

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 087**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2015 PCT/IN2015/050066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2015 E 15822758 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 3169697**

54 Título: **Un proceso novedoso para la purificación de RHU-GCSF**

30 Prioridad:

14.07.2014 IN 2289MU2014

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

06.03.2025

73 Titular/es:

**GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.
(100.00%)**

**P-1 IT-BT Park MIDC Phase-2
Hinjawadi, Pune - 411057, IN**

72 Inventor/es:

**RAGHUWANSHI, ARJUN;
SINGH, SHRAWAN KUMAR;
THAKER, NIDHIBEN;
SHANKAR, SHAGUN;
KARDILE, PAVAN y
SINGH, SANJAY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 002 087 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

Un proceso novedoso para la purificación de RHU-GCSF

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos pegilado (rHu-GCSF).

10 Antecedentes de la invención

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF o GCSF) es una glucoproteína que estimula la médula ósea para que produzca granulocitos y los libere al torrente sanguíneo. En la bioterapéutica, el G-CSF demostró su eficacia en el tratamiento de infecciones neonatales, transfusión de granulocitos en pacientes con neutropenia, en infecciones graves y sepsis, en leucemias mieloides agudas, lo que lo convirtió en un fármaco biofarmacéutico esencial. Comercialmente, se dispone de dos formas de G-CSF humano recombinante que incluyen el G-CSF derivado de *Escherichia coli* (*E. coli*), que no tiene cadena de azúcar (G-CSF no glucosilado; filgrastim; Neupogen, Amgen) y el G-CSF derivado de células de ovario de hámster chino (G-CSF glucosilado; lenograstim, Chugai Pharma UK Ltd).

El filgrastim es una proteína hidrosoluble de 175 aminoácidos con un peso molecular de 18.800 daltons. El filgrastim se obtiene de la fermentación bacteriana de una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) transformada con un plásmido modificado por ingeniería genética que contiene el gen del G-CSF humano. Las actividades biológicas del G-CSF incluyen la estimulación y diferenciación de "células madre" progenitoras en una variedad de líneas de células sanguíneas, la estimulación de la proliferación de líneas de células sanguíneas diferenciadas y la estimulación de la diferenciación final de células sanguíneas maduras a partir de líneas de células proliferadas.

La producción de proteínas terapéuticas recombinantes utilizando microorganismos como sistema hospedero es a menudo difícil porque la expresión de alto nivel de las proteínas recombinantes conduce a la formación de cuerpos de inclusión (IB) que son agregados insolubles, así como las proteínas recombinantes están presentes en forma biológicamente inactiva que requieren pasos adicionales cadena abajo para hacer la proteína biológicamente activa y adecuada para los pasos de purificación posteriores. Además, a menudo es difícil recuperar la proteína de los IB debido a los problemas relacionados con los pasos iniciales de recuperación, solubilización y renaturalización. La producción de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión puede ser viable si se puede desarrollar un proceso cadena abajo sencillo y rentable.

La creciente demanda de productos biofarmacéuticos ha catalizado el avance tanto cadena arriba como cadena abajo del procesamiento de proteínas bioterapéuticas. En los últimos años, se han producido mejoras significativas en los títulos de los cultivos celulares, lo que ha desplazado el centro del desarrollo biofarmacéutico hacia la mejora de las preocupaciones comerciales del procesamiento cadena abajo. Los bioterapéuticos proteicos suelen producirse junto a una variedad de impurezas. Entre ellas se incluyen las impurezas relacionadas con las células hospedadoras, las impurezas del proceso y las impurezas/variantes relacionadas con el producto. De ellas, las impurezas/variantes relacionadas con el producto son difíciles de eliminar ya que sus propiedades fisicoquímicas son muy similares a las del propio producto, sin embargo, estas impurezas/variantes pueden afectar significativamente a la actividad biológica del agente terapéutico objetivo.

Las variantes/impurezas mencionadas incluyen diferentes formas de oxidación de los residuos de metionina (Met) del G-CSF. Se sabe que la proteína G-CSF contiene cuatro residuos de metionina en las posiciones Met1, Met122, Met127 y Met138. Se observa que en diferentes condiciones oxidativas, cada uno de los cuatro residuos de metionina se oxida a diferentes velocidades [Met1>Met138> Met127>Met122] que pueden resolverse mediante cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) de fase inversa al G-CSF nativo. Además, las impurezas como la forma reducida y agregada del G-CSF formada por el plegamiento incorrecto del G-CSF nativo muestran picos adicionales en el cromatograma RP-HPLC. Estas y otras formas de G-CSF no deseadas conducen a una reducción de la actividad biológica del G-CSF nativo. Por lo tanto, es crucial en el desarrollo farmacéutico de proteínas terapéuticas eliminar dichas impurezas durante el proceso de purificación. Además, en el cromatograma RP-HPLC, también se observa un pico adicional de la variante N-formil-metionina del G-CSF junto con el G-CSF nativo que posee la misma actividad biológica que el de la forma nativa, pero a veces puede provocar una respuesta inmunogénica en el paciente. La variante N-formil-metionina es el resultado de la retención parcial del grupo formilo por el gen *def* de *E. coli* debido al alto nivel de expresión de las proteínas recombinantes. Esta variante también es una impureza y debe eliminarse. Por ello, su eliminación eficaz es un objetivo clave para las plataformas de purificación para la producción de proteínas terapéuticas a partir de bacterias.

Para eliminar las impurezas antes mencionadas relacionadas con el producto, se utilizaron diversas técnicas cromatográficas en el estado de la técnica, tales como la cromatografía multimodal, que implica el uso de resinas que ofrecen una combinación de interacciones entre el producto y la resina, como la hidroxiapatita (HA) (intercambio catiónico e interacción por afinidad metálica), Capto MMC (intercambio catiónico e interacciones

hidrófobas), Capto Adhere (intercambio aniónico e interacciones hidrófobas) y HEA/PPA. Todas estas resinas son eficaces y proporcionan diferentes selectividades, pero son costosas en comparación con las resinas de intercambio iónico e hidrófobas convencionales, lo que aumenta el coste del producto final. Además, la optimización de los parámetros del proceso con resinas multimodo es un proceso tedioso y largo que aumenta el tiempo de desarrollo del proceso y, posteriormente, el tiempo de funcionamiento de la cromatografía.

En los últimos años, el desarrollo y la fabricación de G-CSF terapéutico implican numerosos esquemas de purificación. Por ejemplo, WO1987/03689 divulga el uso de la cromatografía de inmutofinidad para el aislamiento y la purificación del G-CSF recombinante, que no era un enfoque bien aceptado para la fabricación comercial, ya que podía plantear sus propios problemas normativos. Además, el coste de los medios de cromatografía de inmutofinidad era muy elevado en comparación con las matrices de cromatografía convencionales debido al uso de anticuerpos monoclonales para su preparación.

La patente europea EP2341061, divulga un proceso de purificación que implica una serie de cuatro pasos cromatográficos, que comprenden dos cromatografías de filtración en gel, una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de intercambio aniónico para la preparación de G-CSF.

Otra patente europea EP1904522, divulga un proceso de purificación utilizado para la purificación de G-CSF que implica principalmente tres pasos de cromatografía, específicamente, dos cromatografías de intercambio catiónico y una cromatografía de interacción hidrofóbica.

WO 2001/04154 divulga un proceso de purificación que incluye una cromatografía de interacción hidrofoba, una cromatografía de hidroxil apatita y una cromatografía de intercambio catiónico para purificar el G-CSF. En el caso del G-CSF derivado de *E. coli*, la solubilización de los cuerpos de inclusión y el replegamiento del G-CSF son pasos adicionales a tener en cuenta. A escala comercial, debido al proceso de varios pasos, el rendimiento final disminuye en gran medida. De ahí que se requiera un proceso simplificado con menos pasos y mayores rendimientos en menos tiempo.

En WO 2008/096370 A2 se divulga un proceso de purificación para el factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante (G-CSF).

En CN 102 485 742 A se divulga la preparación y purificación de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante modificado con polietilenglicol simple (PEG-rhG-CSF).

En CN 102 234 310 A se divulga un medio de cromatografía catiónica MacroCap Sp que puede inducir sensiblemente la relación de distribución de la carga superficial de las proteínas.

En CN 1 663 962 A se divulga una cromatografía de un solo paso que se utiliza para obtener rhG-CSF y rhG-CSF modificado químicamente con polietilenglicol.

En EP 2 341 061 B1 se divulga un proceso de aislamiento y purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a partir de un microorganismo productor de G-CSF.

En WO 2012/057529 A2 se divulga un método para purificar una gran cantidad de factores estimulantes de colonias de granulocitos humanos (hG-CSF) a partir de una *E. coli* recombinante.

En WO 2012/021088 A1 se divulgan conjugados fisiológicamente activos del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Herman AC et al. divulga en FORMULATION, CHARACTERIZATION, AND STABILITY OF PROTEIN DRUGS: CASE HISTORIES, VOLUMEN 9 DE LA SERIE BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA, vol. 9, 2002, páginas 303-328, la caracterización de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante.

En la Solicitud de patente de India 2692/MUM/2010 se divulga un proceso para la producción y purificación de PEG-G-CSF.

En la técnica anterior, los procesos de purificación descritos son complicados, largos e incluyen múltiples pasos de cromatografía para obtener el G-CSF purificado. Además, ninguno de los procesos anteriores revela una estrategia básica, prudente y financieramente práctica para la producción de G-CSF que pueda garantizar la producción constante de un producto estable a escala industrial. Posteriormente, para conquistar los importantes problemas relacionados con la producción de G-CSF, actualmente se ha desarrollado y divulgado en la presente invención un proceso sencillo, escalable, comercialmente viable y más estable para una alta recuperación de G-CSF. El proceso de la presente invención comprende pasos de proceso cadena abajo optimizados, ortogonales, robustos y escalables para la producción de G-CSF a escala industrial con mayor rendimiento y pureza.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un proceso cadena abajo altamente eficaz, robusto, económico y escalable para la purificación de G-CSF pegilado humano recombinante.

5 Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un proceso cadena abajo novedoso, escalable e industrialmente viable para la purificación de G-CSF pegilado humano recombinante.

