la columna había recuperado su rendimiento.

40 El tiempo de elución de la insulina DesB30 puede someterse a cierta variación experimental debido a pequeñas variaciones en la temperatura y otros parámetros experimentales. Cuando el tiempo de elución de la insulina DesB30 es el mismo en experimentos diferentes la altura del valle es una comparación perfecta del rendimiento de separación de las columnas. Cuando el tiempo de elución de la insulina DesB30 varía entre experimentos la altura del valle es una medida menos buena del rendimiento de separación de las columnas. Todo lo demás igual, cuanto más tiempo sea el tiempo de retención menor será la altura del valle.

Tabla 1. Soluciones usadas en la prueba de funcionalidad.

Entrada	Tampón	Tipo	Contenido (p/p)
A11	1	Tampón de equilibrio	etanol al 20 %
A12	2	Tampón de elución A	etanol al 25 %, KCl al 1,5 %, CaCl ₂ al 0,4 % y trietanol amina al 0,15 % (pH 7,4 con HCl)
B1	3	Tampón de elución B	etanol al 35 %, KCl al 1,5 %, CaCl ₂ al 0,4 % y trietanol amina al 0,15 % (pH 7,4 con HCl)
A13	4	Tampón de regeneración	etanol al 70 % y ácido acético al 6,9 %
A18	Aplicación	Insulina DesB30	Solución de Na ₂ EDTA, pH 7,5, etanol

55 La prueba de funcionalidad se realizó a 23 ± 2 °C en un Äktaexplorer 100A con Unicorn 4.0 como el software de control y que ejecuta el siguiente ciclo de la columna (véase la tabla 2) :

Tabla 2. Ciclo de columna en la prueba de funcionalidad (CV es volúmenes de columna).

Acción	CV (num.)	Volumen (ml)
Equilibrio	3	58,9
Carga	0,8	15
Lavado 1	1	19,6
Elución	10	196,3

Lavado 2	0,5	9,8
Enjuague	2	39,3

5 Se probó una columna empacada con gel de sílice (lote 205144) y la contrapresión se midió a $3,4 \pm 0,1$ MPa. De manera similar, la contrapresión se determinó para otras columnas antes de introducir problemas de presión. Los experimentos muestran que si estos valores se recuperan después del tratamiento, la columna ha recuperado su rendimiento.

10 La altura del valle también se determinó para las columnas individuales antes y después de la introducción de problemas de presión y rendimiento, y después de la regeneración de la columna.

Introducción de problemas de presión y rendimiento :

15 Los problemas de presión y rendimiento se introdujeron en 1 de 3 maneras:

1) La columna se usó en la prueba de funcionalidad pero se retiró del sistema después de la carga y se colocó a 70 °C durante 1-16 horas. Posteriormente, la contrapresión y la altura del valle se midieron al realizar el resto de la prueba de funcionalidad.

20 2) El gel de sílice ODDMS (25 g) se agitó en un vaso de precipitado con insulina DesB30 (0,14 g), tampón Tris 0,1 M (22 ml) y etanol (15 ml) a 50 °C durante 1 hora. Posteriormente, el gel se decantó y se empacó en una columna de acero (10 mm x 250 mm). La contrapresión y altura de valle se midieron al realizar la prueba de funcionalidad.

25 Este método también puede realizarse a temperaturas más bajas pero eso exige tiempos de reacción más largos.

3) Una combinación de 1) y 2). En primer lugar, el gel se trató como en 2) pero después del empaque, la columna se trató como en 1).

30 Los métodos usados para las columnas individuales se enumeran en la Tabla 4 a continuación.

Regeneración de la columna (por ejemplo, eliminación de los problemas de presión y rendimiento):

35 La regeneración de la columna también se realizó en el *Åktaexplorer* 100A. El ciclo de la columna para este proceso puede verse en la Tabla 3 a continuación. Después de la regeneración, la columna se probó nuevamente en la prueba de funcionalidad y se determinó la contrapresión.

Tabla 3. Ciclo de la columna bajo regeneración.

Acción	Solvente	CV (num.)	Volumen (ml)
Lavado 1	EtOH	3	58,9
Regeneración	Ver la tabla 4 y 5	2	39,3
Dejar reposar	-	0	30 minutos
Regeneración	Ver la tabla 4 y 5	2	39,3
Lavado 2	EtOH	3	58,9

50 Los diferentes solventes se probaron a 22 °C y 40 °C (todo el sistema de HPLC se colocó en un refrigerador a la temperatura elegida ± 1 °C). Las condiciones específicas para las columnas individuales se muestran en la Tabla 4 y los resultados de las pruebas de funcionalidad se muestran en la Tabla 5.

Condiciones experimentales específicas para las columnas individuales :

Tabla 4. Condiciones experimentales para las columnas individuales (ejemplos 8-11, 44-52, 55-68 no de acuerdo con la invención).

Ejemplo núm.	Columna núm.	Introducción de problemas mediante el método núm.	Solvente de regeneración	Temperatura (°C)
1	204377/1	1	HCOOH	22
2	874-32/1	2	HCOOH	22
3	874-32/2	3	HCOOH	22
4	874-32/7	2	HCOOH	22
5	874-33/9	2	HCOOH	22
6	874-33/6	3	HCOOH	22
7	874-24/22	2	HCOOH	40

