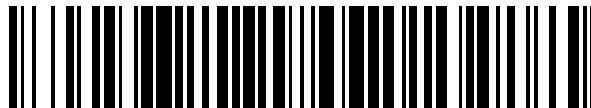


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 322 819**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2006 PCT/EP2006/064263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2007 WO07009950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2006 E 06777781 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.05.2020 EP 1904522**

54 Título: **Procedimiento de purificación de G-CSF**

30 Prioridad:

**15.07.2005 DE 102005033250**

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

**11.02.2021**

73 Titular/es:

**MYLAN PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
781 Chestnut Ridge Road  
Morgantown, WV 26505, US**

72 Inventor/es:

**DIETRICH, ARNDT;  
JANOWSKI, BERNHARD;  
SCHÄFFNER, JÖRG y  
BLASCHKE, ULRICH KURT**

74 Agente/Representante:

**MIR PLAJA, Mireia**

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de G-CSF

5 La presente invención se refiere a un procedimiento según la reivindicación 1 que es para la obtención de factor recombinante estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y comprende al menos una cromatografía de intercambio catiónico y al menos una cromatografía de interacción hidrofóbica, siendo estas dos clases de cromatografía efectuadas de manera inmediatamente consecutiva y en cualquier orden de sucesión. La invención se refiere en particular a un procedimiento que es para la purificación G-CSF a partir de una mezcla de G-CSF y  
10 otras proteínas y comprende dos pasos de cromatografía de intercambio catiónico que son respectivamente efectuados antes y después de una cromatografía de interacción hidrofóbica.

El G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) es un factor de crecimiento que se da de manera natural y pertenece a la familia de las citoquinas en el sentido más amplio y aquí al grupo de los factores estimuladores de colonias. El G-CSF desempeña un papel decisivo en la hematopoyesis y promueve la proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas y la activación de neutrófilos. Debido a estas propiedades, el G-CSF ha encontrado aplicación en distintos ámbitos médicos, como p. ej. la reconstitución de las poblaciones de células sanguíneas normales tras quimioterapia o irradiación, o la estimulación de la respuesta inmune frente a patógenos infecciosos. Así, el G-CSF se aplica en la clínica principalmente en la lucha antitumoral y en particular  
15 para el tratamiento la neutropenia sobrevenida como consecuencia de una quimioterapia, y encuentra además utilización también en los trasplantes de médula ósea y en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En su forma que se da de manera natural, el G-CSF humano es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons y presenta cinco residuos de cisteína. Cuatro de estos residuos forman dos puentes disulfuro intramoleculares que son de gran importancia para la actividad de la proteína. Puesto que el G-CSF puede ser obtenido tan sólo en pequeñas cantidades a partir de sus fuentes naturales, para la fabricación de fármacos se usan principalmente formas recombinantes de G-CSF, que por ejemplo pueden ser obtenidas mediante expresión en células de mamífero tales como las células CHO (células de ovario de hámster chino) o en células procarióticas tales como *E. coli*. Las proteínas recombinantes que son expresadas en células de mamífero se diferencian del G-CSF que se da de manera natural en un distinto patrón de glicosilación, mientras que en las proteínas que son expresadas en *E. coli*, las cuales como consecuencia de la expresión bacteriana pueden presentar un adicional residuo de metionina N-terminal, está completamente ausente la glicosilación.  
25

La fabricación recombinante de G-CSF fue descrita en la literatura de patentes por primera vez en 1987, en la WO 87/01132 A1. El primer preparado de G-CSF comercial a base de G-CSF recombinante fue homologado en Alemania en 1991 y es fabricado y comercializado con el nombre comercial de Neupogen® por la firma Amgen.  
35

La producción de G-CSF en células procarióticas ciertamente se prefiere a la producción en células de mamífero, ya que pueden utilizarse sistemas de expresión y condiciones de cultivo más sencillos, si bien en la fabricación de proteínas recombinantes en células procarióticas un problema que surge frecuentemente es el de la formación de agregados intracelulares poco solubles de formas desnaturalizadas de la proteína expresada, que son los llamados cuerpos de inclusión, que presentan en parte una estructura secundaria y pueden encontrarse en el citoplasma de las células bacterianas.  
40

La formación de estos cuerpos de inclusión conduce a que las proteínas, tras el aislamiento de los cuerpos de inclusión mediante centrifugación a velocidad moderada, deban ser solubilizadas y renaturalizadas mediante medios adecuados, para mantener su configuración activa. Por ello, la reacción de concurrencia entre una conversión de la proteína desnaturalizada en el correcto intermedio de plegamiento y una agregación de varias moléculas de proteína constituye un importante factor que limita la producción de proteína renaturalizada.  
45