10 Breve descripción de los dibujos

A continuación, se proporciona una lista de las figuras de los dibujos adjuntos:

- 15 Figura 1: Representa el perfil RP-HPLC del IB solubilizado de rHu-GCSF.
 Figura 2: Representa el perfil RP-HPLC de la disolución replegada acidificada de rHu-GCSF.
 Figura 3: Representa el perfil SDS-PAGE de las muestras de rHu-GCSF solubilizadas, replegadas y acidificadas.
 Figura 4: Representa el perfil RP-HPLC de la cromatografía de intercambio iónico-I eluida.
 Figura 5: Representa el perfil RP-HPLC del eluido de interacción hidrofóbica
 20 Figura 6: Representa el perfil SDS-PAGE de la proteína rHu-GCSF purificada.
 Figura 7: Representa el perfil RP-HPLC de la proteína rHu-GCSF purificada.
 Figura 8: Representa el perfil RP-HPLC de la proteína PEG-GCSF purificada.
 Figura 9: Representa el perfil SDS-PAGE de la proteína PEG-GCSF purificada.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención divulga un proceso para el aislamiento y la purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinante pegilado (G-CSF) a partir de un microorganismo productor de G-CSF. Las células hospederas transformadas o transfectadas con los plásmidos recombinantes o los vectores virales de ADN expresan G-CSF humano biológicamente activo o una variante del G-CSF humano modificada por ingeniería genética. La proteína expresada se purifica utilizando el novedoso método descrito en la presente invención. Las secuencias de ADN que codifican la totalidad o una parte del G-CSF incluyen la incorporación de codones "preferidos" para la expresión por hospederos no mamíferos seleccionados. El gen GCSF puede insertarse en un plásmido lanzadera y amplificarse. El vector diseñado que comprende el marco abierto de lectura del GCSF puede transformarse entonces en una célula hospedera químicamente competente y aislarse.

35 A continuación, las células pueden cultivarse en el fermentador a una temperatura controlada que está en el rango de 20 °C a 40 °C a un pH de 5-8, más preferiblemente de 25 °C a 30 °C a un pH de 7,0-7,5. La biomasa así obtenida puede someterse al novedoso proceso de aislamiento y purificación descrito en la presente solicitud para obtener GCSF purificado.

40 El procedimiento de aislamiento y purificación de G-CSF pegilado de acuerdo con la invención comprende los pasos i. a vii. definidos en la reivindicación 1.

45 en donde el rendimiento del proceso para obtener GCSF purificado a partir de cuerpos de inclusión solubilizados está en el rango de 50 a 70% y la pureza del G-CSF analizado por SEC-HPLC no es inferior a 98%;
 en donde la suma de las impurezas tal como el agregado no sea superior a 2%. La pureza del G-CSF analizada por RPHPLC no es inferior a 96,5%;
 en donde la suma de GCSF oxidado, GCSF reducido y GCSF f-met no es superior a 3,5 %;
 50 en donde el rendimiento del proceso de producción de PEG-GCSF a partir de GCSF está en el rango de 60 a 75% y la pureza del PEG-GCSF analizada por SEC-HPLC no es inferior a 95%.

i. Producción de rHu-GCSF por fermentación de alta densidad celular de *E.coli* y aislamiento de cuerpos de inclusión

55 La purificación del GCSF de la presente invención puede llevarse a cabo mediante la producción de rHu-GCSF separando las fracciones solubles y particuladas del caldo fermentado y recolectando la biomasa. La separación puede realizarse preferiblemente por centrifugación, filtración, más preferiblemente por centrifugación.

60 Las células separadas pueden lisarse aún más utilizando una disolución amortiguadora de lisis con un pH de 7 a 9, más preferiblemente el pH de la disolución amortiguadora de lisis está entre pH 7,5-8,5. La lisis celular puede ir seguida del aislamiento de los cuerpos de inclusión.

65 El aislamiento puede realizarse preferiblemente de forma individual o combinada utilizando instrumentos seleccionados del grupo formado por el sonicador a escala de laboratorio, el homogeneizador celular de alta presión, la centrifugación, la filtración, más preferiblemente una combinación del sonicador a escala de laboratorio y el homogeneizador celular de alta presión.

ii. lavado de los cuerpos de inclusión obtenidos en el paso (i)

Los cuerpos de inclusión aislados se lavan además con disoluciones amortiguadoras seleccionadas preferiblemente del grupo que consiste en la disolución amortiguadora Tris-EDTA-Tritón, la disolución amortiguadora Tris-EDTA-DOC, la disolución amortiguadora Tris-NaCl-Urea, la disolución amortiguadora Tris, TritonX-100; preferiblemente, la disolución amortiguadora es una mezcla de Tris-EDTA, Urea, NaCl y TritonX-100. La concentración de Tris está presente en un rango de 30 - 50 mM, EDTA en un rango de 3 - 7 mM, Urea en un rango de 0,1 - 0,5 M, NaCl en un rango de 1 - 2 M, y Triton X 100 en un rango de 0,8 - 1,5 %. El pH de la disolución amortiguadora de lavado se mantiene en el rango de 7,5-8,5. La temperatura de la disolución amortiguadora de lavado se mantiene en el rango de 20 a 25°C, y el tiempo de incubación está en el rango de 60 a 90 minutos.

La selección del agente lítico y de la disolución amortiguadora de lavado de la presente invención son tales que permiten una mayor recuperación de los cuerpos de inclusión.

iii. Solubilización de los cuerpos de inclusión obtenidos en el paso (ii) para liberar el G-CSF humano recombinante (rHu-G-CSF)

La solubilización de los cuerpos de inclusión bacterianos es un paso crítico que si no se optimiza adecuadamente podría afectar al rendimiento de los pasos posteriores del proceso y también a la calidad de la proteína purificada. Los cuerpos de inclusión aislados se solubilizan en una mezcla solubilizante de urea, disolución amortiguadora y un agente reductor a un pH alcalino.

Dicho agente reductor es la cisteína y está presente en un rango de 20 a 100 mM. El agente reductor puede añadirse a un pH en el rango de 8 a 11 durante 45 a 120 minutos, más preferiblemente a un pH de 9 a 10 durante 60 minutos. La selección del agente reductor de la presente invención es tal que la solubilización se consigue en 2-3 horas. El agente reductor puede añadirse preferiblemente después de 60 min de solubilización y la solubilización se continúa durante unos 60 minutos en presencia del agente reductor. Asimismo, la concentración del agente reductor seleccionado se optimiza de tal manera que debería eliminar la necesidad de añadir cualquier agente reductor en la disolución amortiguadora de replegamiento.

La disolución amortiguadora comprende una mezcla de Tris, EDTA, urea, en donde la urea está presente en un rango de 6 - 8 M, el Tris está en un rango de 20 - 50 mM, y el EDTA está en un rango de 2-7 mM, y el pH de la disolución amortiguadora se mantiene en un rango de 9,5 - 10,5.

La disolución de cuerpos de inclusión solubilizada se clarifica por centrifugación a 8.000-15.000 g, preferiblemente durante 10-30 minutos, más preferiblemente a 10.000-12.000 g durante 30 minutos.

La pureza del IB solubilizado de rHu-GCSF puede estimarse mediante el perfil RP-HPLC representado en la Figura 1. La pureza del G-CSF liberado está en el rango de 25 a 50%.

iv. Replegamiento de la proteína GCSF obtenida en el paso (iii)

La disolución amortiguadora utilizada para volver a plegar las proteínas suele estar compuesto de sustancias químicas, tales como clorhidrato de guanidinio y arginina, para aumentar la conductividad de la disolución de replegamiento. El procesado de esta disolución de replegamiento suele requerir la necesidad de realizar un paso de ultrafiltración/diafiltración previo al paso de cromatografía de intercambio iónico, lo que añade tiempo, complejidad y gastos adicionales a las operaciones del proceso cadena abajo. Teniendo en cuenta estas limitaciones, el proceso de replegamiento de la invención actual se desarrolla de tal manera que la disolución de replegamiento puede cargarse directamente en la cromatografía de intercambio iónico sin ningún paso de acondicionamiento adicional.

Dado que el replegamiento de proteínas se realiza generalmente a una concentración muy baja de proteínas, necesita un gran volumen de disolución amortiguadora de replegamiento. El componente más utilizado de la disolución amortiguadora de replegamiento es la arginina, que no sólo es un ingrediente muy caro para su uso en grandes volúmenes de disoluciones amortiguadoras de replegamiento, sino que también aporta una alta conductividad a la disolución de replegamiento, lo que la hace incompatible para su carga en la cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, la presente invención utiliza un enfoque de replegamiento novedoso e inventivo para contribuir a un mayor rendimiento global del proceso cadena abajo. Asimismo, los componentes novedosos reivindicados en la presente invención hacen que el proceso sea económico y evitan operaciones unitarias adicionales en el proceso.

Para el replegamiento, la disolución de cuerpos de inclusión clarificada y solubilizada se diluye en una disolución amortiguadora de replegamiento que contiene urea y sorbitol y que contiene un agente oxidante.

Dicho agente oxidante es la cistina.

La cantidad de cistina está en el rango de 0-3 mM.

5 La selección del agente oxidante de la presente invención es tal que se consigue un mayor rendimiento de replegamiento de 85 a 95% y una pureza RP-HPLC de 40 a 70%.

El replegamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 12-18 horas.

10 La disolución de proteína replegada se acidifica en presencia de un agente acidificante. Dicho agente acidificante se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, más preferiblemente el agente acidificante es ácido clorhídrico.

El pH de la disolución replegada acidificada se ajusta en un rango de 3,5 a 4,5 mantenido durante 30-45 min.

15 El rendimiento del paso de replegamiento preferiblemente está en el rango de 60-85%.

La pureza del GCSF replegado acidificado puede estimarse mediante el perfil RP-HPLC representado en la Figura 2.

20 La disolución solubilizada, la disolución replegada, la disolución acidificada y el eluido de la cromatografía de intercambio iónico pueden someterse a SDS-PAGE para caracterizar las impurezas de bajo y alto peso molecular asociadas al rHu-GCSF, como se representa en la Figura 3.

25 v. Clarificación y purificación de la proteína G-CSF acidificada obtenida en el paso (iv).

La disolución de proteína G-CSF replegada acidificada puede someterse opcionalmente a filtración y/o centrifugación para eliminar cualquier precipitado y partículas que puedan formarse antes de someterla a cromatografía para su purificación.

30 El G-CSF puede precipitarse durante el proceso de replegamiento y puede causar turbidez/nebulosidad, lo que lleva a problemas de clarificación tras el replegamiento. El grado de precipitación depende de la solubilización seguida de la estrategia de replegamiento. En muchos de estos casos, la clarificación de la disolución proteínica implica pasos de filtración debido al amplio rango de tamaños y tipos de partículas presentes en la corriente del proceso.

35 Es preferible avanzar hacia un único paso de clarificación, eliminación de partículas y/o reducción de la biocarga para minimizar el coste total de producción. Además, resulta ventajoso disponer de unas instalaciones de fabricación más pequeñas, flexibles y rentables, lo que depende en gran medida de la selección de las operaciones unitarias del proceso y del tamaño de los equipos de proceso.

40 Dicha clarificación puede seleccionarse del grupo que comprende ultrafiltración, diafiltración, microfiltración, filtración en profundidad, filtración de flujo tangencial, filtración de flujo normal y centrifugación, preferiblemente la microfiltración y la centrifugación. Dicho proceso de centrifugación puede seleccionarse del modo discontinuo y del modo continuo, preferiblemente el proceso de centrifugación es continuo.

45 Para purificar las proteínas se utilizan diversas técnicas de separación en función de sus propiedades físicas y químicas.