ES 2 746 381 T3

	8	874-24/10	3	AcOH	22
	9	874-24/15	2	AcOH	22
	10	874-24/23	2	AcOH	40
5	11	874-31/1	2	AcOH	40
	12	203635/5	1	HCOOH/AcOH 99:1	22
	13	874-24/6	3	HCOOH/AcOH 99:1	22
	14	205019/1	1	HCOOH/AcOH 99:1	40
	15	204770/1	1	HCOOH/AcOH 3:1	22
10	16	874-24/26	2	HCOOH/AcOH 3:1	40
	17	204888/1	1	HCOOH/AcOH 1:1	22
	18	874-24/27	2	HCOOH/AcOH 1:1	40
	19	204923/1	1	HCOOH/AcOH 1:3	22
	20	874-24/28	2	HCOOH/AcOH 1:3	40
15	21	203251/3	1	HCOOH/EtOH 99:1	22
	22	874-24/4	2	HCOOH/EtOH 99:1	22
	23	204815/1	1	HCOOH/EtOH 99:1	40
	24	204815/1	1	HCOOH/EtOH 3:1	22
20	25	204888/1	1	HCOOH/EtOH 3:1	40
	26	874-24/5	3	HCOOH/EtOH 1:1	22
	27	874-24/16	2	HCOOH/EtOH 1:1	22
	28	204923/1	1	HCOOH/EtOH 1:1	40
	29	204550/1	1	HCOOH/EtOH 1:3	22
25	30	874-24/17	2	HCOOH/EtOH 1:3	22
	31	204770/1	1	HCOOH/EtOH 1:3	40
	32	203635/5	1	HCOOH/agua 99:1	22
	33	874-24/24	2	HCOOH/agua 99:1	40
30	34	204377/1	1	HCOOH/agua 95:5	22
	35	874-24/29	2	HCOOH/agua 95:5	40
	36	202985/2	1	HCOOH/agua 4:1	22
	37	874-24/30	2	HCOOH/agua 4:1	40
	38	204550/1	1	HCOOH/agua 1:1	22
35	39	874-24/31	2	HCOOH/agua 1:1	40
	40	874-33/5	3	HCOOH/agua 1:1	40
	41	874-24/7	3	HCOOH/agua 1:3	22
	42	874-24/18	2	HCOOH/agua 1:3	22
	43	204770/1	1	HCOOH/agua 1:3	40
40	44	874-24/8	3	AcOH/agua 99:1	22
	45	874-24/19	2	AcOH/agua 99:1	40
	46	874-24/11	3	AcOH/agua 3:1	22
	47	874-24/20	2	AcOH/agua 3:1	40
45	48	874-31/2	2	AcOH/agua 3:1	40
	49	874-33/4	3	AcOH/agua 3:1	40
	50	874-24/12	3	AcOH/agua 1:1	22
	51	874-24/25	2	AcOH/agua 1:1	40
	52	874-31/3	2	AcOH/agua 1:1	40
50	53	874-24/13	3	HCOOH/fenol/agua 1:1:1	22
	54	874-24/21	2	HCOOH/fenol/agua 1:1:1	22
	55	874-32/3	2	1500 ppm de Na-hipoclorito	22
55	56	874-33/11	3	1500 ppm de Na-hipoclorito	22
	57	874-33/14	2	1500 ppm de Na-hipoclorito	22
	58	874-32/4	2	Ácido Perfórmico	22
	59	874-33/13	3	Ácido Perfórmico	22
60	60	874-33/18	2	Ácido Perfórmico	22
	61	874-32/5	2	formaldehído 1,5 M	22
	62	874-33/12	3	formaldehído 1,5 M	22
	63	874-33/15	2	formaldehído 1,5 M	22
65	64	874-32/6	2	clorhidrato de guanidina 6 M	22

65	874-33/10	3	clorhidrato de guanidina 6 M	22
66	874-33/17	2	clorhidrato de guanidina 6 M	22
67	874-33/19	2	EtOH (60 % p/p)/NaOH 0,1 M	22
68	874-33/20	3	EtOH (60 % p/p)/NaOH 0,1 M	22

Resultados de la prueba de funcionalidad para las columnas individuales:

Tabla 5. Resultados de la contrapresión y altura del valle de las pruebas de funcionalidad realizadas antes y después de la introducción de los problemas y después de la regeneración de las columnas de acuerdo con las condiciones enumeradas en la Tabla 4.

RT es el tiempo de retención para la insulina DesB30 y la altura del valle (HV) es para la insulina DesB30 y la impureza más cercana.									
Ejemplo núm.	Contrapresión (MPa)			Rendimiento					
	Antes de los problemas	Después de los problemas	Después de la regeneración	Antes de los problemas		Después de los problemas		Después de la regeneración	
				RT ml	HV mAU	RT ml	HV mAU	RT ml	HV mAU
1	3,8	6,2	3,8	140,2	38,4			144,3	36,1
2	3,4	5,8	3,6	141,2	39,6	146,6	62,0	138,6	44,5
3	3,4	> 10	3,7	141,2	39,6	-	-	137,9	45,9
4	3,4	4,4	3,4	141,2	39,6	146,6	62,0	139,0	43,2
5	3,4	4,7	3,4	141,7	41,9	134,6	63,0	139,2	42,9
6	3,4	> 10	3,6	141,7	41,9	-	-	140,1	45,8
7	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	137,2	48,6
8	3,4	> 10	> 10	134,5	54,3	-	-	-	-
9	3,4	4,7	4,4	134,5	54,3	136,5	47,8	135,9	48,4
10	3,4	4,7	3,9	134,5	54,3	136,5	47,8	135,0	50,1
11	3,4	4,2	4,2	134,5	54,3			149,5	44,7
12	3,0	3,7	2,8	136,1	42,7			130,3	51,9
13	3,4	> 10	3,5	134,5	54,3	-	-	145,2	44,4
14	3,5	> 10	3,5	139,9	44,1	-	-	135,9	44,8
15	3,5	> 10	3,3	138,7	40,6	-	-	127,3	54,7
16	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	139,3	45,0
17	3,0	> 10	2,9	139,2	30,4	-	-	130,2	36,2
18	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	137,1	47,0
19	3,1	> 10	3,0	130,2	36,2	-	-	133,3	57,2
20	3,4	4,7	3,5	134,5	54,3	136,5	47,8	136,6	47,5
21	2,2	3,4	2,3	131,6	32,9			133,8	35,2
22	3,4	5,2	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	135,1	50,1
23	3,4	5,8	3,3	148,5	29,6			142,0	65,0
24	3,3	6,2	3,1	135,2	35,4			135,3	34,0
25	3,1	9	3,1	157,0	24,7	-	-	151,3	31,9
26	3,4	> 10	> 10	134,5	54,3	-	-	-	-
27	3,4	4,7	3,5	134,5	54,3	136,5	47,8	136,2	46,9
28	3,2	> 10	3,5	139,7	44,7	-	-	148,0	35,7
29	2,8	> 10	> 10	142,4	23,2	-	-	-	-
30	3,4	4,7	4,1	134,5	54,3	136,5	47,8	137,6	44,2
31	3,6	> 10	> 10	147,4	38,7	-	-	-	-
32	3,1	6,9	3,1	143,8	34,7			136,3	41,4
33	3,4	4,7	3,3	134,5	54,3	136,5	47,8	132,1	55,8
34	3,7	> 10	3,9	140,6	41,6	-	-	145,8	34,5
35	3,4	4,7	3,6	134,5	54,3	136,5	47,8	139,8	42,0
36	2,4	5,1	2,3	145,8	22,0			134,1	32,0
37	3,4	4,7	3,5	134,5	54,3	136,5	47,8	140,3	45,4
38	2,6	4,6	2,7	126,6	27,2			135,9	34,5
39	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	140,4	42,2
40	3,4	> 10	4,1	141,7	41,9	-	-	141,8	64,0