En el estado de la técnica diversos documentos de patente se ocupan del aspecto de la solubilización y renaturalización de proteínas obtenidas en cuerpos de inclusión. En la EP-A-0 719 860, por ejemplo, se describen el aislamiento y la purificación de G-CSF, incluyendo la solubilización y el replegamiento. Han sido descritas en los documentos EP-A-0 512 097, EP-A-0 364 926, EP-A-0 219 874 y WO 01/87925 y pueden además sacarse de la literatura científica y de las obras estándar de la química de las proteínas técnicas generales para la solubilización y renaturalización de proteínas desnaturalizadas.  
50

La proteína replegada es a continuación purificada mediante métodos cromatográficos, es decir que es separada de otras proteínas y demás impurezas que están contenidas tras la solubilización y renaturalización.  
55

También se ocupa de la purificación cromatográfica el documento WO 87/01132 A1 ya anteriormente mencionado, en el cual fue descrita por primera vez la fabricación de G-CSF en células huésped *E. coli*. Dentro del marco de la purificación del G-CSF recombinante se efectúa en el documento WO 87/01132 A1 en el Ejemplo 7 una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna de CM-celulosa (CM-celulosa =  
60

carboximetilcelulosa).

5 En la EP 0 719 860 A1 el G-CSF es purificado a continuación de la solubilización y oxidación mediante resina Dowex para la eliminación del medio solubilizante, seguidas por una cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía de intercambio catiónico. También en la EP 0 719 860 A1 se utiliza CM-Sepharose (= carboximetil-Sepharose) (N.d.T.- o también podría decirse en español CM-Sefarosa, o carboximetil-Sefarosa) para la cromatografía de intercambio catiónico.

10 En la WO 03/051922 A1 se describe un procedimiento de purificación de G-CSF en el que se efectúa una cromatografía de afinidad metálica, o dicho más exactamente, una cromatografía por metal inmovilizado (immobilized metal affinity chromatography, IMAC). A continuación de la cromatografía de afinidad metálica pueden tener lugar en la WO 03/051922 una cromatografía de intercambio catiónico y/o una filtración en gel.

15 En la WO 01/04154 A1 está descrito un procedimiento de purificación de G-CSF en el que se efectúan primeramente una cromatografía de interacción hidrofóbica y a continuación de la misma una cromatografía en hidroxapatita. A continuación de la cromatografía en hidroxapatita se efectúa una cromatografía de intercambio catiónico.

20 Es una finalidad de la presente invención la de indicar un procedimiento de purificación de G-CSF humano recombinante biológicamente activo con el que el G-CSF pueda ser obtenido con una pureza y un rendimiento satisfactorios. El procedimiento debe ser además de ejecución lo más sencilla y supervisable posible. Es deseable un procedimiento de purificación en el que baste con tan pocos pasos cromatográficos como sea posible, para mantener a bajo nivel la complejidad técnica y los costes y para evitar grandes pérdidas de proteína.

25 Estas y otras finalidades son alcanzadas mediante el procedimiento que se indica en la reivindicación 1. Están descritas en las reivindicaciones dependientes formas de realización preferidas.

30 Se descubrió que con la purificación cromatográfica según la reivindicación 1 de G-CSF renaturalizado mediante una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de interacción hidrofóbica puede alcanzarse una aceptable pureza del G-CSF recombinante biológicamente activo con un rendimiento satisfactorio. La pureza puede ser adicionalmente incrementada mediante un segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico.

35 La invención se refiere con ello a un procedimiento según la reivindicación 1 de purificación de G-CSF humano biológicamente activo fabricado recombinantemente, en el que se efectúan al menos una cromatografía de intercambio catiónico y al menos una cromatografía de interacción hidrofóbica, teniendo lugar estos pasos cromatográficos en cualquier orden de sucesión y ciertamente sin que entre estos pasos tenga lugar otro paso cromatográfico u otro paso de purificación. Así pues, la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de interacción hidrofóbica se siguen inmediatamente una a otra.

40 Por "G-CSF humano biológicamente activo" se entiende según la invención que el G-CSF purificado mediante el procedimiento según la invención está en condiciones de promover la diferenciación y proliferación de células precursoras hematopoyéticas y producir la activación de células maduras del sistema hematopoyético. Por consiguiente, el G-CSF que ha sido obtenido mediante el procedimiento según la invención es adecuado para el tratamiento de indicaciones en las que es ventajosa la administración de G-CSF. Se entiende que el concepto "G-CSF humano biológicamente activo" también incluye a los mutantes y modificaciones de G-CSF cuya secuencia de aminoácidos está modificada con respecto a la secuencia de tipo salvaje, pero que presentan una actividad biológica similar a la del G-CSF de tipo salvaje, como se describe p. ej. en los documentos WO 01/87925 y EP 0 456 200. Esto mismo es válido para los conjugados de G-CSF. En cuanto al G-CSF a purificar, se trata preferiblemente de Met-G-CSF humano, fabricado en células *E. coli*.

50 En una forma de realización de la invención, el procedimiento de purificación de G-CSF comprende dos pasos de cromatografía de intercambio catiónico que son respectivamente efectuados antes y después de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

55 En una adicional forma de realización de la invención, el procedimiento comprende una filtración en flujo tangencial a continuación de la única cromatografía de intercambio catiónico, o bien, para el caso de que se efectúen más de un paso de cromatografía de intercambio catiónico, a continuación de la última cromatografía de interacción catiónico.