50 Las formas metionina oxidada, reducida y f-Met de un producto nativo de proteína GCSF recombinante son ciertas variantes del producto, que se consideran impurezas asociadas al sistema de expresión como *E.coli*. Dichas variantes del producto difieren de la proteína nativa en sus aspectos estructurales y funcionales, y pueden provocar una pérdida de actividad biológica y de respuesta inmunogénica en los pacientes. La presente invención da a conocer un proceso de purificación en dos pasos de cromatografía para la eliminación selectiva de estas variantes del producto. Puede obtenerse una selectividad única en la separación de variantes de productos estrechamente relacionados utilizando gradientes de elución combinados basados en el pH y la sal en cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica. La eliminación completa de las impurezas relacionadas con el proceso también se consigue en el proceso de purificación en dos pasos.

60 En la actualidad, la cromatografía de intercambio iónico (CEI) constituye un pilar de los procesos de purificación de fármacos biofarmacéuticos debido a su gran capacidad y escalabilidad; sin embargo, la eliminación selectiva de las distintas impurezas/variantes del producto es algo limitada.

65 En la presente invención, las proteínas pueden purificarse mediante cromatografía de intercambio iónico seguida de cromatografía de interacción hidrofoba, en donde las impurezas relacionadas con el proceso y el producto se eliminan hasta límites aceptables utilizando una combinación de gradientes de pH y sal con altos rendimientos del proceso.

La disolución replegada acidificada puede purificarse sometiéndola a cromatografía de intercambio iónico. Dicha cromatografía de intercambio iónico puede ser cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico, más preferiblemente cromatografía de intercambio catiónico, más preferiblemente cromatografía de intercambio catiónico débil. La cromatografía de intercambio catiónico para purificación comprende además una fase estacionaria y una fase móvil.

La fase estacionaria de la cromatografía de intercambio catiónico puede seleccionarse del grupo que comprende SP-Sefarosa FF, CM-Sefarosa FF, SP-Sefarosa HP, Fractogel SO3, Fractogel SE Hi Cap, más preferiblemente CM-Sefarosa FF.

La fase móvil o disolución amortiguadora de unión de la cromatografía de intercambio catiónico se selecciona del grupo que comprende acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio, ácido ortofosfórico o una mezcla, preferiblemente una mezcla que comprenda acetato de sodio y ácido acético. La concentración de la fase móvil o disolución amortiguadora de unión es de 20 - 50 mM, y el pH está en el rango de 3,5 - 4,5; La proteína GCSF se eluye fuera de la columna de intercambio catiónico utilizando la disolución amortiguadora compuesta por una mezcla de acetato de sodio, ácido acético y NaCl, a un pH en el rango de 4,0 - 6,0, preferiblemente en el rango de 4,5 - 5,6. El modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y/o combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado.

Las disoluciones replegadas y acidificadas que contienen G-CSF pueden aplicarse a medios de intercambio catiónico en condiciones ácidas, por ejemplo, a pH 3,0 a pH 5,0, y eluirse de los medios a pH débilmente ácidos a débilmente básicos, por ejemplo, de pH 4,0 a pH 8. El G-CSF puede eluirse del medio de intercambio catiónico en condiciones ligeramente ácidas, utilizando un gradiente creciente de NaCl u otra sal, por ejemplo, 0-200 mM NaCl, en 40-50 mM de acetato de sodio, pH 5,4. Alternativamente, el rHu-G-CSF puede eluirse del medio de intercambio catiónico en condiciones ligeramente básicas, utilizando 40-50 mM de acetato de sodio a pH 5,6- 6,2 con o sin utilizar ninguna sal.

La elución puede realizarse preferiblemente a una tasa de flujo de 100-250 cm/h, más preferiblemente de 150-200 cm/h. La capacidad de unión dinámica puede estar preferiblemente entre 10-20 mg/ml, más preferiblemente entre 15-18 mg/ml.

El rendimiento del paso de cromatografía de intercambio iónico puede estar preferiblemente en el rango de 70-98 %, más preferiblemente 90-98 %.

La selección de los medios de intercambio catiónico de la presente invención puede ser tal que el medio se acondicione utilizando un pequeño volumen de disolución replegada y que evite el uso de una operación unitaria adicional como la cromatografía de intercambio de disolución amortiguadora o la diafiltración mediante TFF. La pureza del eluato de intercambio iónico puede estimarse mediante un perfil RP-HPLC como el representado en la Figura 4. La pureza RP-HPLC del G-CSF obtenida en el paso de cromatografía de intercambio de cationes está en el rango de 90% a 97%.

El eluido de cromatografía de intercambio iónico que contiene rHu-G-CSF puede aplicarse a medios de interacción hidrofóbica en condiciones ácidas, preferiblemente en el rango de pH 2,0 a pH 7,0, más preferiblemente de pH 4,0 a pH 6,0.

El eluido de la cromatografía de intercambio iónico se diluye con sulfato de amonio para garantizar que la concentración efectiva de sulfato de amonio en la disolución diluida se mantiene en el rango de 0,5 - 1,5 M, preferiblemente en el rango de 0,7 - 1,0 M; El medio de interacción hidrofóbica o fase estacionaria de la presente invención puede seleccionarse del grupo que comprende fenil Sefarosa FF, butil Sefarosa, Nuviac-Prime, HEA hiper celular, PPA hiper celular, fenil Sefarosa HP, MEP hiper celular y Cpto Adhere, preferiblemente fenil Sefarosa FF.

La fase móvil o disolución amortiguadora de unión de la cromatografía de interacción hidrofóbica comprende una mezcla de acetato de sodio, ácido acético y sulfato de amonio a un pH en el rango de 4,5 - 6, más preferiblemente el pH está en el rango de 5,2 - 5,8

La elución puede realizarse preferiblemente a una tasa de flujo de 95-300 cm/h, más preferiblemente a 100-250 cm/h.

La proteína GCSF purificada se eluye de la fase estacionaria de la cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando una fase móvil que comprende acetato de sodio y ácido acético a un pH en el rango de 4 - 6, más preferiblemente en el rango de 4,0 - 5,0. El modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado.

El eluido se obtiene a una tasa de flujo de 95-300 cm/h, preferiblemente de 100-250 cm/h. El rendimiento del paso de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) puede estar preferiblemente en el rango de 80 a 90%. La pureza de la proteína G-CSF obtenida mediante cromatografía de interacción hidrofóbica está en un rango de 96,5% - 99,5%.

5 La selección de la segunda cromatografía de la presente invención puede ser tal que se consiga una pureza final del G-CSF que se ajuste a la calidad requerida para la preparación farmacéutica del rHu-GCSF. La pureza del eluido HIC puede estimarse mediante el perfil RP-HPLC representado en la Figura 5.

10 La carga HIC, lavado-I puede someterse a SDS-PAGE para caracterizar las impurezas de bajo y alto peso molecular asociadas al rHu-GCSF.

15 Los resultados indican que la recuperación del producto tras la purificación en dos pasos de cromatografía es de hasta 50-70,0%, con niveles de pureza superiores a 98,0%. La eliminación selectiva de diversas variantes del producto mediante la elución combinada basada en el pH y la sal, y la eliminación de las impurezas de las células hospedadoras mediante la selección ortogonal de los pasos cromatográficos se encuentran entre las características novedosas e inventivas del proceso de la presente invención.

20 El eluido de la cromatografía de interacción hidrófoba puede intercambiarse opcionalmente en disolución amortiguadora de formulación. El G-CSF replegado en la disolución amortiguadora de formulación que contiene G-CSF biológicamente activo puede filtrarse estérilmente para producir el G-CSF humano recombinante de calidad farmacéutica que tiene una concentración final en el rango de 0,5 a 0,9 mg/ml, más preferiblemente de 0,85 a 0,90 mg/ml. La pureza de la proteína purificada final puede estimarse mediante el perfil RP-HPLC representado en la Figura 6.

25 El G-CSF humano recombinante obtenido por el proceso descrito en la presente invención puede ser útil en el tratamiento de condiciones médicas relacionadas con la hematología y la oncología. Por ejemplo, la neutropenia, la leucemia mieloide aguda y una variedad de infecciones en humanos, animales, aves de corral, cerdos, caballos, así como perros y gatos son tratables con la administración del G-CSF de la invención actual.

30 vi. Conjugación del G-CSF purificado obtenido en el paso (v) con PEG.

El rHu-GCSF purificado (principio activo) se conjuga con un polietilenglicol en una disolución amortiguadora adecuada a un pH ácido.

35 Dicha disolución amortiguadora puede seleccionarse preferiblemente del grupo que comprende el acetato de sodio, el acetato de fosfato, el fosfato de hidrógeno de potasio, el fosfato de dihidrógeno de potasio, el fosfato de hidrógeno de disodio, el ftalato de hidrógeno de potasio, el tetraborato de sodio, más preferiblemente el acetato de sodio.

40 El pH de dicha reacción de conjugación puede estar preferiblemente en el rango de pH 5,0 a 5,8.

Dicha reacción de conjugación puede llevarse a cabo añadiendo de 3 a 5 veces más cantidad (p/p) de PEG aldehído 20 kD en comparación con el rHu-GCSF purificado utilizado para la reacción de conjugación.

45 Dicha reacción de conjugación puede llevarse a cabo opcionalmente en presencia de un agente reductor seleccionado preferiblemente del grupo que comprende cianoborohidruro de sodio, triacetoxi borohidruro de sodio, borohidruro de sodio, ditionito de sodio, hidrosulfito de sodio, más preferiblemente cianoborohidruro de sodio.

50 El agente reductor puede añadirse preferiblemente a una concentración en el rango de 10 a 30 mM, más preferiblemente 20 mM. La mezcla de reacción puede agitarse a temperatura ambiente de 12 a 18 horas, más preferiblemente de 12 a 16 horas. El rendimiento del rHu-GCSF monopegilado está preferiblemente en el rango de 65 a 85 %, más preferiblemente de 70 a 75 %. La mezcla de reacción de rHu-GCSF monopegilado puede almacenarse preferiblemente entre 1 y 10 °C para su posterior purificación, más preferiblemente entre 2 y 8 °C.

55 vii. Purificación del G-CSF conjugado (pegilado) obtenido del paso (vi) mediante cromatografía de intercambio catiónico

60 La mezcla de G-CSF pegilado conjugado puede diluirse con disolución amortiguadora de equilibrio y el pH se ajusta en el rango de 3,5-5,0, más preferiblemente el pH puede ajustarse a 4,0-4,5. Dicha muestra diluida se somete a cromatografía de intercambio catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico comprende fase estacionaria o medio de intercambio catiónico y fase móvil o disolución amortiguadora de unión, la fase estacionaria o medio de intercambio catiónico se selecciona del grupo que comprende MacroCap-SP y SP Sefarosa FF, Fractogel SO3, preferiblemente la fase estacionaria es MacroCap-SP. La disolución amortiguadora de elución o fase móvil de elución se selecciona entre el acetato de sodio, el ácido acético, el cloruro de sodio y sus mezclas, preferiblemente la fase móvil es una mezcla. La concentración de acetato de sodio está en el rango de 10-50 mM

y la de cloruro de sodio en el rango de 0,25 a 0,75 M. El pH de la disolución amortiguadora de elución o de la fase móvil de elución está presente en el rango de 3,5-5, preferiblemente el pH es de 4,0- 4,5. El modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado. El rendimiento del GCSF monopegilado obtenido por cromatografía de intercambio catiónico está en el rango de 80 a 95 %, preferiblemente el rango es de 85 a 90 %.

