



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 041**

51 Int. Cl.:
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03754774 .2**
96 Fecha de presentación : **22.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1545428**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Procedimiento para disminuir los niveles de agregación de proteína pegilada.**

30 Prioridad: **20.09.2002 US 412227 P**
25.08.2003 US 646798
16.09.2003 US 662884

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2010

73 Titular/es: **Pharmacia Corporation**
100 Route 206 North
Peapack, New Jersey 07977, US

72 Inventor/es: **Boyle, Denis, M.;**
Buckley, John, J.;
Johnson, Gary, V.;
Steinmeyer, David, E.;
Toal, Michele;
Aykent, Serdar y
Rathore, Anurag, S.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 337 041 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para disminuir los niveles de agregación de proteína pegilada.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a procedimientos recombinantes para preparar un polipéptido pegilado deseado. Este procedimiento o procedimientos producen un producto de polipéptido pegilado que contiene niveles reducidos de agregación y/o determinadas impurezas de isoformas de los mismos. En particular, la presente invención también se refiere a un procedimiento recombinante para preparar un antagonista de la hormona del crecimiento (por ejemplo, tal como pegvisomant y su proteína intermedia) con agregación y/o impurezas de isoformas de las mismas disminuidas. Más específicamente, las impurezas de isoformas que se disminuyen mediante los procedimientos de la presente invención son las impurezas de isoforma trisulfuro y des-phe del antagonista de la hormona del crecimiento (o su intermedio). También, la agregación es la agregación indeseada del antagonista de la hormona del crecimiento pegilado.

Antecedentes de la invención

Pegvisomant (Somavert®; Pharmacia Corp.) es un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento humana. Es un análogo de la hormona del crecimiento humana ("hGH") que se ha alterado estructuralmente. La secuencia de aminoácidos del componente proteico/intermedio (B-2036) de pegvisomant difiere de la secuencia de aminoácidos de hGH en nueve posiciones. Las sustituciones de aminoácidos específicas son las siguientes: H18D, H21N, G120K, R167N, K168A, D171S, K172R, B174S e I179T. Como se reconoce bien en la técnica, la primera letra (es decir, H18D) representa el aminoácido en la secuencia de hGH en la posición numerada (es decir, 18^{va} posición de aminoácido indicada por H18D) que se sustituye con el aminoácido indicado por la segunda letra (es decir, H18D). Por lo tanto, H18D indica una sustitución del aminoácido his por el aminoácido asp en la 18^{va} posición de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de hGH de tipo silvestre.

La Figura 1A muestra esquemáticamente la estructura de la secuencia de aminoácidos del componente proteico/intermedio (B-2036) de pegvisomant (PEG B-2036 o B-2036 PEG) con asteriscos que indican los sitios potenciales de unión del polímero polietilenglicol (unidad "PEG"). Adicionalmente, la lista de secuencias de aminoácidos del componente proteico/intermedio (B-2036 - sin unión de unidad PEG) de pegvisomant se identifica en este documento como SEC ID N° 1. Para comparación, la lista de secuencias de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana se identifica en este documento como SEC ID N° 2. Ambas listas de secuencias se proporcionan juntas en este documento. Véase también Jorgensen y col., "Quantifying biosynthetic human growth hormone in *Escherichia coli* with electrophoresis under hydrophobic conditions", J. Chromatography A 817: 205-214 (1998) para la secuencia de hGH.

Estructuralmente, pegvisomant es una proteína (que contiene 191 restos aminoacídicos) a la cual están unidas covalentemente principalmente de 4 a 6 unidades de PEG. El peso molecular del componente proteico/intermedio (B-2036) de pegvisomant es 21.998 Daltons. El peso molecular de cada unidad de PEG de pegvisomant es aproximadamente 5000 Daltons. Por lo tanto, los pesos moleculares predominantes de pegvisomant son aproximadamente 42.000 (4 unidades de PEG/molécula), 47.000 (5 unidades de PEG/molécula) y 52.000 (6 unidades de PEG/molécula) Daltons.