60 En una adicional forma de realización, en el procedimiento de purificación de G-CSF se prescinde de la realización de una cromatografía de intercambio aniónico.

En una adicional forma de realización, en el procedimiento de purificación según la invención se prescinde de la cromatografía de filtración en gel.

5 En una adicional forma de realización de la invención se renuncia a la realización de una HPLC (HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución) preparativa. Esto mismo es válido para la cromatografía de fase inversa, que hay que distinguir de la cromatografía de interacción hidrofóbica según la invención y a la cual se renuncia asimismo en lo posible en la preparación. La HPLC de fase inversa se aplica únicamente a efectos analíticos.

10 En una adicional forma de realización, dentro del marco del procedimiento no tiene lugar cromatografía de afinidad alguna, y en particular no se efectúa cromatografía de afinidad de colorante, cromatografía de afinidad metálica o cromatografía de afinidad de inmunoglobulina.

En una adicional forma de realización, dentro del marco del procedimiento de purificación se renuncia a la realización de una cromatografía en hidroxiapatita.

15 En una forma de realización preferida, el procedimiento de purificación según la invención hace con ello uso de únicamente dos distintos métodos de separación cromatográfica, que son concretamente el del intercambio iónico sobre la base de la interacción competitiva de iones cargados y el de la interacción hidrofóbica, que se distingue por el hecho de que a altas concentraciones salinas las regiones superficiales apolares de una proteína se adsorben en los ligandos débilmente hidrofóbicos de una fase estacionaria.

20 Hay que distinguir de esto al principio de separación cromatográfica de la afinidad, que se basa en la adsorción específica y reversible de una molécula en una contraparte de fijación individual fijada a una matriz. En el caso de la cromatografía en hidroxiapatita, que se basa en la utilización de cristales de hidroxiapatita inorgánicos, se trata de un adicional método de separación que se diferencia de la cromatografía de intercambio iónico en forma de la cromatografía de intercambio catiónico y de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

25 Estos principios de cromatografía anteriormente mencionados son también correspondientemente diferenciados en los círculos técnicos (véase p. ej. Bioanalytik, F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), Heidelberg, Berlin, Spektrum Akad. Verlag 1998).

30 En una forma de realización preferida, la purificación cromatográfica comprende no más de tres pasos de cromatografía en los cuales se utilizan tan sólo dos distintos métodos de separación cromatográfica.

35 Como material de partida para la purificación cromatográfica se utiliza G-CSF renaturalizado que debe ser llevado a una pureza que permita su utilización en forma de una preparación farmacéutica.

La solubilización y el replegamiento de la proteína pueden efectuarse según los métodos que son conocidos en la técnica, p. ej. como se describe en la EP-A-1 630 173.

40 El G-CSF replegado puede ser elaborado después del replegamiento y antes del primer paso de cromatografía, siendo dicha elaboración efectuada p. ej. por filtración, concentración, precipitación, acidificación y/o diálisis.

45 La preparación de plegamiento se clarificará antes del primer paso de cromatografía, o sea se retirarán las partículas de más alto peso molecular, con respecto a las cuales se trata ante todo de agregados proteicos que fueron formados en el plegamiento. Esta clarificación se efectúa mediante filtración en lecho profundo, en la cual sirve de medio filtrante un apilamiento no compacto de un material granular. Las partículas sólidas son mayores que los poros del medio filtrante o bien son retenidas por absorción en la superficie interior del apilamiento.

50 Para la filtración en lecho profundo se utilizan preferiblemente como medio filtrante fibras de éster de celulosa. Adecuados materiales filtrantes, así como las correspondientes prescripciones de utilización, pueden p. ej. obtenerse de la firma Millipore con los nombres comerciales Millistak Plus COHC y Millistak + B1HC.

55 Preferiblemente, antes de la filtración en lecho profundo se procede a acidificar la preparación de plegamiento, para que el filtrado pueda ser utilizado de manera particularmente eficaz directamente para la cromatografía de intercambio catiónico. El valor pH de la preparación de plegamiento es aquí preferiblemente ajustado a menos de 4,0, y con particular preferencia a 3,2.

60 Para la cromatografía de intercambio catiónico pueden utilizarse matrices habituales de las que están a la venta en el mercado. Dentro de una determinada gama de valores pH, debido a su carga total positiva el G-CSF se fija a la matriz de intercambio catiónico, mientras que la mayoría de las sustancias contaminantes tales como ácidos nucleicos, lipopolisacáridos y proteínas que proceden de las células huésped, así como isómeros iónicos de G-CSF y formas modificadas de G-CSF con otros valores pl, no se fijan o bien pueden ser retiradas por lavado.