El r-Hu-GCSF monopegilado purificado puede recuperarse y eluirse de la columna realizando la elución a una tasa de flujo de 100-150 cm/h, más preferiblemente 100 cm/h.

Todas las muestras de cromatografía, incluyendo la carga, el flujo, los lavados y la elución, pueden analizarse utilizando los siguientes métodos analíticos:

- a) RP-HPLC para la identificación y el análisis de pureza, como se representa en la Figura 8.
- b) SDS PAGE (reducida) para el análisis de pureza, tal como se representa en la Figura 9.
- c) Proteína total por Bradford

La fracción eluida objetivo puede intercambiarse en disolución amortiguadora de formulación predefinida de pegfilgrastim que contenga acetato de sodio y sorbitol a un pH preferiblemente en un rango entre pH 3,0-4,0, más preferiblemente pH 4,0-4,5.

El rHu-GCSF monopegilado purificado puede concentrarse aún más hasta 9-12 mg/ml mediante una membrana de ultrafiltración de 10 kDa, más preferiblemente el rHu-GCSF monopegilado purificado puede concentrarse en un rango de 11,0-11,5 mg/ml.

El retentado final del TFF así obtenido puede filtrarse estérilmente con 0,2 micras para obtener un filtrado de la calidad prevista y diluirse con disolución amortiguadora de formulación durante la filtración estéril para recuperar la retención de producto, la filtración puede optimizarse para recuperar el producto a una concentración de pegfilgrastim de >10 mg/ml.

El rHu-GCSF monopegilado purificado final producido puede almacenarse preferiblemente a una temperatura comprendida entre 1 y 10 °C, más preferiblemente entre 2 y 8 °C hasta su uso posterior.

La disolución concentrada final de PEG-GCSF puede analizarse mediante los siguientes métodos analíticos para comprobar si la disolución concentrada de PEG-GCSF o el principio activo de PEG-GCSF o el principio activo a granel de PEG-GCSF o el API de PEG-GCSF cumplen las especificaciones.

- a) Apariencia y pH
- b) Comprobación de la identidad y la pureza mediante SDS PAGE, Western blot, análisis de la secuencia N-terminal, enfoque isoeléctrico (IEF) y mapa peptídico.
- c) Determinación de HCP utilizando ELISA,
- d) Bioactividad según especificación.
- e) Cuantificación del ADN de la célula hospedera mediante q PCR.
- f) Cuantificación de endotoxinas mediante la prueba de LAL.
- g) Agregado por HPLC de exclusión por tamaño.
- h) Impurezas relacionadas por RP-HPLC.
- i) Esterilidad según especificación.

Tras un análisis exhaustivo y una comparación biofísica con el producto innovador, puede concluirse que el producto purificado mediante el proceso descrito en la presente invención es GCSF monopegilado N-terminal altamente similar al producto innovador con un rendimiento global del proceso superior a 65 %.

Los fármacos rHu-GCSF y rHu PEG-GCSF obtenidos mediante el proceso descrito en la presente invención se caracterizan exhaustivamente utilizando métodos analíticos monográficos e internos de última generación. El producto rHu-GCSF obtenido mediante el proceso de la presente invención cumple los siguientes atributos críticos de calidad, pero sin limitarse a los resultados de atributos críticos de calidad expuestos en detalle en la Tabla 1 y la Tabla 2:

Tabla 1: Calidad del rHu-GCSF obtenido mediante el proceso de la presente invención

Atributo crítico de calidad (CQA)	Resultados obtenidos para el rHu-GCSF
Apariencia	Líquido transparente, incoloro a ligeramente amarillento
Identificación A - por ensayo	Debe mostrar la actividad biológica descrita en el ensayo de farmacoepa

Atributo crítico de calidad (CQA)	Resultados obtenidos para el rHu-GCSF
Identificación B - determinación por enfoque isoeléctrico (impurezas con carga diferente a la del Filgrastim)	La banda principal en el electroferograma obtenido con la disolución de prueba es similar en la posición a la banda principal obtenida con la disolución de referencia.
Identificación C - determinación por cromatografía de exclusión por tamaño (impurezas de masa molecular superior a la del Filgrastim/dímeros y sustancia relacionada de masa molecular superior)	El tiempo de retención del pico principal obtenido con la disolución de prueba es similar al del pico principal obtenido con la disolución de referencia.
Identificación D - determinación por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras de cromatografía de exclusión por tamaño (impurezas de masa molecular diferente a la del Filgrastim)	En el electroferograma obtenido tanto en condición reductora como no reductora, la banda principal obtenida con la disolución de prueba es similar en la posición a la banda principal obtenida con la disolución de referencia.
Actividad (potencia)	80 -125% de la potencia declarada (no debe ser inferior a 1×10^8 UI de Filgrastim/mg de proteína)
Pureza de RP-HPLC	No menos de 96,5% a 99,8%
Proteínas relacionadas (impurezas totales) por HPLC de fase inversa	El área de cualquier pico distinto del pico principal no es superior a 2% del área total de todos los picos. La suma del área de todos los picos distintos de los picos principales no es superior a 3,5 % del área total de los picos.
GCSF oxidado	Inferior a 1,5%
GCSF reducido	Inferior a 1%
f-met GCSF	Inferior a 1,5%
Dímero y sustancia relacionada de mayor masa molecular determinada mediante cromatografía de exclusión por tamaño	El total de los picos con tiempo de retención inferior al pico principal debe ser inferior a 2%.
HCP	Inferior a 100 ppm
ADN	Inferior a 10 ng/dosis
Endotoxina	Inferior a 2 EU/mg
Contenido de proteínas	No menos de 0,9 mg/ml
Esterilidad	Debe cumplir las pruebas de esterilidad de la farmacopea

Tabla 2: Calidad de rHu PEG-GCSF (PEG-FILGRASTIM) obtenido mediante el método de la presente invención

Atributos críticos de calidad (CQA)	Resultados obtenidos para PEG GCSF
Apariencia	Líquido transparente, incoloro o ligeramente amarillento
Identificación A por potencia	Cumple los requisitos descritos en el ensayo de potencia de la farmacopea
Identificación B por impurezas con masas moleculares superiores a la del Peg-filgrastim	El pico principal del cromatograma obtenido con la disolución de prueba tiene un tiempo de retención similar al del pico principal del cromatograma obtenido con la disolución de referencia.
Identificación C por impurezas con masas moleculares diferentes a la del peg-filgrastim	La banda principal en el electroferograma obtenido con la disolución de prueba es similar en la posición a la banda principal obtenida con la disolución de referencia.
pH	Entre 3,7 y 4,3
Contenido de proteínas	No menos de 10 mg/ml
Impurezas con masas moleculares superiores al Peg-Filgrastim	El total de los picos con tiempo de retención inferior al pico principal debe ser inferior a 5%.
Potencia	Entre 80% y 120%
Aldehído mPEG libre	NMT 0,016 mg/ml

Atributos críticos de calidad (CQA)	Resultados obtenidos para PEG GCSF
Esterilidad	Debe cumplir las pruebas de esterilidad de la farmacopea

De la Tabla 1 y la Tabla 2 se desprende que el rHu-GCSF y el rHu PEG-GCSF obtenidos mediante el proceso de la presente invención tienen una mayor potencia con un perfil de impurezas mucho menor.

- 5 En la presente invención, las mejoras antes mencionadas en el proceso de purificación para producir rHu-GCSF (filgrastim) y PEG-GCSF (Peg-filgrastim) serían beneficiosas en términos de disminución de la intervención humana, de los gastos de capital y de los gastos operativos, además de un rendimiento general del producto que se espera sea mayor.
- 10 También se divulgan, aunque no de acuerdo con la invención, composiciones farmacéuticas de G-CSF en un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden administrarse por vía intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o mediante formas conocidas en la técnica farmacéutica. Por vía intravascular, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, los componentes activos del fármaco pueden combinarse con un portador adecuado, tal como agua, disolución salina, dextrosa acuosa y similares.
- 15 Se divulga además, aunque no de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica que comprende el G-CSF obtenido a partir del proceso de la presente invención en formulación parenteral líquida I.V con excipientes farmacéuticamente aceptables para la proliferación y diferenciación de granulocitos.
- 20 Se divulga además, aunque no de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica que comprende: G-CSF o Filgrastim obtenido por el procedimiento de la presente invención formulado en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM a pH 4,0, que contiene 5% de sorbitol y 0,004% de Polisorbato 80.

Ingrediente	Cantidad
Filgrastim	Más de 0,9 mg
Acetato	0,59 mg
Sorbitol	50,0 mg
Polisorbato 80	0,04 mg
Sodio	0,035 mg
Agua para inyección	Q. S. a 1 ml

- 25 En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende: PEG-GCSF/Peg-Filgrastim obtenido a partir del proceso de la presente invención formulado en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM a pH 4,0, que contiene 5% de sorbitol y 0,004% de Polisorbato 20.

Ingrediente	Cantidad
Peg-Filgrastim	Más de 10 mg
Acetato	0,59 mg
Sorbitol	50,0 mg
Polisorbato 20	0,04 mg
Sodio	0,035 mg
Agua para inyección	Q. S. a 1 ml

- 30 Adicionalmente se divulga, sin embargo no de acuerdo con la invención, el uso del GCSF aislado y preparado de acuerdo con lo que se reivindica en la reivindicación 1, en formulación parenteral líquida I.V para la proliferación y la diferenciación de granulocitos.

35 La invención de acuerdo con la presente invención puede ilustrarse mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención:

Ejemplo-1: Proceso de aislamiento y purificación del G-CSF de la presente invención

40 Paso 1: Producción de rHu-GCSF por fermentación de alta densidad celular de *E.coli*

El medio de preinoculación que contiene el antibiótico adecuado se inocula con células de *E. coli* procedentes de placas de petri reactivadas a partir de reservas congeladas. El cultivo se incuba a 30 °C, 12 horas a 250 rpm. El preinóculo y el inóculo posterior se preparan inoculando *E. coli* en un medio basal que contiene los antibióticos adecuados y se incuban a 30 °C, 12 horas a 250 rpm. El fermentador que contiene el medio salino basal acondicionado se inocula con un cultivo de inóculo tal que la O.D. inicial a 600 nm sea de aproximadamente 0,1. El cultivo se induce añadiendo 1 mM de IPTG cuando se alcanza la O.D._{600 nm} deseada. Durante el cultivo en lotes alimentados inducidos, tras la inducción, el caldo que contiene las células de *E. coli* inducidas se recolecta por centrifugación a 4°C y 6000 rpm durante 30 min. El sedimento celular recolectado se lava con disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). Las células granuladas lavadas se almacenan a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Paso 2: Lisis celular, aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión

19,0 g de precipitado celular congelado obtenido de la fermentación y diluido 15 X en disolución amortiguadora de lisis compuesta por 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 250 mM NaCl y pH 8,0. La disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (TA) durante 30 min.