	41	3,4	> 10	> 10	134,5	54,3	-	-	-	-
	42	3,4	4,7	3,3	134,5	54,3	136,5	47,8	137,0	45,6
	43	3,4	5,8	3,8	131,9	47,0			145,0	40,8
5	44	3,4	> 10	> 10	134,5	54,3	-	-	-	-
	45	3,4	4,7	4,3	134,5	54,3	136,5	47,8	135,2	42,9
	46	3,4	> 10	5,2	134,5	54,3	-	-	134,2	119,3
	47	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	134,4	64,0
	48	3,4	4,2	3,5	134,5	54,3			137,3	47,7
10	49	3,4	> 10	5,6	141,7	41,9	-	-	141,9	73,4
	50	3,4	> 10	9	134,5	54,3	136,5	47,8	-	-
	51	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	134,9	50,7
	52	3,4	4,2	3,5	134,5	54,3			126,9	62,7
15	53	3,4	> 10	4,1	134,5	54,3	-	-	137,7	46,1
	54	3,4	4,7	3,4	134,5	54,3	136,5	47,8	138,6	45,0
	55	3,4	4,4	3,8	141,2	39,6	146,6	62,0	138,0	46,2
	56	3,4	> 10	> 10	141,7	41,9	-	-	-	-
	57	3,4	4,7	4,1	141,7	41,9	134,6	63,0	149,8	39,3
20	58	3,4	4,4	3,6	141,2	39,6	146,6	62,0	138,2	46,1
	59	3,4	> 10	3,5	141,7	41,9	-	-	135,5	52,3
	60	3,4	4,7	3,3	141,7	41,9	134,6	63,0	135,1	54,1
	61	3,4	4,4	3,7	141,2	39,6	146,6	62,0	137,7	49,4
25	62	3,4	> 10	> 10	141,7	41,9	-	-	-	-
	63	3,4	4,7	3,9	141,7	41,9	134,6	63,0	147,6	40,7
	64	3,4	4,4	3,5	141,2	39,6	146,6	62,0	139,4	45,0
	65	3,4	> 10	> 10	141,7	41,9	-	-	-	-
	66	3,4	4,7	3,8	141,7	41,9	134,6	63,0	137,4	53,4
30	67	3,4	4,7	3,5	141,7	41,9	134,6	63,0	138,4	39,1
	68	3,4	>10	3,9	141,7	41,9	134,6	-	138,8	49,3

Ejemplo 69 no de acuerdo con la invención.

35 Tiempo de vida de la columna - solventes/eluyentes cromatográficos.

El tiempo de vida de los geles de sílice sustituidas puede estar limitado por las degradaciones químicas del gel por las soluciones aplicadas a la columna cromatográfica, por ejemplo, soluciones de tampón y de regeneración. La degradación química de geles de sílice sustituidas puede observarse por la aparición de silicio en la salida de la columna, o por la disminución de los contenidos de carbono del gel que muestra la pérdida de la sustitución. Los siguientes experimentos muestran la apariencia del silicio en el efluente de la columna y la disminución del contenido de carbono de los geles durante el lavado prolongado con tres soluciones cromatográficas: etanol al 20 % en agua, eluyente 1 y eluyente 2. La composición de eluyente 2 es 31 % p/p de etanol, 1,5 % p/p de KCl, 0,40 % p/p de CaCl₂, 0,15 % p/p de trietanol amina y pH ajustado a pH 7,4 mediante el uso de HCl. La composición del eluyente 1 es sal, tampón, etanol y pH 3,0.

Un lote de gel de sílice ODDMS se empaquetó en cinco columnas de acero de 4,0 x 250 mm mediante el procedimiento estándar para empaquetar columnas cromatográficas. Luego, las columnas se equilibraron con 3 CV de etanol antes de iniciar el lavado continuo con un eluyente cromatográfico. Después, las cinco columnas se lavaron con un eluyente cromatográfico (EtOH al 20 %, eluyente 1 o eluyente 2) durante 1, 3, 7, 12, y 16 días, respectivamente. Luego del tiempo de lavado apropiado cada columna se equilibró con 3 CV de etanol y el gel de sílice se quitó de las columnas. Una muestra del gel de sílice usado se sometió a análisis de los contenidos de carbono, y una muestra de la solución de regeneración usada se sometió a análisis para el contenido de sílice. Los resultados para el día núm. 0 es el resultado (contenidos de carbono) del gel de sílice usado para empaquetar las columnas.

55 Tabla 6.Evaluación del tiempo de vida de la columna durante el lavado prolongado con eluyentes cromatográficos típicos mediante la medición del carbón restante y el silicio liberado.

60

65

5		Columna núm.	Solución cromatográfica	Duración (días)	C medido (%)	Si medido (mg)	Volumen (mL)	Relación C (%)
	100 A ODDMS 4,0*250 mm	204614/15	EtOH al 20 %	0	19,40	0,00	0	100,00
		204614/16	EtOH al 20 %	1	19,14	0,05	136	98,66
10		204614/17	EtOH al 20 %	3	19,16	0,13	425	98,76
		204614/23	EtOH al 20 %	7	19,26	0,31	1540	99,28
		204614/24	EtOH al 20 %	12	19,28	0,25	1270	99,38
				16	19,27	0,41	1360	99,33
15				0	19,40	0,00	0	100,00
		204614/18	Eluyente 1	1	18,67	0,15	147	96,24
		204614/20	Eluyente 1	3	18,85	0,36	360	97,16
20		204614/21	Eluyente 1	7	18,76	0,87	870	96,70
		204614/19	Eluyente 1	12	18,64	1,33	1325	96,08
		204614/22	Eluyente 1	16	18,67	0,86	860	96,24
25		Columna núm.	EtOH al 20 % (% v/v)	Duración (días)	C medido (%)	Si medido (mg)	Volumen (mL)	Relación C (%)
	200 A ODDMS 4,0*250 mm			0	9,80	0,00	0	100,00
30		204630/14	EtOH al 20 %	1	9,61	0,03	160	98,06
		204630/13	EtOH al 20 %	3	9,66	0,09	430	98,57
		204630/15	EtOH al 20 %	7	9,72	0,09	425	99,18
35		204630/16	EtOH al 20 %	12	9,69	0,18	610	98,88
		204630/18	EtOH al 20 %	16	9,69	0,28	930	98,88
40				0	9,80	0,00	0	100,00
		204630/19	Eluyente 2	1	9,55	0,13	125	97,45
		204630/17	Eluyente 2	3	9,55	0,40	400	97,45
		204630/20	Eluyente 2	7	9,54	0,85	850	97,35
		204630/21	Eluyente 2	12	9,59	1,29	1290	97,86
45		204630/23	Eluyente 2	16	9,49	0,70	700	96,84

Ejemplo 70.