Aunque sin quedar limitadas a éstas, las adecuadas matrices de intercambio catiónico incluyen a los miembros del

grupo que consta de carboximetil (CM)-celulosa, AG 50 W, Bio-Rex 70, Carboximetil (CM)-Sephadex, Sulfopropil (SP)-Sephadex, Carboximetil (CM)-Sephadex CL-6B, CM-Sephadex HP, Hyper D-S-Ceramic (Biosepra) y Sulfonato (S)-Sephadex, SP Sephadex FF, SP Sephadex HP, SP Sephadex XL, CM Sephadex FF, TSK gel SP 5PW, TSK gel SP-5PW-HR, Toyopearl SP-650M, Toyopearl SP-650S, Toyopearl SP-650C, Toyopearl CM-650M, Toyopearl CM-650S, Macro-Prep High S Support, Macro-Prep S Support, Macro-Prep CM Support, etc.

Las matrices y los protocolos adecuados para la realización de la cromatografía de intercambio catiónico puede sacarlos el experto en la materia de las informaciones de productos de ofertantes tales como Amersham Biosciences (<http://www.amershambiosciences.com>, entretanto GE Healthcare) o Bio-Rad (<http://www.bio-rad.com>).

Preferiblemente se utilizan como matriz para la cromatografía de intercambio catiónico matrices sulfopropílicas, y en particular los productos SP Sephadex XL y SP-Sephadex FF (Fast Flow), que son suministrados por Amersham Biosciences, de Friburgo, Alemania (entretanto GE Healthcare).

En una forma de realización preferida de la invención en la que se efectúan dos cromatografías de intercambio catiónico, concretamente una antes y una después de la cromatografía de interacción hidrofóbica, se utiliza en ambos casos una matriz sulfopropílica, y con particular preferencia en la primera cromatografía de intercambio catiónico SP Sephadex XL y en la segunda cromatografía de intercambio catiónico SP Sephadex FF.

Los tampones adecuados para la cromatografía de intercambio catiónico incluyen a un tampón de maleato, malonato, citrato, lactato, acetato, fosfato, HEPES y bicina. La concentración del tampón está preferiblemente situada entre 10 y 100mM, y preferiblemente entre 20mM y 50mM. Para la purificación del G-CSF el pH del tampón no debería en lo posible ser de más de 7,0, y preferiblemente no debería ser de más de 6,5.

En una forma de realización preferida se usa para la cromatografía de intercambio catiónico acetato sódico 20mM pH 5,0, que se utiliza para el equilibrado y el lavado.

Si se efectúa una segunda cromatografía de intercambio de catiónico, se usa para el equilibrado y el lavado preferiblemente fosfato sódico 50mM, pH 5,4.

Tras el lavado, el G-CSF puede ser eluido de la columna mediante una modificación, y en el caso de la cromatografía de intercambio catiónico mediante un incremento, del valor pH o mediante un incremento de la fuerza iónica.

La elución se provoca preferiblemente mediante un incremento de la fuerza iónica. Si se utiliza como tampón acetato sódico 20mM pH 5,0, es adecuada para la elución por ejemplo una solución de acetato sódico 20mM pH 5,0 y NaCl 200mM.

Las adicionales condiciones adecuadas para la cromatografía de intercambio catiónico pueden sacarse de la correspondiente literatura especializada, como es por ejemplo el manual "Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods" de Amersham Biosciences, de Friburgo, Alemania (entretanto GE Healthcare), 2002.

La concentración salina en el tampón de carga para la cromatografía de intercambio catiónico debería ser lo suficientemente baja como para permitir la fijación a la matriz, siendo la fijación también dependiente del valor pH de la solución.

Dentro del marco de la cromatografía de intercambio catiónico pueden utilizarse distintos tampones para la carga y la fijación a la matriz, como p. ej. tampones seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de tampones de acetato, citrato, Tris/HCl, Tris/acetato, fosfato, succinato, malonato y 2-(N-morfolinoetanosulfonato) (MES) y otros tampones.

Tras la carga de la columna se procede a lavar la columna, y a continuación se procede a eluir las proteínas de la columna. La elución puede hacerse mediante un incremento de la fuerza iónica, lo cual se hace mediante un incremento de la concentración salina en la solución tampón. Se ofrece como alternativa un incremento del valor pH. Pueden además utilizarse gradientes escalonados discontinuos, gradientes lineales o bien una adecuada combinación de tales gradientes.

Los tampones de elución que son adecuados para el lavado y la elución pueden ser seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de tampones de acetato, citrato, Tris/HCl, Tris/acetato, fosfato, succinato, malonato y MES y otros tampones adecuados con adición de sales tales como NaCl o KCl. La fuerza iónica y la concentración salina por medio de las cuales se logra la elución son dependientes del valor pH de la solución tampón. Cuanto más alto sea el valor pH del tampón, tanto más baja será la fuerza iónica necesaria para la elución de las proteínas de la columna.