Tras 30 minutos de agitación, la suspensión celular se homogeneiza a alta presión utilizando un homogeneizador de alta presión (PANDA, Niro Soavi) a 100000 kPa (1000 bares). La suspensión celular completa se homogeneiza durante tres pasadas. La lisis celular se controla comprobando la caída de la OD 600 nm y observando con microscopio óptico.

Tras tres pases de lisis, el lisado celular se somete a centrifugación a alta velocidad a 10.000 g durante 20 min. El sedimento celular lisado se recupera cuidadosamente decantando el sobrenadante. Tanto el gránulo lisado como el sobrenadante se analizaron mediante SDS PAGE reductor.

El sedimento celular lisado obtenido tras la centrifugación se resuspende de nuevo en disolución amortiguadora de lavado que contiene 20 mM Tris, 1% Triton X 100, 5 mM EDTA y pH 8,0. La suspensión se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Tras 30 minutos de incubación y agitación en disolución amortiguadora de lavado, la suspensión se somete a centrifugación a 10.000 g durante 20 min. La IB lavada se recupera en la fracción de gránulos decantando cuidadosamente el sobrenadante. Tanto la IB lavada como el sobrenadante se analizaron mediante SDS PAGE reductor para estimar su pureza. Los cuerpos de inclusión (IB) lavados se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Paso 3: Solubilización de los cuerpos de inclusión para la liberación de GCSF

Se pesó 1 g de cuerpo de inclusión y se solubilizó en 20 ml de disolución amortiguadora de solubilización compuesta por 50 mM Tris, 5 mM EDTA y 8 M Urea a pH 10. Tras 1 hora de solubilización, se añadieron 40 mM de cisteína para reducir las uniones disulfuro, se reajustó el pH a 10,0 y se mantuvo para la solubilización durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. Tras la solubilización, la disolución de cuerpos de inclusión solubilizada se clarificó mediante centrifugación a 11000 g durante 30 minutos.

Paso 4: Replegamiento de la proteína GCSF

La disolución de cuerpos de inclusión clarificada y solubilizada se replegó añadiéndola lentamente en 10 volúmenes de disolución amortiguadora de replegamiento compuesta por 50 mM de Tris, 0,5 M de Urea, 5% de Sorbitol y 2 mM de Cistina. La dilución se realiza mediante una bomba con tasa de flujo constante. Tras la adición de la muestra solubilizada a la disolución amortiguadora de replegamiento, la muestra se mantuvo toda la noche (aproximadamente 16 horas) para su replegamiento a temperatura ambiente (25°C).

- a) SDS PAGE (reducido) para el análisis de pureza.
- b) RP-HPLC para la identificación y el análisis de pureza.
- c) Proteína total por Bradford

Paso 5: Clarificación de la disolución replegada de proteína G-CSF acidificada

La disolución de proteína clarificada replegada se acidificó añadiendo una disolución madre de acetato de sodio 1 M pH 4,0 equivalente a 20 mM de acetato de sodio y, finalmente, el pH se ajustó con ácido clorhídrico 2 M hasta pH 4,0 y se mantuvo 30 min en espera.

La disolución de proteína G-CSF replegada acidificada puede someterse opcionalmente a filtración para eliminar los precipitados y partículas que puedan formarse antes de someterla a cromatografía. Dicha filtración puede seleccionarse preferiblemente del grupo que comprende la ultrafiltración, la diafiltración, la microfiltración, la filtración en profundidad, la filtración de flujo tangencial, la filtración de flujo normal y la centrifugación, preferiblemente la microfiltración.

Si se opta por la clarificación por filtración, la selección se basa en el rendimiento para eliminar eficazmente coloides, agregados, precipitados y partículas hasta un punto en que pueda cargarse directamente y proteja la columna de cromatografía cadena abajo. La selección final se realiza en función de la calidad global óptima del filtrado y del coste de la filtración. Los criterios generales de selección de los filtros son los que se indican a continuación, pero no se limitan a ellos:

- a) Flujo
- b) Rendimiento
- c) Reutilización
- d) Ciclos de esterilización
- e) Liberación de no fibras
- f) Calidad del filtrado
- g) Coste de la filtración/L/EJECUCIÓN
- h) Huella del equipo

Paso 6: Purificación por cromatografía

Tras la acidificación, la disolución se filtró mediante microfiltración con filtro de 0,2 μ para eliminar los precipitados y se cargó en 2 ml de columna de intercambio catiónico preequilibrada. La columna se lavó durante 5 CV con disolución amortiguadora de equilibrio compuesta de acetato de sodio 40 mM, pH 4,0 para llevar la absorbancia UV280 al valor inicial. La columna se lavó de nuevo para eliminar las impurezas relacionadas con el producto con disolución amortiguadora de lavado que contenía acetato de sodio 40 mM pH 5,5. Tras el lavado, el rHu-GCSF purificado se recuperó y se eluyó de la columna haciendo pasar disolución amortiguadora de elución compuesta por acetato de sodio 40 mM, cloruro de sodio 200 mM a pH 5,4. Todas las muestras de cromatografía, incluyendo la carga, el flujo continuo, los lavados y la elución, se analizan utilizando los siguientes métodos analíticos: Las fracciones de elución de la cromatografía de intercambio catiónico que contenían rHu GCSF purificado se agruparon y diluyeron 1:1 con disolución amortiguadora compuesta de acetato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 5,4. La disolución diluida se filtró con un filtro de 0,2 μ para eliminar los precipitados y se cargó en 1 ml de columna HIC preequilibrada. La columna se lavó durante 5 CV con un disolución amortiguadora de equilibrio compuesta por una disolución amortiguadora de acetato de sodio 20 mM, y sulfato de amonio 0,8 M, pH 5,4 para llevar la absorbancia UV280 al valor inicial. La proteína objetivo se recuperó y eluyó de la columna ejecutando un gradiente lineal de equilibrio y la disolución amortiguadora de elución compuesta de disolución amortiguadora de acetato de sodio 20 mM, pH 4,0 en 20 CV.

Todas las muestras de cromatografía, incluyendo la carga, el flujo continuo, los lavados y la elución, se analizan utilizando los siguientes métodos analíticos:

- a) SDS PAGE (reducido) para el análisis de pureza.
- b) RP-HPLC para la identificación y el análisis de pureza.
- c) Proteína total por Bradford
- d) Determinación de HCP utilizando ELISA
- e) Cuantificación de endotoxinas mediante la prueba de LAL.

Paso 7: Recuperación del G-CSF purificado en disolución amortiguadora de formulación

Las fracciones de HIC que contenían la proteína objetivo purificada se intercambiaron en una disolución amortiguadora de formulación predefinida compuesta por 10 mM de sodio, pH 4,0, 5% de sorbitol, 0,004% de Polisorbato 80 y se concentraron más hasta 1 mg/ml utilizando una membrana de ultrafiltración de 10 kDa. La disolución concentrada final de rHu-GCSF se filtró estérilmente con 0,2 micras y se almacenó a 2-8 °C hasta su uso posterior.

La disolución concentrada final de G-CSF se analizó mediante los siguientes métodos analíticos para comprobar si la disolución concentrada de G-CSF o el principio activo de G-CSF o el principio activo a granel de G-CSF o el API de G-CSF cumplían las especificaciones.

- a) Apariencia y pH
- b) Comprobación de la identidad y la pureza mediante SDS PAGE, Western blot, análisis de la secuencia N-terminal, enfoque isoelectrico (IEF) y mapa peptídico.
- c) Determinación de HCP utilizando ELISA,
- d) Bioactividad según especificación.
- e) Cuantificación del ADN de la célula hospedera mediante q PCR.
- f) Cuantificación de endotoxinas mediante la prueba de LAL.
- g) Agregado por HPLC de exclusión por tamaño.
- h) Impurezas relacionadas por RP-HPLC.
- i) Esterilidad según especificación.

Paso 8: Conjugación y purificación del G-CSF pegilado utilizando cromatografía de intercambio catiónico

5 El rHu-GCSF purificado presente en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, que contiene 5% de sorbitol y 0,004% de Tween 80 a una concentración de 1-1,2 mg/mL se ajusta a pH ~ 5,0 mediante la adición de acetato de sodio 1 M a pH 5,0. La potencia final de la disolución amortiguadora es de aproximadamente 50 mM. Se añade a la mezcla de reacción mPEG-20kDa-PEG-aldehído una cantidad 3X (en peso) de mPEG-20kDa-CHO a la cantidad de rHu-GCSF presente en la mezcla de reacción antes de la pegilación. Inmediatamente se añaden 20 mM de cianoborohidruro de sodio [Na(CN)BH₃] a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente [~ 25 °C] durante la noche. En el proceso se realiza un análisis de calidad para comprobar el % de filgrastim monopegilado, generalmente se obtiene un 75-80 % de filgrastim monopegilado después de 14 horas, la reacción se inactiva con 1M de tris a pH 8,0 y se almacena a 2-8 °C hasta su posterior procesamiento.

15 La mezcla de reacción de conjugación se diluye 20X con disolución amortiguadora de equilibrio y se ajusta el pH a 4,0. La muestra diluida se carga en una columna de cromatografía de intercambio catiónico preequilibrada (MacroCap SP) a una tasa de flujo de revestimiento de 100 cm/h. La columna se lava durante 5 CV con disolución amortiguadora de equilibrio compuesta de acetato de sodio 20 mM, pH 4,0 para llevar la absorbancia UV280 al valor inicial a una tasa de flujo de revestimiento de 100 cm/h. El rHu-GCSF monopegilado N-terminal purificado se recupera y se eluye de la columna haciendo pasar disolución amortiguadora de elución compuesta de acetato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 4,0 en gradiente de revestimiento 0-100% durante 10 CV a una tasa de flujo de revestimiento de 100 cm/h.

20 Todas las muestras de cromatografía, incluyendo la carga, el flujo continuo, los lavados y la elución, se analizan utilizando los siguientes métodos analíticos:

- 25
- d) SDS PAGE (reducida) para el análisis de pureza.
 - e) RP-HPLC para la identificación y el análisis de pureza.
 - f) Proteína total por Bradford

30 La fracción objetivo del eluido de la cromatografía se intercambia en una disolución amortiguadora que contiene 10 mM de acetato de sodio, 5% de sorbitol, 0,004% de Polisorbato 20, pH 4,0.