Tiempo de vida de la columna - soluciones de regeneración que comprenden ácido fórmico.

El tiempo de vida de los geles de sílice sustituidas puede estar limitado por las degradaciones químicas del gel por las soluciones aplicadas a la columna cromatográfica, por ejemplo, soluciones de tampón y de regeneración. La degradación química de geles de sílice sustituidas puede observarse por la aparición de silicio en la salida de la columna, y por la disminución de los contenidos de carbono del gel que muestra la pérdida de la sustitución. Los siguientes experimentos muestran la apariencia de silicio en el efluente de la columna y la disminución del contenido de carbono de los geles durante el lavado prolongado con ácido fórmico que contiene soluciones de regeneración. Por lo tanto, en comparación con la situación mediante el uso de tampones cromatográficos o solventes, el ácido fórmico que contiene soluciones de regeneración no se deteriora en la matriz de la columna.

Un lote de gel de sílice ODDMS se empaquetó en cinco columnas de acero de 4,0 x 250 mm mediante el procedimiento estándar para empaquetar columnas cromatográficas. Luego, cada columna se equilibró con 3 CV de EtOH al 100 % antes de iniciar el lavado continuo con ácido fórmico. Después, las cinco columnas se lavaron con un solvente de regeneración que era ácido fórmico (100 % u 80 %) durante 1, 3, 7, 12 y 16 días, respectivamente. Luego del tiempo de lavado apropiado cada columna se equilibró con 3 CV de etanol y el gel de sílice se quitó de las columnas. Una muestra del gel de sílice usado se sometió a análisis de los contenidos de carbono, y una muestra de la solución de

regeneración usada se sometió a análisis para el contenido de sílice. Los resultados para el día núm. 0 es el resultado (contenidos de carbono) del gel de sílice usado para empaquetar las columnas.

Tabla 7. Evaluación del tiempo de vida de las columnas durante la regeneración prolongada con soluciones que contienen ácido fórmico mediante la medición del carbono restante y el silicio liberado.

Tipo de columna	Columna núm.	Ácido fórmico (%)	Duración (días)	C medido (%)	Si medido (mg)	Volumen (mL)	Relación C (%)
100 Å ODDMS 4,0*250 mm	0	-	0	19,40	0,00	0	100,00
	204614/7	100	1	19,00	0,82	124	97,94
	204614/5	100	3	18,90	1,46	510	97,42
	204614/6	100	7	19,26	1,95	620	99,28
	204614/3	100	12	18,97	5,63	1430	97,78
	204614/2	100	12	18,94	3,92	1100	97,63
	0	-	0	19,40	0,00	0	100,00
	204614/8	80	1	19,08	1,67	177	98,35
	204614/10	80	3	19,08	2,62	410	98,35
	204614/9	80	7	18,93	4,55	970	97,58
	204614/11	80	12	17,04	6,07	1080	N.D.
	204614/12	80	16	18,61	6,86	2090	95,93
200 Å ODDMS 4,0*250 mm	0	-	0	9,80	0,00	0	100,00
	204630/8	100	1	9,56	0,62	85	97,55
	204630/5	100	3	9,50	1,77	510	96,94
	204630/6	100	7	9,41	1,02	800	96,02
	204630/3	100	12	9,67	1,31	1020	98,67
	204630/2	100	12	9,63	1,22	1655	98,27
	0	-	0	9,80	0,00	0	100,00
	204630/7	80	1	9,64	0,56	141	98,37
	204630/10	80	3	9,42	0,77	440	96,12
	204630/9	80	7	9,43	1,10	920	96,22
	204630/11	80	12	8,67	1,40	1470	N.D.
	204630/12	80	16	9,18	1,46	2000	93,67

Ejemplo 71 no de acuerdo con la invención.

Uso de microscopía confocal de barrido láser que detecta fibrillas de insulina en el intercambiador aniónico Source 30Q

Propósito

El propósito de usar microscopía confocal de barrido láser es determinar de manera visual cuán efectivos son los diferentes solventes regeneradores en la eliminación de fibrillas de insulina de Source 30Q. Con un software sofisticado de procesamiento de imágenes que permite la oportunidad de medir el área de las fibrillas de insulina en cada imagen, dando un criterio más preciso a la hora de crear un juicio visual de cada imagen.

El principio confocal

El principio en usar CLSM es que la muestra se tiñe con un colorante fluorescente. La muestra teñida se coloca bajo el microscopio y el colorante fluorescente se excita mediante el uso de un láser. La luz emitida que proviene del colorante fluorescente se detecta y se forma la imagen.

El microscopio confocal de barrido láser es como el microscopio confocal normal que usa un láser como fuente de luz. La luz del láser atraviesa el objetivo del microscopio a través del divisor dicromático. El divisor de dicromático es un dispositivo que permite que la luz proveniente del láser pase a través del objetivo hacia la muestra y la luz emitida proveniente de la muestra pase el divisor dicromático y suba a los tubos fotomultiplicadores donde se detecta la luz y se forma la imagen. Entre el divisor dicromático y los fotomultiplicadores se encuentra el agujero confocal colocado. El agujero confocal funciona como un filtro que detiene toda la luz provista de regiones de enfoque para alcanzar las fotomultiplicaciones. Esto significa que la imagen que se forma proviene de un plano de enfoque muy estrecho. Al ajustar el agujero confocal es posible mover el plano de enfoque de imagen hacia arriba y hacia abajo a través de la

muestra y producir una serie de imágenes a lo largo del eje óptico (z) del microscopio. Esta serie de imágenes puede recogerse en una imagen 3D de la muestra.

Source 30Q

5 Source 30Q es un intercambiador de anión fuerte basado en perlas monodispersas con un tamaño de partícula de 30 micras. La matriz consiste en poliestireno/divinilbenceno. Source 30Q proporciona una autofluorescencia débil en el área de longitud de onda por encima de 650 nm. Esto significa que es posible ver las partículas de Source 30Q sin tinción.

10 Tioflavina T

15 El colorante usado para teñir las fibrillas de insulina es la Tioflavina T que es conocida por teñir las proteínas amiloides. La tioflavina T tiene un amplio espectro de emisión con una emisión máxima que oscila por debajo de 490 nm y por encima de 530 nm. Esto significa que es posible diferenciar entre la luz proveniente de las fibrillas de insulina (verde) y la luz de la autofluorescencia proveniente de las partículas (roja).