También la cromatografía de interacción hidrofóbica puede efectuarse con matrices habituales. Son adecuadas matrices tales como las de Butil-, Fenil- u Octil-Sepharose (Amersham Biosciences, entretanto GE Healthcare), Makro-Prep-Methyl o t-Butyl (Bio-Rad) y Fractogel EMD con ligandos propílicos o fenílicos (Merck).

5

En cuanto a los ligandos hidrofóbicos, se trata preferiblemente de grupos butilo, fenilo u octilo, y con particular preferencia se trata de grupos fenilo. Pueden utilizarse los productos de Amersham Biosciences (entretanto GE Healthcare).

10

Matrices y protocolos adecuados para la realización de la cromatografía de interacción hidrofóbica puede sacarlos el experto en la materia de las informaciones de productos de ofertantes tales como Amersham Biosciences (<http://www.amershambiosciences.com>, entretanto GE Healthcare) o Bio-Rad (<http://www.bio-rad.com>).

15

En cuanto a la matriz, se trata preferiblemente de Fenil Sepharose HP (High Performance), que es un producto que es suministrado por Amersham Biosciences (entretanto GE Healthcare).

20

Como tampones para la cromatografía de interacción hidrofóbica son adecuados los tampones habituales que se utilizan también en otras clases de cromatografía. En una forma de realización preferida se utiliza un tampón de citrato. La elución se efectúa ventajosamente mediante el incremento del valor pH. Ha demostrado ser particularmente adecuado un gradiente de pH de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 6,0.

25

Las adicionales condiciones adecuadas para la cromatografía de interacción hidrofóbica pueden sacarse de la correspondiente literatura especializada, como es por ejemplo el manual "Hydrophobic Interaction Chromatography - Principles and Methods" de Amersham Biosciences, de Friburgo, Alemania, 2002.

30

El experto en la materia está en general al corriente de los principios cromatográficos de los que se hace uso en el procedimiento según la invención, estando dichos principios en todo caso detalladamente descritos en los manuales o protocolos de uso corriente de los ofertantes de matrices, columnas y otros medios auxiliares para la cromatografía.

35

La Filtración en Flujo Tangencial (TFF) que se efectúa dentro del marco de una forma de realización de la invención a continuación de la purificación cromatográfica, y en particular a continuación de la única o la última cromatografía de intercambio catiónico, puede hacerse con sistemas y protocolos de TFF tradicionales como los que son por ejemplo ofrecidos por las firmas Millipore y Pall Corporation. En cuanto a la TFF, se trata de una filtración que se hace en calidad de adicional paso de purificación a diferencia de los anteriores pasos de purificación de la cromatografía de intercambio catiónico y de interacción hidrofóbica.

45

El G-CSF que se purifica dentro del marco de la invención es expresado mediante tradicionales métodos de tecnología genética en células huésped. Se trata preferiblemente a este respecto de G-CSF humano. Para la expresión en células *E. coli* están a la venta en el mercado distintos sistemas de expresión. Es por ejemplo adecuada la expresión de G-CSF humano bajo el control de un promotor inducible, y por ejemplo de un promotor inducible por IPTG (IPTG = isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido); véanse, p. ej., Sambrook and Russel, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª edición 2001, Coldspring Harbour Laboratory Press, Coldspring Harbour, NY, Capítulo 15, o protocolos de fabricante de uso corriente, como son p. ej. los de Promega o Stratagene.

50

La fermentación se efectúa según protocolos estándar como los que están descritos en la literatura de patentes y en la literatura científica, por ejemplo en un proceso bietápico que consta de un cultivo discontinuo y un cultivo discontinuo alimentado.

55

La recolección de los llamados cuerpos de inclusión, que contienen el G-CSF sobreexpresado en *E. coli*, y la desagregación de estos cuerpos de inclusión, están descritas en parte en la literatura de patentes sobre la que se ha tratado anteriormente. Sin embargo, se encuentran protocolos adecuados también en obras estándar de la química de las proteínas, así como en manuales de laboratorio. Lo mismo es válido para la solubilización y el repliegamiento, que, como se ha expuesto anteriormente, son objeto de diversas descripciones impresas de patente.

60

La invención se refiere también a preparaciones farmacéuticas que contienen el G-CSF obtenido según la invención. El G-CSF obtenido puede almacenarse ya sea en forma de liofilizado o bien en forma líquida. Dicho factor es administrado por vía subcutánea o por vía intravenosa. Adecuadas sustancias auxiliares en las formulaciones del G-CSF expresado recombinantemente son por ejemplo estabilizadores tales como azúcares y alcoholes de azúcar, aminoácidos y agentes tensioactivos como p. ej. polisorbato 20/80, así como adecuadas sustancias tampón. Ejemplos de formulaciones están descritos en los documentos EP 0 674 525, EP 0 373 679 y EP 0 306 824; véanse también los productos comerciales Neupogen® y Granocyte en la LISTA ROJA 2004.

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes están destinados a aclarar la invención sin limitarla.