35 La muestra intercambiada con la disolución amortiguadora se concentra aún más hasta ~ 11 mg/ml mediante una membrana de ultrafiltración de 10 kDa. El retentado final del TFF se filtra estérilmente con 0,2 micras para obtener un filtrado de la calidad prevista y se diluye utilizando disolución amortiguadora. Durante la filtración estéril para recuperar el producto retenido, la filtración se optimiza para recuperar el producto a una concentración de PEG-GCSF de > 10 mg/ml. El producto final se almacena a 2-8 °C hasta su uso posterior. La disolución concentrada final de peg-filgrastim se analiza mediante los siguientes métodos analíticos para comprobar si la disolución concentrada de peg-filgrastim o el principio activo de peg-filgrastim o el principio activo de peg-filgrastim a granel o el API de peg-filgrastim cumplen las especificaciones.

- 40
- j) Apariencia y pH
 - k) Comprobación de la identidad y la pureza mediante SDS PAGE, Western blot, análisis de la secuencia N-terminal, enfoque isoeléctrico (IEF) y mapa peptídico.
 - 45 l) Determinación de HCP utilizando ELISA,
 - m) Bioactividad según especificación.
 - n) Cuantificación del ADN de la célula hospedera mediante q PCR.
 - o) Cuantificación de endotoxinas mediante la prueba de LAL.
 - p) Agregado por HPLC de exclusión por tamaño.
 - 50 q) Impurezas relacionadas por RP-HPLC.
 - r) Esterilidad según especificación.

55 En la presente invención, las mejoras antes mencionadas en el proceso de purificación del PEG-GCSF serán beneficiosas en términos de disminución de la intervención humana, los gastos de capital y los gastos operativos, además de un mayor rendimiento global esperado en el producto final.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de PEG-G-CSF, que comprende los siguientes pasos:

- 5 i) producción de rHu-GCSF por fermentación de alta densidad celular de *E. coli* y aislamiento de los cuerpos de inclusión;
- 10 ii) en donde los cuerpos de inclusión aislados se lavan en una disolución amortiguadora seleccionada del grupo que comprende la disolución amortiguadora Tris-EDTA-Tritón, la disolución amortiguadora Tris-EDTA-DOC, la disolución amortiguadora Tris- NaCl-Urea, la disolución amortiguadora Tris y TritonX-100, o una mezcla, preferiblemente la mezcla de Tris- EDTA, Urea, NaCl y TritonX-100;
- 15 en donde Tris está presente en un rango de 30 - 50 mM, EDTA en un rango de 3 - 7 mM, Urea en un rango de 0,1 - 0,5 M, NaCl en un rango de 1 - 2 M, y Triton X 100 en un rango de 0,8 - 1,5 %;
- 20 en donde el pH de la disolución amortiguadora de lavado está en el rango de 7,5-8,5;
- 25 en donde la temperatura está en el rango de 20 a 25 °C y el tiempo de incubación está en el rango de 60 a 90 minutos;
- 30 iii) solubilización de los cuerpos de inclusión obtenidos del paso (ii) para liberar el G-CSF con una mezcla de urea, disolución amortiguadora y un agente reductor a un pH alcalino; en donde los cuerpos de inclusión aislados se solubilizan en una mezcla solubilizante de urea, disolución amortiguadora y un agente reductor;
- 35 en donde el agente reductor es cisteína presente en un rango de 20 a 100 mM; en donde la disolución amortiguadora es una mezcla de Tris, EDTA y Urea;
- 40 en donde la conc. de urea está en un rango de 6 - 8 M, Tris está en un rango de 20 - 50 mM y EDTA está en un rango de 2 - 7 mM;
- 45 en donde el pH de la mezcla de solubilización está en un rango de 9,5 - 10,5;
- 50 en donde los cuerpos de inclusión solubilizados se clarifican para liberar la proteína G-CSF mediante centrifugación a un rango de 8000 - 15000 g;
- 55 en donde se estima la pureza de la proteína G-CSF liberada por los cuerpos de inclusión solubilizados mediante RP-HPLC;
- 60 en donde la pureza del G-CSF liberado se encuentra en un rango de 25 - 50%;
- 65 iv. replegamiento de la proteína G-CSF obtenida en el paso (iii), en una disolución amortiguadora de replegamiento; que contiene urea, sorbitol y un agente oxidante;
- 70 en donde el agente oxidante es cistina;
- 75 en donde la cistina está presente hasta en 3 mM;
- 80 y en donde la urea está presente en un rango de 0,4 - 1 M
- 85 en donde la cantidad de sorbitol es de 5%;
- 90 en donde se estima la pureza de la proteína G-CSF mediante RP-HPLC; en donde la pureza de G-CSF está en el rango de 40-70%;
- 95 en donde el proceso de replegamiento se lleva a cabo a 25 °C durante 12-18 horas
- 100 en donde la disolución de proteína G-CSF se acidifica en presencia de un agente acidificante;
- 105 en donde el agente acidificante se selecciona del grupo que comprende el acetato de sodio, el ácido acético, el ácido clorhídrico y el ácido ortofosfórico;
- 110 en donde el pH de la disolución de proteína replegada acidificada está en el rango de 3,5-4,5 y dicha disolución se mantiene durante 30-45 min a este pH; y
- 115 en donde el rendimiento del paso de replegamiento está en el rango de 60-85%.
- 120 v. clarificación y purificación de la proteína G-CSF obtenida en los pasos (iv);
- 125 vi. conjugar el G-CSF purificado obtenido del paso (v) con PEG; y
- 130 vii. purificar el G-CSF conjugado (pegilado) obtenido del paso (vi) mediante cromatografía de intercambio catiónico;
- 135 en donde el rendimiento del proceso está en el rango de 50 a 70% y la pureza del G-CSF analizada por SEC-HPLC no es inferior a 98%;
- 140 en donde la suma de las impurezas como el agregado no es superior a 2% y la pureza del G-CSF analizada por RPHPLC no es inferior a 96,5%;
- 145 en donde la suma de GCSF oxidado, GCSF reducido y GCSF f-met no es superior a 3,5 %;
- 150 en donde el rendimiento del proceso de producción de PEG-GCSF a partir de GCSF está en el rango de 60 a 75% y la pureza del PEG-GCSF analizada por SEC-HPLC no es inferior a 95%
- 155 2. El proceso reivindicado en el paso (vii) de la reivindicación 1, en donde la cantidad de GCSF oxidado presente es inferior a 1,5%, el GCSF reducido es inferior a 1% y el GCSF f-met es inferior a 1,5%.
- 160 3. El proceso reivindicado en el paso (vii) de la reivindicación 1, en donde la cantidad de agregados presentes es inferior a 2%.

4. El proceso reivindicado en el paso (vii) de la reivindicación 1, en donde el rendimiento del proceso de GCSF no es inferior a 50% y el rendimiento del proceso de PEG-GCSF no es inferior a 60%.

5. El proceso reivindicado en el paso (i) de la reivindicación 1, en donde las células producidas a partir de la fermentación de alta densidad celular de *E. coli* se lisan mediante una disolución amortiguadora de lisis;

en donde el pH de la disolución amortiguadora de lisis está en un rango de 7,5-8,5;

10 en donde el aislamiento se realiza mediante instrumentos seleccionados del grupo que comprende el sonicador a escala de laboratorio, el homogeneizador celular de alta presión, la centrifugación y la filtración, o una combinación, preferiblemente una combinación del sonicador a escala de laboratorio y el homogeneizador celular de alta presión.

6. El proceso reivindicado en el paso (v) de la reivindicación 1, en donde la proteína G-CSF se clarifica y purifica para obtener un eluido de proteína G-CSF;

15 en donde la disolución de proteína G-CSF se somete a filtración y centrifugación para su clarificación con el fin de eliminar los precipitados y las partículas antes de someterla a cromatografía para su purificación;

20 en donde la clarificación se selecciona del grupo que comprende la ultrafiltración, la diafiltración, la microfiltración, la filtración en profundidad, la filtración de flujo tangencial, la filtración de flujo normal y la centrifugación; preferiblemente, la clarificación se realiza mediante microfiltración o centrifugación;

25 en donde el proceso de centrifugación se selecciona entre el modo discontinuo y el modo continuo, preferiblemente el proceso de centrifugación es el modo continuo; en donde el método de purificación comprende dos métodos de cromatografía; en donde los métodos de cromatografía son la cromatografía de intercambio iónico y la interacción hidrofóbica;

30 en donde la cromatografía de intercambio iónico se selecciona entre la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio aniónico, preferiblemente la cromatografía de intercambio catiónico, más preferiblemente la cromatografía de intercambio catiónico débil;

en donde la cromatografía de intercambio catiónico comprende una fase estacionaria y una fase móvil;

35 en donde la fase estacionaria se selecciona del grupo que comprende SP-Sefarosa FF, CM-Sefarosa FF, SP-Sefarosa HP, Fractogel SO3 y Fractogel SE HiCap, más preferiblemente CM-Sefarosa, preferiblemente la fase estacionaria es CM-Sefarosa FF;

en donde la fase móvil se selecciona del grupo que comprende acetato de sodio, ácido acético, fosfato de sodio, ácido ortofosfórico o una mezcla, preferiblemente una mezcla que comprende acetato de sodio y ácido acético;

40 en donde la concentración de la fase móvil es de 20 - 50 mM, y el pH está en el rango de 3,5 - 4,5;

35 en donde la proteína GCSF se eluye de la columna de intercambio catiónico utilizando la disolución amortiguadora compuesta por acetato de sodio, ácido acético y NaCl, a un pH en el rango de 4,0 - 6,0, preferiblemente en el rango de 4,5 - 5,6;

en donde el modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado;

40 en donde la elución se realiza a una tasa de flujo de 100-250 cm/h, más preferiblemente de 150-200 cm/h;

en donde la capacidad de unión dinámica del eluido está en el rango de 10-20 mg/ml, preferiblemente 15-18 mg/mL;

en donde la pureza RP-HPLC del G-CSF del paso de cromatografía de intercambio catiónico se encuentra en un rango de 90% - 97%;

45 en donde el rendimiento de la proteína G-CSF del paso de cromatografía de intercambio catiónico, se sitúa en un rango de 90% - 98%;

en donde el eluido de la cromatografía de intercambio iónico que contiene rHu-G-CSF se aplica a la fase estacionaria de la cromatografía de interacción hidrofóbica en condiciones ácidas en el rango de pH 2,0 - 7,0, preferiblemente pH 4,0 a pH 6,0;

50 en donde el eluido de la cromatografía de intercambio iónico se diluye con sulfato de amonio para garantizar que la concentración efectiva de sulfato de amonio en la disolución diluida se mantiene en el rango de 0,5 - 1,5 M, preferiblemente en el rango de 0,7 - 1,0 M;

en donde la cromatografía de intercambio iónico comprende una fase estacionaria y una fase móvil;