Método para teñir las fibrillas de insulina en Source 30Q

20 Se coloca 0,0385 g Source 30Q seco en un recipiente de 25-30 ml.

Se añaden 500 µl de etanol al 96 % a Source 30Q

25 Se añaden 4,5 ml de ácido acético 0,05 M ajustado a pH 3 con NaOH.

La mezcla se mezcla al agitar el recipiente de manera cuidadosa

Se añade 20 µl de Tioflavina T 116,62 mM en agua Milli-Q

30 La mezcla se agita cuidadosamente durante 5 min.

La muestra ahora se tiñe y está lista para analizarse bajo el microscopio

35 Una pequeña gota de la mezcla aproximadamente 40 µl se coloca en un pocillo microscópico y se pone en el microscopio

Se tomaron 10 imágenes 2D de cada muestra a partir de diferentes lugares del pocillo

Equipo

40 Condiciones microscópicas

Objetivo: 40*; aceite; ¿NA?

45 Láser: Argón 488 nm

Intensidad del láser: 100 %

50 Agujero confocal: 20 µm

Filtro de emisión (Núm. 2): 515/30M de Chroma

Filtro de emisión (Núm. 3): HQ650LP de Chroma

55 Microscopio: Nikon TE300 equipado con el cabezal de barrido confocal PCM2000 (fotomultiplicador) de Nikon.

Software: Visor Nikon EZ2000 2.5.77

60 Software usado para el procesamiento de imágenes: AnalySIS 3.00

Procesamiento de imágenes

65 El área de las fibrillas de insulina se midió en las 10 imágenes 2D de cada muestra. Para asegurar que cada muestra se trató exactamente de la misma manera, el procesamiento de la imagen se realizó automáticamente formando una macro. La macro se muestra a continuación. El área de cada fibrilla individual de las 10 imágenes de cada muestra se

resume en la hoja de cálculo de Excel. El área resumida de la fibrilla de cada muestra se recogió en un diagrama de barras para la comparación.

Macro para medir el área de las fibrillas:

```

5 Op.Display=1;
docActive("nombre de la imagen");
10 DBloadImage();
MaximizeContrast();
ShadingCorrection(N*N tamaño promedio de filtro;3; límite inferior;1900; límite superior; 2000 );
15 BinarizeColorImage(ColorUmbrholds:=NULL, Fase:=-1);
Invert();
20 EdgeEnhance(tamaño; 5; porcentaje; 70 );
SetFrame(izquierdo:=0, Superior:=0, Derecho:=1023, Inferior:=1023);
Detect();
25 ParticleResults();
Op.Display=6;
30 Option.BurnOverlay=TRUE;
SaveAs(Nombre del archivo:);
docActivate("Hoja*");
35 SaveAs(Nombre del archivo:);
Close(AskForSave:=TRUE);

```

40 Tabla 8. Área medida de las fibrillas en un gel Source 30Q usado antes y después de la regeneración del gel mediante el uso de diferentes soluciones de regeneración.

Solución de regeneración	Área de las fibrillas (unidades aleatorias)
Ninguna	485
Ninguna	458
NaOAc (0,25 % p/p de NaOAc, 0,24 % p/p de tris, 42,5 % p/p de EtOH, pH 7,5	154
NaOH (1M)	101
HCOOH:agua (50:50)	68
HCOOH (100 %)	0
HCOOH:EtOH (50:50)	0

55 La eliminación completa de las fibrillas de insulina se obtiene al usar ácido fórmico puro o una mezcla de ácido fórmico y etanol. Una mezcla 50:50 de ácido fórmico:agua no elimina completamente las fibrillas, aunque esta mezcla es una solución de regeneración más eficiente que el hidróxido de sodio (1M).

Ejemplo 72.

Procedimiento estándar para la regeneración de columnas RP-HPLC con ácido fórmico a escala de producción.

60 Los procedimientos descritos a continuación se aplican a dos tipos de columnas usadas en cuatro etapas de purificación cromatográfica en una purificación a escala de producción de insulina humana.

Columna tipo 1:

65 Altura del lecho 32,5 cm

ES 2 746 381 T3

1. La columna se enjuaga con aproximadamente 1.5 CV al 20 % p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 4.6 CV/h para retirar las sales de tampón
- 5 2. Se invierte la dirección del flujo en la columna
3. La columna se lava con aproximadamente 1,1 CV de etanol absoluto con una velocidad de flujo de 4,5 CV/h
4. Se bombea 1,1 CV de ácido fórmico puro sobre la columna a una velocidad de flujo de 2,1 CV/h
- 10 5. Se detiene el flujo y se deja que la columna permanezca con ácido fórmico durante 30 minutos.
6. La columna se lava con aproximadamente 1,1 CV de etanol absoluto con una velocidad de flujo de 4,5 CV/h
- 15 7. La columna se lava con aproximadamente 1,1 CV de 20% p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 4,5 CV/h
8. La dirección de flujo en la columna se cambia de regreso a la normal.
- 20 9. La columna se equilibra con un mínimo de 4 CV de 20 % p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 4,6 CV/h

La columna está ahora lista para usar nuevamente.

Columna tipo 2:

- 25 Altura del lecho 37,5 cm
1. La columna se lava con aproximadamente 1,5 CV de 20% p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 4,6 CV/h para eliminar las sales del tampón
- 30 2. Se invierte la dirección del flujo en la columna
3. La columna se lava con aproximadamente 1,0 CV de etanol absoluto con una velocidad de flujo de 3,9 CV/h
- 35 4. Se bombea 0,92 CV de ácido fórmico puro sobre la columna a una velocidad de flujo de 1,9 CV/h
5. Se detiene el flujo y se deja que la columna permanezca con ácido fórmico durante 30 minutos.
- 40 6. La columna se lava con aproximadamente 1,0 CV de etanol absoluto con una velocidad de flujo de 3,9 CV/h
7. La columna se lava con aproximadamente 1,0 CV de 20% p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 3,9 CV/h
- 45 8. La dirección de flujo en la columna se cambia de regreso a la normal.
9. La columna se equilibra con un mínimo de 4.0 CV de 20 % p/p etanol en agua con una velocidad de flujo de 4,6 CV/h

La columna está ahora lista para usar nuevamente.

50 En las columnas Tipo 1 la regeneración con ácido fórmico se lleva a cabo después de cada 16^{ta} corrida como una acción preventiva para detener la acumulación de componentes, aumentar las contrapresiones de la columna y aumentar los volúmenes totales. Al aplicar el procedimiento de regeneración con ácido fórmico en la etapa de purificación cromatográfica I, el tiempo de vida del lecho de columna se extiende hasta 2000 corridas.