5 El G-CSF humano fue expresado en células *E. coli* bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Ejemplos de adecuados sistemas de expresión pueden p. ej. sacarse del manual de laboratorio Sambrook y Russell, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3ª edición 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Capítulo 15, o de protocolos de fabricante de uso corriente, como p. ej. los de Promega o Stratagene.

10 La fermentación se hizo según protocolos estándar como los que están descritos en la literatura de patentes y en la literatura científica, en un proceso bietápico que comprende un cultivo discontinuo y un cultivo discontinuo alimentado. Las bacterias se tuvieron en cultivo por espacio de un periodo de tiempo de 17 a 18 horas, antes de inducir las a la formación del G-CSF recombinante mediante adición de IPTG 1mM. El tiempo de inducción fue de 4,0 horas.

15 La recolección de las bacterias se hizo mediante centrifugación en vasos por espacio de 20 minutos a 5000 g y 4°C. Tras la centrifugación fue desechado el supernatante y las células fueron llevadas de nuevo al volumen de fermentación con tampón (fosfato sódico 20mM, pH 7,0; EDTA 1mM) (EDTA = ácido etilendiaminotetraacético), antes de ser desintegradas mediante tres pases a 800 bares. A continuación se clarificó el lisado mediante separación (separador CSA1, Westfalia, Oelde).

## Concentración de los cuerpos de inclusión

25 La suspensión de los cuerpos de inclusión obtenida mediante la recolección puede en principio ser utilizada directamente para la subsiguiente solubilización. La máxima concentración de proteína alcanzable en el solubilizado queda en este caso ciertamente limitada en gran medida, lo cual puede dar lugar a una limitación durante el plegamiento. Por consiguiente, la suspensión de los cuerpos de inclusión debería ser concentrada mediante centrifugación tras la recolección y el lavado, para alcanzar una alta concentración de proteína en el solubilizado.

30 La suspensión de los cuerpos de inclusión fue centrifugada por espacio de 20 minutos a 10.000 g en una centrifugadora de vasos. La pasta de cuerpos de inclusión obtenida mediante la centrifugación puede ser almacenada por espacio de al menos 12 semanas a -20°C.

## 35 Solubilización

Para poder solubilizar en un periodo de tiempo relativamente corto los pellets de cuerpos de inclusión de mayor tamaño, es además necesaria una trituración mecánica de estos pellets, por ejemplo mediante tratamiento Ultraturax. La pasta de cuerpos de inclusión obtenida mediante centrifugación fue pesada, mezclada con 9,0 ml de tampón de solubilización (Tris 30mM, EDTA 1mM, guanidina-HCl 6,0M, GSH 100mM, pH 8,0) por gramo de cuerpos de inclusión y desmenuzada mediante tratamiento Ultraturax. La preparación fue sometida a agitación vorticial a fondo y fue luego incubada en un mezclador de rodillos o un agitador magnético a temperatura ambiente por espacio de aproximadamente 2 horas.

## 45 Replegamiento

La concentración de proteína en el solubilizado fue determinada con el método de Bradford con BSA (BSA = seroalbúmina bovina) como proteína patrón. Para el plegamiento fue añadida al tampón de replegamiento (Tris 30mM, GSSG 2mM, GSH 2mM, urea 3M, pH 7,5; 4°C) la cantidad de solubilizado que era necesaria para alcanzar en una deseada cantidad de tampón una concentración de proteína de 700 µg/ml. La correspondiente cantidad de solubilizado fue añadida lenta y uniformemente bajo agitación con un agitador magnético, para evitar las concentraciones localmente incrementadas de solubilizado, o respectivamente proteína. La velocidad de aportación y la modalidad de mezcla pueden adaptarse para el volumen de preparación de solubilización que respectivamente se utilice. Una vez concluida la adición del solubilizado, la preparación fue incubada por espacio de al menos 12 horas a 4°C. Durante este tiempo no fue necesaria una mezcla adicional.

## Filtración en lecho profundo

60 A continuación del replegamiento se filtra la preparación de replegamiento, antes de que tenga lugar el primer paso de cromatografía. Se utilizará para la filtración un filtro de lecho profundo, como p. ej. un filtro adecuado de la firma Millipore, de Schwabach. Antes de la filtración se ajusta el valor pH a pH 3,2 con ácido cítrico 2M.

Realización de la primera cromatografía de intercambio catiónico

El primer paso de cromatografía sirve para la captura de la proteína objetivo y separa de la proteína objetivo a los agentes de plegamiento tales como urea, GSH y GSSG, en tanto que los mismos estén presentes en la preparación de plegamiento. En este paso son también separadas las proteínas de las células huésped y las especies proteicas incorrectamente plegadas. Aquí se hace uso de una cromatografía de intercambio catiónico. Se emplea como matriz SP Sepharose XL de Amersham Biosciences (entretanto GE Healthcare). La cromatografía tiene lugar a pH 5,0.