55 en donde el eluido de cromatografía de intercambio iónico tratado con sulfato de amonio que contiene G-CSF se aplica a la fase estacionaria de la cromatografía de interacción hidrofóbica en condiciones ácidas, preferiblemente en el rango de pH 2,0 - pH 7,0, más preferiblemente pH 4,0 - pH 6,0;

en donde la fase estacionaria se selecciona del grupo que comprende fenil sefarosa FF, butil sefarosa, Nuvia-cPrime, HEA hiper celular, PPA hiper celular, fenil sefarosa HP, MEP hiper celular y Capto Adhere, preferiblemente fenil sefarosa FF;

60 en donde la fase móvil de la cromatografía de interacción hidrofóbica comprende una mezcla de acetato de sodio, ácido acético y sulfato de amonio a un pH en el rango de 4,5 - 6, más preferiblemente 5,2 - 5,8;

en donde la elución se realiza a una tasa de flujo de 95-300 cm/h, preferiblemente de 100-250 cm/h;

en donde la proteína GCSF purificada se eluye de la fase estacionaria de la cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando una fase móvil que comprende acetato de sodio y ácido acético a un pH en el rango de 4 - 6, más preferiblemente en el rango de 4,0 - 5,0;

65 en donde el modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y

- combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado;
 en donde el eluido se obtiene a una tasa de flujo de 95-300 cm/h, preferiblemente de 100-250 cm/h;
 en donde la pureza de la proteína G-CSF obtenida mediante cromatografía de interacción hidrofóbica está en un
 rango de 96,5% - 99,5%; y
 5 en donde el rendimiento de la proteína G-CSF obtenida por cromatografía de interacción hidrofóbica está en un
 rango de 80% a 90%.
7. El procedimiento reivindicado en el paso (vi) de la reivindicación 1, en donde la proteína G-CSF purificada se
 10 conjuga con polietilenglicol (PEG) en una disolución amortiguadora;
- en donde la disolución amortiguadora se selecciona del grupo que comprende acetato de sodio, acetato de fosfato,
 fosfato de hidrógeno de potasio, fosfato de dihidrógeno de potasio, fosfato de hidrógeno de disodio, ftalato de
 hidrógeno de potasio, tetraborato de sodio, preferiblemente la disolución amortiguadora es acetato de sodio;
 en donde el pH de la reacción de conjugación está en un rango de pH 5,0 - 5,8;
 15 en donde la reacción de conjugación se lleva a cabo añadiendo una cantidad de 3 a 5 veces superior (p/p) de
 aldehído PEG 20kD;
 en donde la reacción de conjugación se lleva a cabo en presencia de un agente reductor seleccionado del grupo
 que comprende cianoborohidruro de sodio, triacetoxi borohidruro de sodio, borohidruro de sodio, ditionito de sodio,
 hidrosulfito de sodio, preferiblemente el agente reductor es cianoborohidruro de sodio; en donde el agente reductor
 20 está presente en el rango de 10 a 30 mM, preferiblemente el agente reductor es 20 mM;
 en donde la mezcla de reacción se agita a 25 °C de 12 a 18 horas, preferiblemente de 12 a 16 horas;
 en donde el rendimiento del rHu-GCSF monopegilado a partir de la reacción de conjugación está en el rango de 65
 - 85%, preferiblemente el rendimiento es del 70 - 75%; y
 en donde la temperatura para almacenar la mezcla de reacción de rHu-GCSF monopegilado está en el rango de
 25 1 a 10 °C, preferiblemente la temperatura está en el rango de 2-8 °C.
8. El proceso reivindicado en el paso (vii) de la reivindicación 1, en donde la proteína G-CSF pegilada conjugada
 se purifica para obtener G-CSF monopegilado mediante cromatografía de intercambio catiónico;
- 30 en donde el G-CSF pegilado conjugado se diluye con disolución amortiguadora de equilibrio para ajustar el pH en
 el rango de 3,5-5,0, preferiblemente el pH se ajusta en el rango de 4,0-4,5;
 en donde la cromatografía de intercambio catiónico comprende una fase estacionaria y una fase móvil;
 en donde la fase estacionaria se selecciona del grupo que comprende MacroCap-SP y SP Sefarosa FF, Fractogel
 SO3, preferiblemente la fase estacionaria es MacroCap-SP;
 35 en donde la fase móvil se selecciona entre el acetato de sodio, el ácido acético, el NaCl y su mezcla,
 preferiblemente la fase móvil es una mezcla;
 en donde el acetato de sodio está presente en el rango de 10 a 50 mM, y el NaCl está presente en el rango de
 0,25 a 0,75 M, en donde el pH de la fase móvil está presente en el rango de 3,5 - 5, preferiblemente el pH es de
 4,0 -4,5;
 40 en donde el modo de elución se selecciona del grupo que comprende gradiente escalonado, gradiente lineal y
 combinación de ambos, preferiblemente el gradiente utilizado para la elución es gradiente escalonado;
 en donde el r-Hu-GCSF monopegilado purificado se recupera a una tasa de flujo de 100-150 cm/h, preferiblemente
 100 cm/h;
 en donde el rendimiento del GCSF monopegilado a partir de la cromatografía de intercambio catiónico está en el
 45 rango de 80 a 95%, preferiblemente el rango es de 85 a 90%;
 en donde el rHu-GCSF monopegilado purificado se concentra en el rango de 9-12 mg/ml mediante membrana de
 ultrafiltración de 10 kDa, preferiblemente el rHu-GCSF monopegilado purificado se concentra en el rango de 11,0-
 11,5 mg/ml; y
 en donde
 50 el rHu-GCSF monopegilado purificado obtenido se almacena a una temperatura en el rango de 1-10 °C,
 preferiblemente a 2-8 °C.