55 En las columnas Tipo 2 regeneradas con ácido fórmico se llevan a cabo rutinariamente después de cada 60^{ma} corrida o si aumenta las contrapresiones, se observa aumento de los volúmenes totales y acumulación de impurezas. Al aplicar el procedimiento de regeneración con ácido fórmico, el tiempo de vida del lecho de columna se extiende hasta 600 corridas en la etapa de purificación cromatográfica III y hasta 900 corridas en la etapa cromatográfica IV.

60 La matriz de la columna usada en las etapas de purificación cromatográfica I, III y IV consiste en partículas de sílice sustituida octadecildimetilo (sílice ODDMS). El procedimiento estándar descrito se aplica para todos los tipos de matrices de sílice sustituidas usadas a escala de producción.

65 El procedimiento también se usa en los procedimientos de regeneración con ácido fórmico para matrices de columna basadas en el material de Source Q

Los ejemplos del efecto en la purificación cromatográfica III y IV se muestran a continuación.

Tabla 9. Purificación cromatográfica III: Efecto en el volumen total y la contrapresión.

5	Antes de la regeneración con ácido fórmico (100 %)	
	Volumen Total (peso)	Contrapresión (presión máxima sobre bomba de suministro)
	208 kg	27 Bar
10	Después de la regeneración con ácido fórmico (100 %)	
	Volumen Total	Contrapresión (presión máxima sobre bomba de suministro)
	165 kg	17 Bar

La regeneración reduce el volumen total con la aplicación de 21 % y la contrapresión con 37 %.

La Figura 4A-B muestra el efecto de la regeneración en cromatograma preparativo para la purificación cromatográfica III.

Al aplicar la regeneración con ácido fórmico se logra una mejor separación y forma del pico de la insulina humana (el pico de insulina es el pico grande que comienza en el tiempo 8,20 en la figura superior y en el tiempo 14,02 en la figura inferior).

Ejemplo 73 no de acuerdo con la invención.

Regeneración de DEAE Sepharose.

Un lote de DEAE Sepharose que se había usado para una gran cantidad de ciclos de purificación en un proceso para la purificación de la hormona de crecimiento humano se regeneró con ácido fórmico puro (HCOOH al 100 %). Antes de la regeneración la Sepharose tiene un color marrón que indica el material depositado en el gel. La Sepharose regenerada fue mucho más clara en color.

Las muestras de la Sepharose regenerada se comparó con la Sepharose antes de la regeneración mediante el uso de un colorímetro (Minolta CR-300) para cuantificar las diferencias de color, los resultados cn.f. en la tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de la regeneración de DEAE Sepharose cuando se regenera como una suspensión con una solución de regeneración de ácido fórmico.

Material de Sepharose analizado	Coordenadas de color		
	L (luz)	A (rojo)	b (amarillo)
Gel usado antes de la regeneración	68,81	2,37	17,22
Gel usado después de 3 horas de regeneración	84,99	0,66	11,55
Gel usado después de 24 horas de regeneración	87,94	0,35	7,64
Gel usado después de 24 horas de regeneración donde se ha aplicado solución de regeneración fresca a las 12 horas.	85,85	0,69	8,81
Gel no usado, es decir, que nunca se ha usado para cromatografía	86,44	-0,06	2,01

Ejemplo 74.

Regeneración de gel de sílice usado que contiene agregados de glucagón.

El glucagón y los péptidos similares al glucagón (GLP-1 y GLP-2) son particularmente susceptibles a la agregación donde forman fibrillas, es decir, agregados de estructuras de hoja β. En este ejemplo se llevó a cabo un experimento modelo donde el glucagón humano se cargó en una columna de sílice (como se describió en los ejemplos 1-68). La solución de glucagón se dejó en la columna durante 3 días a 30 °C para introducir los problemas de presión y rendimiento que mimetizan los problemas encontrados durante la fabricación industrial del glucagón. La presión sobre la columna se midió a 3,5 MPa mediante el uso del eluyente 2 como se describió en el ejemplo 69 a una velocidad de flujo de 9 ml/min a 22 °C.

Después de un ciclo de regeneración mediante el uso de ácido fórmico (100 %) la presión sobre la columna se redujo a 2,67 MPa que ilustra la efectividad del ácido fórmico como una solución de regeneración.

Ejemplo 75 no de acuerdo con la invención.

Tiempo de vida de la columna – solución de regeneración que contiene NaOH 0,1 M y 60 % p/p de etanol en agua.

5 El experimento se llevó a cabo como se describió en el ejemplo 70 excepto para la solución de regeneración que en este experimento fue etanol alcalino como se usa comúnmente para regenerar las fases estacionarias cromatográficas.

10 El flujo de la solución de regeneración fue aproximadamente 0,1 ml/min, y los experimentos se terminaron después de 4 días ya que la presión sobre las columnas fue >10 MPa. Los resultados hasta la ruptura de las columnas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Evaluación del tiempo de vida de la columna durante la regeneración prolongada con una solución de regeneración que contiene NaOH 0,1 M y etanol al 60 % p/p en agua.

Tipo de columna	Columna núm.	Duración (días)	C medido (%)	Si medido (mg)	Volumen (mL)	Relación C (%)
200 Å ODDMS 4,0*250 mm	0	0	9,80	0,0	0	100
	204630/26	1	9,80	16,2	116	100
	204630/25	2	9,77	27,0	180	99,7
	204630/24	4	9,59	31,9	228	97,9

Ejemplo 76 no de acuerdo con la invención.

25 Regeneración de XAD 1180

El tiempo de vida de la resina polimérica de fase inversa XAD 1180 usada para concentrar un precursor de insulina a partir del caldo de fermentación clarificado se limitó debido a la acumulación grave de contaminantes hidrofóbicos tales como compuestos coloreados, péptidos y antiespumantes de la fermentación. El ciclo de regeneración normal se basó en el lavado con una solución de regeneración que contiene etanol al 80 % en ácido cítrico 0,1 M, pH 3,0 seguido por calentamiento con una solución de NaOH al 5 % a 80 °C. Este proceso de regeneración no fue eficiente para eliminar los contaminantes acumulados.

35 La eliminación de antiespumante unido (Pluronic PE 6100 y P2000) a partir de resina usada se evaluó mediante experimentos con diferente concentración y tiempo de contacto de etanol e isopropanol en modo estático y en comparación con una regeneración con ácido fórmico (Tabla 12). El tratamiento con ácido fórmico es superior en la eliminación de los contaminantes adsorbidos en comparación con los solventes de regeneración industriales estándares.