La matriz de SP Sepharose XL fue equilibrada con 1,5 volúmenes de columna de acetato sódico 20mM, pH 5,0. La preparación de plegamiento filtrada fue cargada en la columna y fue a continuación lavada con 1,5 volúmenes de columna de tampón de lavado (acetato sódico 20mM, pH 5,0). A continuación fue eluido de la columna el G-CSF con 3 volúmenes de columna de tampón de elución (acetato sódico 20mM, NaCl 200mM, pH 5,0). La pureza del G-CSF eluido fue determinada mediante HPLC de fase inversa, y era de más de un 80%. El rendimiento, referido a la preparación de plegamiento filtrada, era asimismo de más de un 80%.

Realización de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Partiendo del eluido de la SP Sepharose XL, en el segundo paso de cromatografía tiene lugar una adicional purificación del G-CSF. En particular tiene lugar un considerable empobrecimiento en impurezas emparentadas con el producto. Aquí se hace uso de una cromatografía de interacción hidrofóbica con Fenil Sepharose HP de Amersham Biosciences (entretanto GE Healthcare).

La columna de Fenil Sepharose HP fue primeramente equilibrada con 2 volúmenes de columna de un 12% de tampón B y un 88% de tampón A (tampón B: citrato sódico 20mM, pH 6,7; tampón A: citrato sódico 20mM, pH 2,7, NaCl 110mM). Entonces fue aplicado a la columna el eluido de la columna de SP Sepharose XL, que había sido previamente diluido con 5 volúmenes de tampón A (citrato sódico 20mM, pH 2,7, NaCl 110mM). A continuación la columna fue lavada con 2 volúmenes de columna de un 12% de tampón B y un 88% de tampón A, y se pasó por la misma un gradiente lineal de un 12% a un 90% de tampón B en 5-8 volúmenes de columna. La elución tuvo lugar dentro del marco de este gradiente lineal de pH de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 6,0. La columna fue finalmente enjuagada con 3 volúmenes de columna de un 90% de tampón B y un 10% de tampón A.

Las fracciones de elución fueron verificadas en cuanto a su pureza mediante HPLC de fase inversa, y fueron reunidas las fracciones que tenían una pureza de más de un 95%.

El G-CSF obtenido tras la cromatografía de interacción hidrofóbica tenía una pureza de más de un 96%. El rendimiento del paso de cromatografía de interacción hidrofóbica correspondía a casi un 80%.

Realización de la segunda cromatografía de intercambio catiónico

Partiendo del eluido de la Fenil Sepharose HP, en el tercer paso de cromatografía tiene lugar una adicional purificación del G-CSF hasta una pureza de más del 99%. Se efectúa un considerable empobrecimiento en impurezas emparentadas con el producto. Aquí se hace de nuevo uso de una cromatografía de intercambio catiónico. Se utiliza SP Sepharose FF de Amersham Biosciences (entretanto GE Healthcare).

La columna de SP Sepharose FF fue equilibrada con 3 volúmenes de columna de un 100% de tampón A (fosfato sódico 50mM, pH 5,4). A continuación fue aplicado a la columna el eluido de la cromatografía de interacción hidrofóbica, y se enjuagó la columna con 2 volúmenes de columna de un 100% de tampón A (fosfato sódico 50mM, pH 5,4). La muestra de aplicación contenía NaCl aproximadamente 60mM y tenía un valor pH de 4,0-4,2. La elución se hizo mediante una combinación de gradiente escalonado y lineal de pH. El primer escalonamiento fue a un 10% de tampón P (fosfato sódico 50mM, pH 6,4) y mantuvo esta concentración para 1,5 volúmenes de columna. A continuación de ello siguió un gradiente por 1 volumen de columna de un 10 a un 15% de tampón B (fosfato sódico 50mM, pH 6,4). El G-CSF fue eluido en un gradiente lineal de un 15% a un 35% de tampón B (fosfato sódico 50mM, pH 6,4) por 12,5 volúmenes de columna, teniendo lugar la recogida del eluido con aumento de la absorción a 280 nm. La columna fue finalmente enjuagada con un escalonamiento a un 100% de tampón B (fosfato sódico 50mM, pH 6,4).

Las fracciones de elución fueron verificadas en cuanto a su pureza mediante HPLC de fase inversa, y fueron reunidas las fracciones que tenían una pureza de más de un 99%. El rendimiento total fue del orden de un 80%.

El Met-G-CSF obtenido como resultado de los pasos de cromatografía anteriormente descritos tenía una pureza de al menos un 99,5% según todos los análisis por HPLC (de fase inversa, SEC e IEX).

La determinación de las impurezas arrojó asimismo un muy marcado empobrecimiento en DNA, endotoxina y proteína de células huésped.



## Determinación de la actividad biológica

5 La actividad del G-CSF obtenido mediante el procedimiento según la invención fue determinada mediante un bioanálisis y fue comparada con la de un G-CSF estándar que está disponible comercialmente (Neupogen®). Se empleó para ello la línea celular de ratón NFS-60, que responde al G-CSF. Esta línea celular fue cultivada en medio RPMI 1640 (firma Bachem, de Heidelberg), que contenía 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, Hepes 10mM y piruvato sódico 1,0mM y había sido suplementado con glutamina 2mM, un 10% de FCS, 2-mercaptoetanol 0,05mM y 60 ng/ml de G-CSF.