DIBUJOS

Figura 1

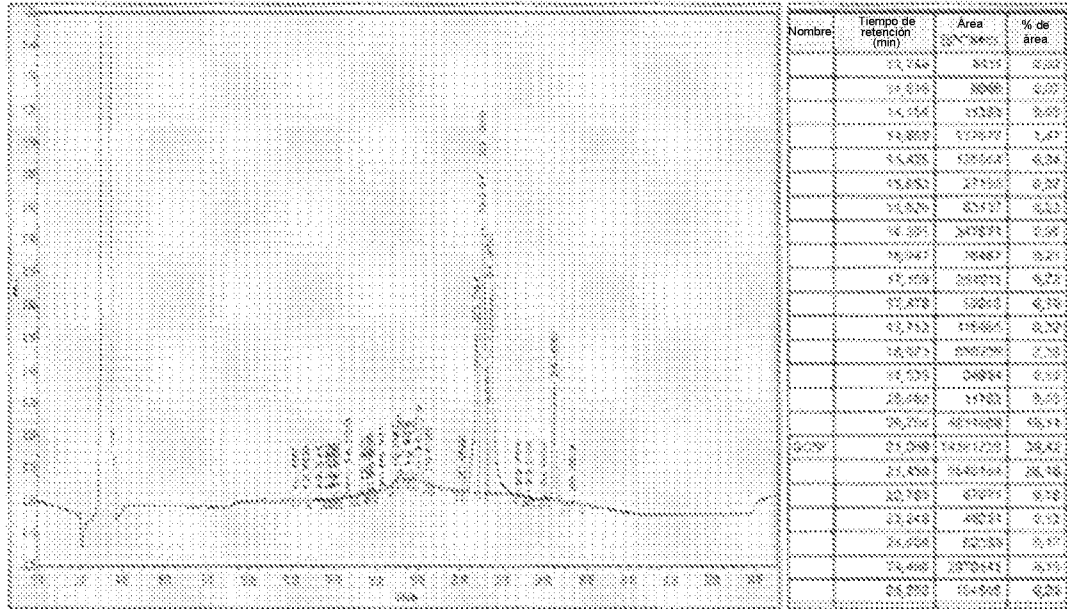


Figura 2

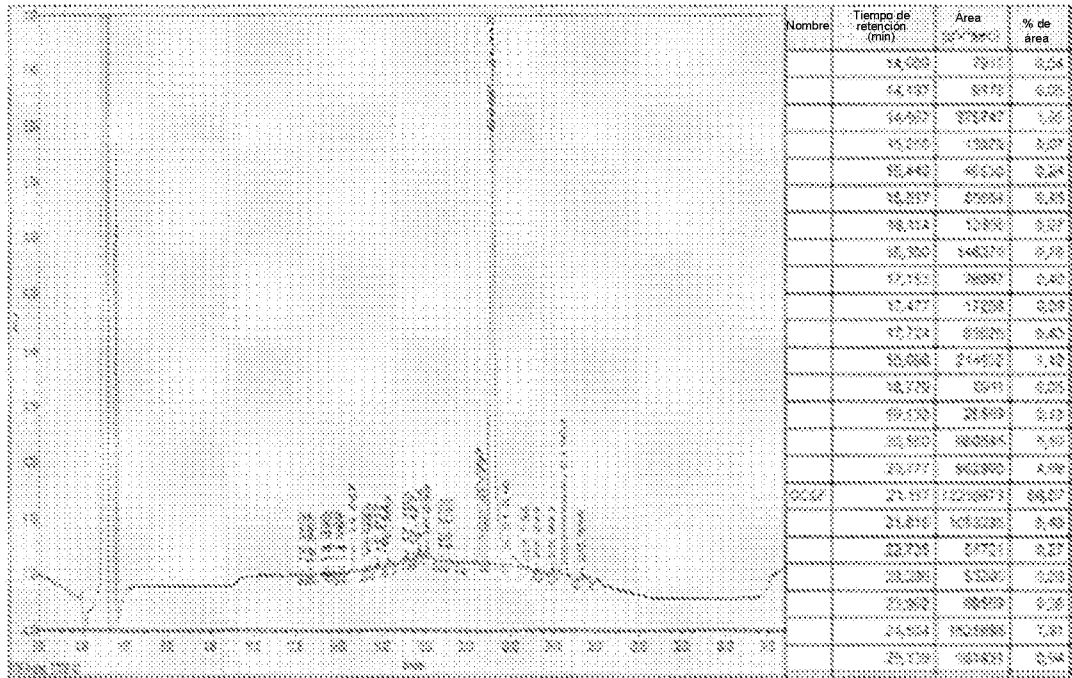


Figura 3

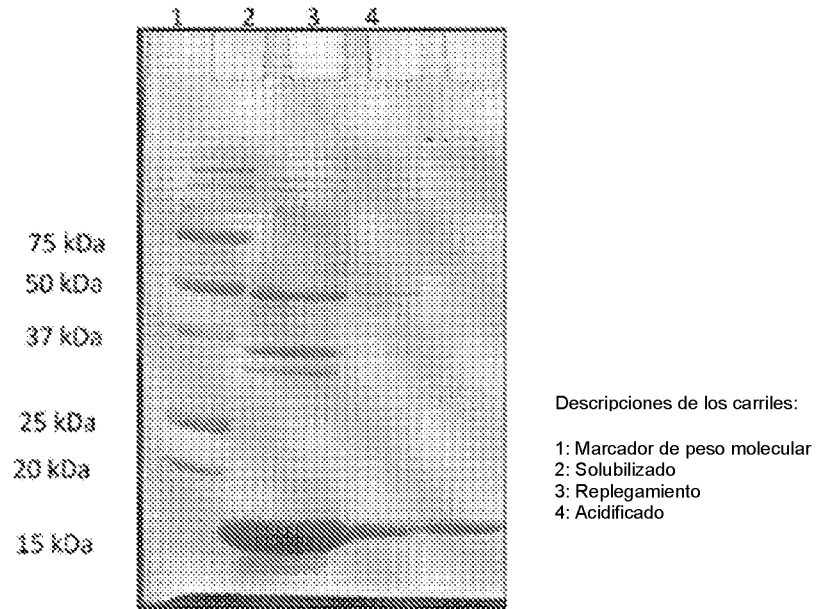


Figura 4

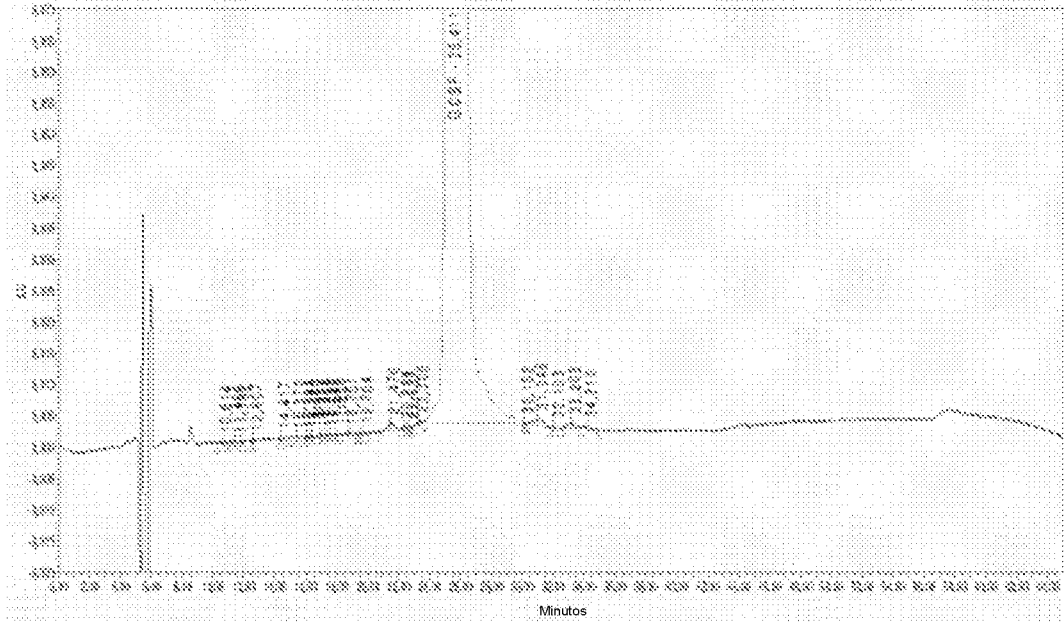


Figura 5

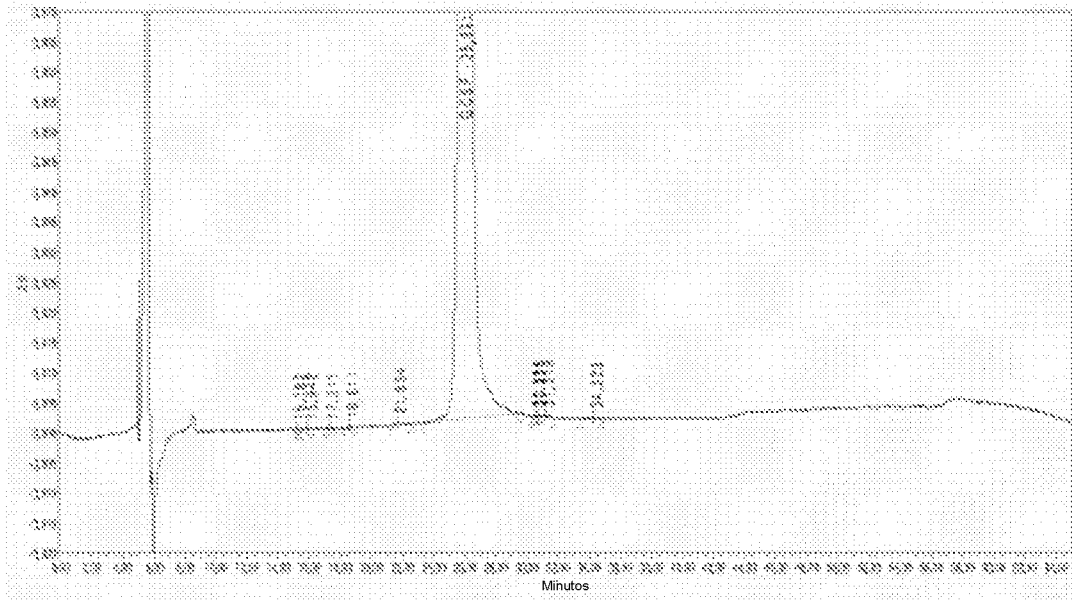


Figura 6

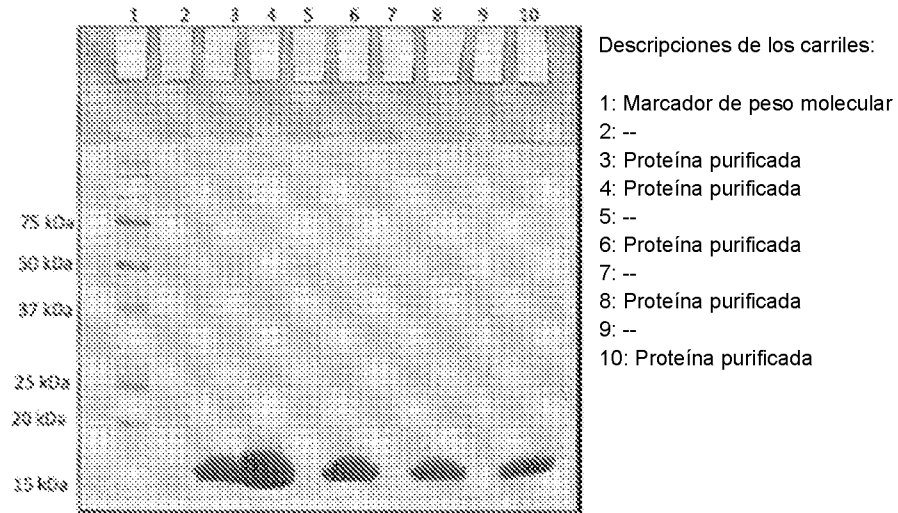


Figura 7

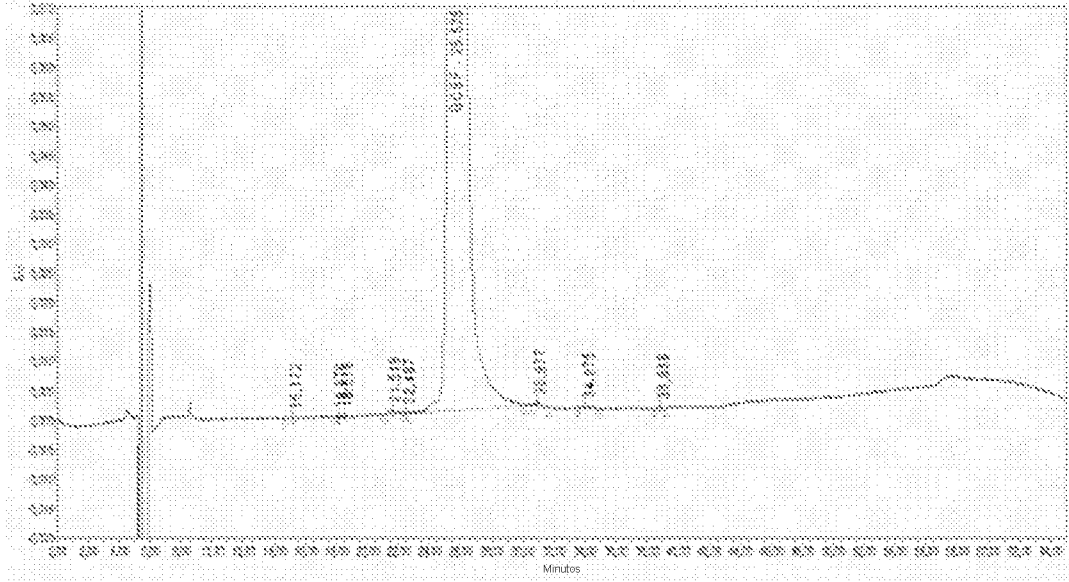


Figura 8

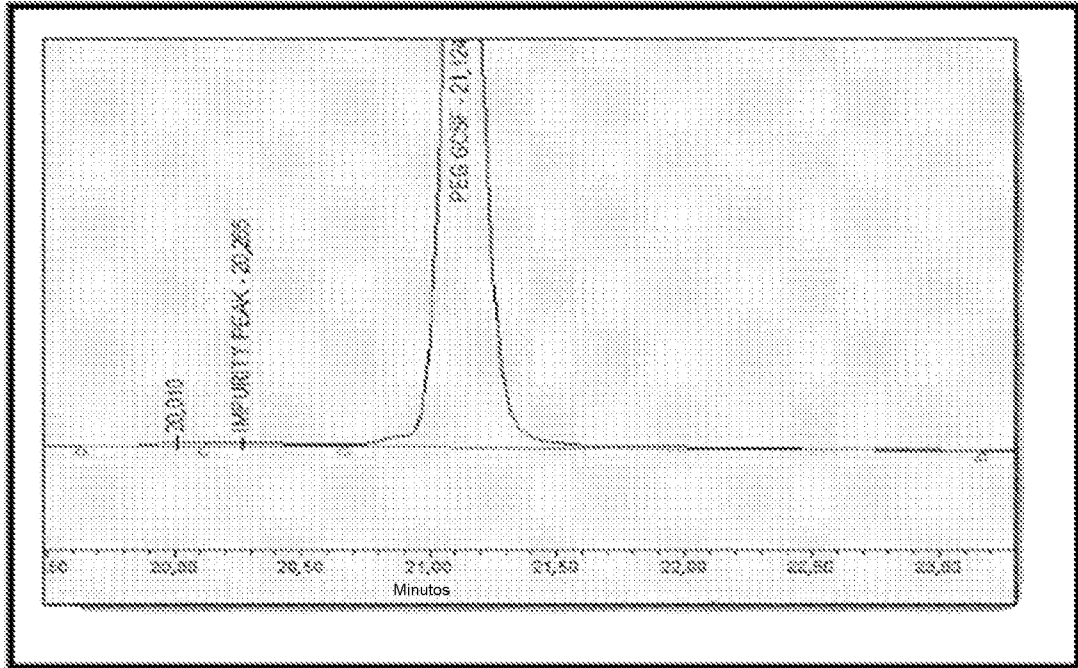


Figura 9