40 Tabla 12. Eficiencia de diferentes soluciones de regeneración en la eliminación de contaminantes antiespumante adsorbidos a partir de una fase estacionaria de cromatografía XAD 1180 usada.

Solvente de regeneración	Conc.	Tiempo (horas)	Temp. (°C)	Conc. de antiespumante sobre la resina (ppm)
Etanol	84	2	25	20023
Etanol	92%	2	25	13058
Etanol	99%	2	25	8042
Etanol	84	6	25	25083
Etanol	84	2	50	14712
Etanol	99%	6	50	9911
Isopropanol	70%	2	25	15899
Isopropanol	99%	2	25	3262
Ácido fórmico	99%	2	25	670

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para regenerar una fase estacionaria cromatográfica de material de sílice sustituida en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 70 °C con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 75 % p/p de agua, en donde dicho ácido orgánico es ácido fórmico, en donde la concentración de dicho ácido orgánico es al menos 25 % p/p.
- 10 2. Un proceso para regenerar la fase estacionaria cromatográfica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto a una temperatura en el intervalo de 0 °C a 70 °C con una solución de regeneración que comprende al menos un ácido orgánico y menos que 1 % p/p de agua, en donde dicho ácido orgánico es ácido fórmico.
- 15 3. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha solución de regeneración comprende un solvente orgánico.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho solvente orgánico es etanol.
- 20 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho solvente orgánico es 2-propanol.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho solvente orgánico es acetonitrilo.
- 25 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en metanol, 1-propanol y hexilenglicol.
8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha solución de regeneración contiene menos de 0,5 % de agua, preferentemente menos de 0,1 % de agua, con mayor preferencia menos de 0,02 % de agua y con la máxima preferencia menos de 0,001 % de agua.
- 30 9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración dentro de una columna cromatográfica.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se regenera sin volver a empaquetar la columna.
- 35 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se fluidifica durante dicha regeneración.
- 40 12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde un eluyente cromatográfico o tampón de equilibrio se desplaza por un disolvente orgánico miscible en agua antes de que dicha fase estacionaria cromatográfica se ponga en contacto con dicha solución de regeneración.
- 45 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho solvente orgánico está presente también en el eluyente cromatográfico o tampón de equilibrio.
14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde dicho solvente orgánico miscible en agua también está presente en la solución de regeneración.
- 50 15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración fuera de la columna cromatográfica.
16. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica es una matriz de RP-HPLC.
- 55 17. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica es sílice sustituida C16 o C18.
18. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica es C4, C8 o sílice sustituida con fenilo.
- 60 19. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración durante al menos 1 segundo, preferentemente durante al menos 1 minuto, con mayor preferencia durante al menos 5 minutos, tal como de 1 minuto a 24 horas, de 1 minuto a 5 horas, de 1 minuto a 2 horas, de 10 minutos a 60 minutos.

65

- 5
20. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicha fase estacionaria cromatográfica se pone en contacto con dicha solución de regeneración hasta que la caída de presión en la longitud de la columna cromatográfica a una velocidad de flujo normal disminuye en al menos 10 %, preferentemente al menos 25 %, con la máxima preferencia al menos 50 %.
- 10
21. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde poner en contacto dicha fase estacionaria cromatográfica con dicha solución de regeneración se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 5 °C a 50 °C, preferentemente de 10 °C a 40 °C, con mayor preferencia de 15 °C a 30 °C, tal como de 18 °C a 25 °C.
- 15
22. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el tiempo de vida de dicha fase estacionaria cromatográfica es al menos 500 ciclos cromatográficos, preferentemente al menos 700 ciclos cromatográficos, con mayor preferencia al menos 1000 ciclos cromatográficos, con la máxima preferencia al menos 2000 ciclos cromatográficos.
- 20
23. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde dicho proceso se aplica a dicha fase estacionaria cromatográfica para cada ciclo cromatográfico, al menos una vez cada 2 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 5 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 20 ciclos cromatográficos, al menos una vez cada 50 ciclos cromatográficos, o al menos una vez cada 100 ciclos cromatográficos.