10 Para el ensayo de actividad, las células fueron lavadas dos veces con medio sin G-CSF, fueron sembradas en una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos, y fueron incubadas por espacio de tres días a 37°C y con un 4,5% de CO<sub>2</sub> con distintas concentraciones del G-CSF purificado y del estándar. Las células fueron a continuación coloreadas con reactivo XTT, y la absorción fue medida a 450 nm en un lector de placas de microtitulación. Quedó de manifiesto que las células que habían sido tratadas con el G-CSF purificado según la invención crecieron exactamente igual de bien como las células que habían sido tratadas con el estándar, por lo cual puede partirse de la base de una igual actividad biológica de ambas muestras de G-CSF.

15 También en los análisis por electroforesis en gel (SDS-PAGE, Western Blot, enfoque isoeléctrico) el Met-G-CSF obtenido tras la purificación cromatográfica se comportó como el Neupogen® utilizado como estándar.

20 Para la determinación del rendimiento de plegamiento, tras la obtención del G-CSF puede efectuarse una HPLC de fase inversa en la que se desnaturaliza la proteína. Debido a los puentes disulfuro, que se mantienen, las especies puenteadas con disulfuro de maneras distintas poseen frecuentemente distintas superficies hidrofóbicas y pueden ser con ello separadas en la HPLC de fase inversa. Por consiguiente, con este método se logra tan sólo la demostración del correcto puenteo con puentes disulfuro. Éste es ciertamente un criterio decisivo y para muchas pequeñas y correspondientemente puenteadas proteínas un criterio que es ya suficiente para establecer el correcto plegamiento. Como adicional método de análisis puede también realizarse una HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

25 30 Materiales y protocolos adecuados para la realización de la HPLC de fase inversa o de la SE-HPLC puede el experto en la materia sacarlos de las informaciones de productos de ofertantes como Vydac (<http://www.vydac.com>) o TOSOH Bioscience (<http://www.tosohbiosep.de>). La determinación del rendimiento de la producción de Met-G-CSF está también descrita en Herman et al. (1996) Pharm. Biotechnol. 9: 303-328. El exacto porcentaje de Met-G-CSF se determina mediante integración del área de pico y conversión a base del coeficiente de extinción.

35 40 Tras la purificación, el G-CSF puede ser analizado con respecto a su cantidad y su actividad. Puede hacerse un análisis cualitativo por medio de un análisis por SDS-PAGE con subsiguiente coloración con Azul Brillante Coomassie o por medio de una HPLC de fase inversa. Como estándar para los análisis puede emplearse un preparado de G-CSF de los que están a la venta en el mercado. Adicionalmente puede realizarse un mapa peptídico o una espectroscopia de masas. La actividad del G-CSF purificado puede determinarse con distintos procedimientos de ensayo biológico, como son los que están descritos por ejemplo en Shirafuji et al. (1989) Exp. Hematol. 17(2): 116-119; Oh-Eda et al. (1990) J. Biol Chem. 265(20): 11432-11435; Stute et al. (1992) Blood 79(11): 2849-2854 y Oshima et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 267(3): 924-927.

45 Todas las cromatografías se realizan por lo demás según las recomendaciones y los protocolos de los ofertantes de las matrices y de las columnas (p. ej. con respecto a la velocidad de flujo, a los volúmenes de columna a utilizar para el lavado y para la elución, a los diámetros y a las alturas de lecho de las columnas, etc.).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de purificación de factor recombinante estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que comprende al menos una cromatografía de intercambio catiónico y al menos una cromatografía de interacción hidrofóbica, donde estos pasos de cromatografía se siguen inmediatamente unos a otros en cualquier orden de sucesión, donde se utiliza G-CSF replegado como material de partida para la purificación cromatográfica y el lote de plegado se somete a una filtración profunda antes de la primera etapa de cromatografía.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende dos cromatografías de intercambio catiónico que son efectuadas respectivamente antes y después de la cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que comprende además una filtración en flujo tangencial a continuación de la última cromatografía de intercambio catiónico.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se efectúa cromatografía de intercambio aniónico alguna.
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se efectúa filtración en gel alguna.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se efectúa HPLC alguna.
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se efectúa cromatografía de afinidad alguna.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se efectúa cromatografía en hidroxiapatita alguna.
- 30 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde para la cromatografía de intercambio catiónico se emplea una matriz sulfopropílica.
- 30 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde para la cromatografía de interacción hidrofóbica se usan grupos fenilo como ligandos hidrofóbicos.
- 35 11. Procedimiento de fabricación de una preparación farmacéutica que contiene G-CSF recombinante y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tales como tampones, sales y estabilizadores, que comprende un procedimiento de purificación de G-CSF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.