Figura 1

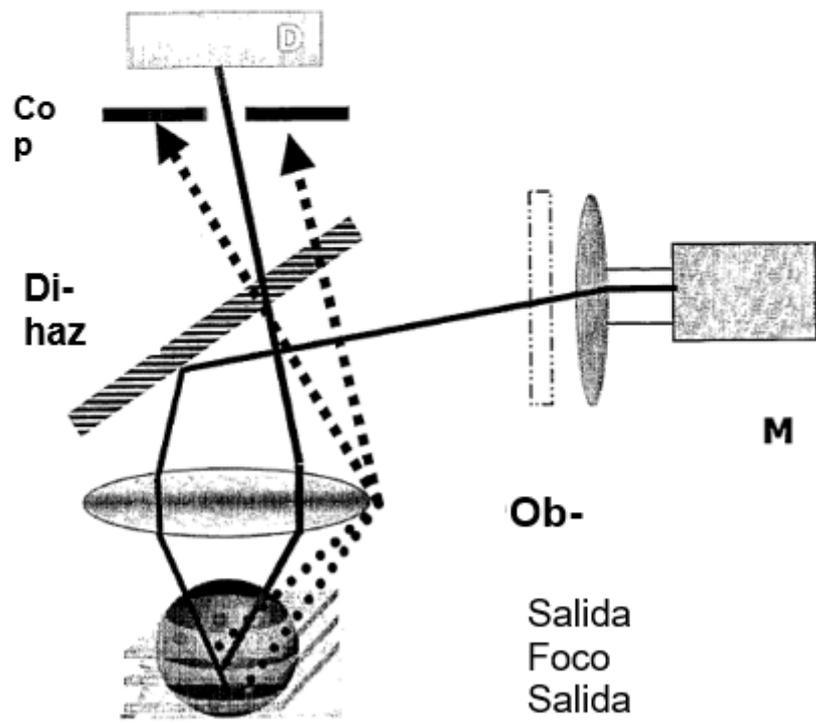


Figura 2

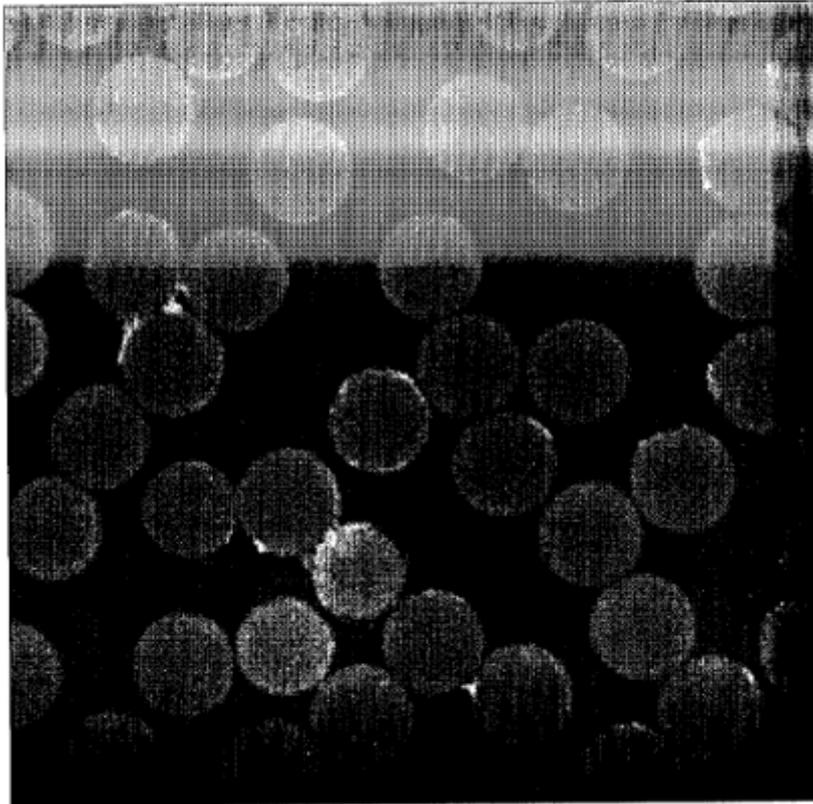


Figura 3

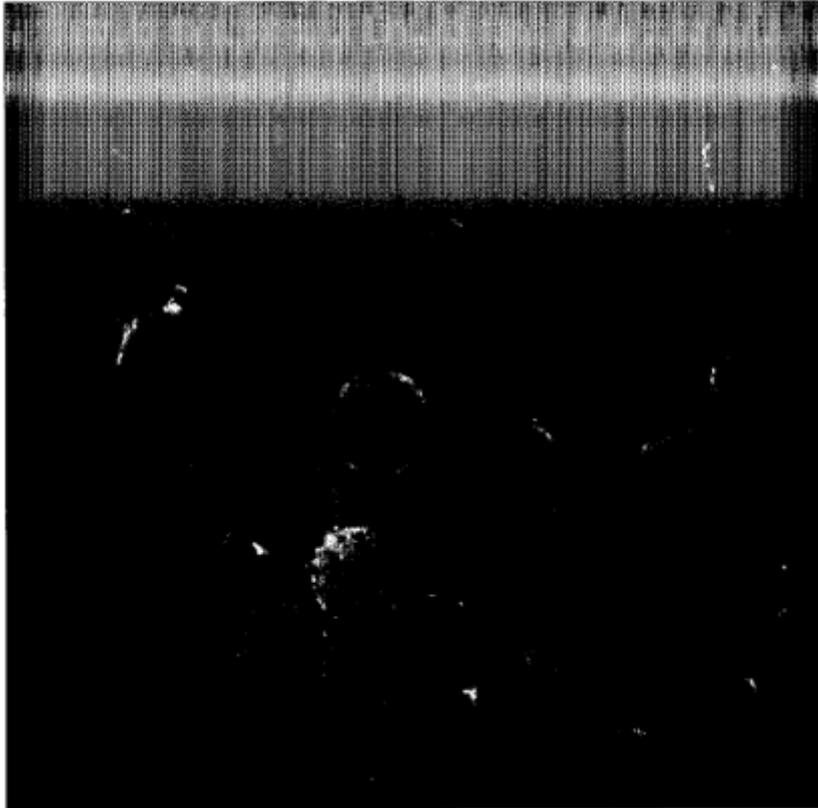
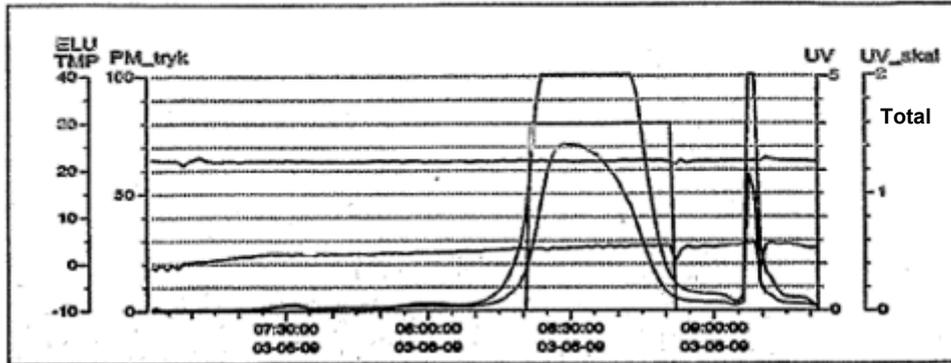
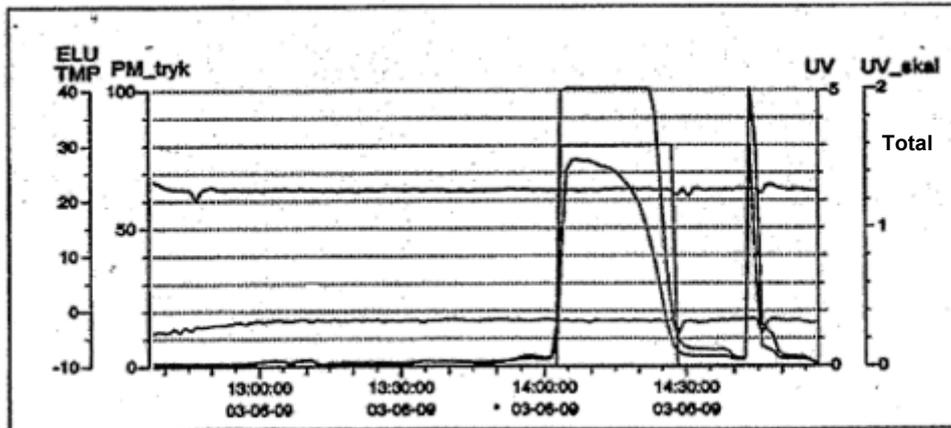


Figura 4A-B



4A. Antes de la regeneración con ácido fórmico



4B. Después de la regeneración con ácido fórmico (100%)