Con referencia al agonista y sin estar limitado por la teoría, se cree que la hGH endógena activa sus receptores cuando una molécula única de hGH se une a dos de sus moléculas receptoras adyacentes (e idénticas), induciendo la homodimerización de receptor mediada por hormona. Véanse, las Patentes de Estados Unidos N° 5.849.535 y 6.057.292. La actividad de hGH depende de su capacidad de unirse a dos de sus receptores adyacentes (e idénticos) a través de dos sitios de unión separados (sitio 1 y sitio 2) en la misma molécula de hGH. Estos sitios de unión de hGH, denominados sitio 1 y sitio 2, se numeran 1 y 2 para reflejar el orden de su unión a dos receptores de hGH adyacentes (e idénticos) que median la homodimerización dependiente de hGH.

Además, sin estar limitado por la teoría, se cree que pegvisomant se une selectivamente a receptores de la hormona del crecimiento humana ("receptores de GH") sobre las superficies celulares, donde el mismo bloquea la unión de la hormona del crecimiento humana endógena, interfiriendo de ese modo con la transducción de señal de la hormona del crecimiento humana. Las modificaciones estructurales a la parte proteica (también denominada "componente" o "intermedio") de pegvisomant (con relación a hGH) permiten que pegvisomant bloquee competitivamente la interacción entre una molécula de hGH y un receptor de hGH. Pegvisomant se une al receptor de GH, bloqueando de este modo la unión de GH ya que el receptor está ocupado. Las modificaciones estructurales evitan la dimerización de receptor y como resultado no ocurre la transducción de señal. Bloqueando de este modo la interacción cercana necesaria entre una molécula de hGH y un receptor de hGH, pegvisomant bloquea la homodimerización mediada por hGH de los receptores de hGH, lo cual proporciona a pegvisomant su actividad antagonista.

Este antagonista se usa para tratar afecciones, que incluyen, pero sin limitación, acromegalia en pacientes que no responden de forma adecuada a cirugía, terapia de radiación y/u otras terapias médicas convencionales o que de otra manera no pueden tolerar estas terapias. Además, las modificaciones estructurales a la parte proteica (B-2036) de pegvisomant provocan que el mismo muestre una afinidad de unión por el receptor de prolactina que es inferior a la de hGH, minimizando de ese modo los efectos secundarios indeseados relacionados con la lactancia asociados con el uso de pegvisomant.

La parte de intermedio proteico (B-2036) de pegvisomant se sintetiza mediante una cepa de bacterias *Escherichia coli* que se ha modificado genéticamente mediante la adición de un plásmido que porta un gen para el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento (B-2036). B-2036 después se recupera a partir de las células microbianas y se purifica. Después, el B-2036 purificado se pega para producir pegvisomant (PEG B-2036). Las Patentes de Estados Unidos N° 5.849.535 y 6.057.292 describen procedimientos para preparar B-2036 y procedimientos para conjugar una o más unidades de PEG a B-2036, aunque sin detalles con referencia a cómo disminuir, reducir, eliminar, invertir y/o evitar la formación de niveles inaceptablemente altos de las impurezas de isoformas trisulfuro y des-phe de las mismas.

Uno de los problemas encontrados usando procedimientos de preparación recombinantes convencionales para preparar B-2036 es la formación de sus impurezas de isoformas, tales como sus isoformas des-phe y trisulfuro. Otro de los problemas encontrados usando procedimientos de preparación y purificación convencionales para preparar B-2036 PEG (es decir, B-2036 pegilado tal como pegvisomant) a partir de B-2036 es la formación de una “agregación” indeseable de B-2036 PEG como se analiza adicionalmente más adelante.

La impureza de isoforma des-phe es una en la que a la molécula de B-2036 le falta su fenilalanina amino-terminal. Véase la Figura 1A que representa el resto de fenilalanina amino-terminal objeto (es decir, indicado por la letra “F”) adyacente al extremo NH₂ de B-2036. La impureza de isoforma trisulfuro es una en la que la molécula de B-2036 contiene un átomo de azufre adicional que forma un “puente trisulfuro” dentro de la molécula. Véase el recuadro en la Figura 1B. También, véase Andersson y col., “Isolation and characterization of a trisulfide variant of recombinant human growth hormone formed during expression in *Escherichia coli*”, Int. J. Peptide Protein Res. 47: 311-321 (1996) y A. Jespersen y col., “Characterisation of a trisulphide derivative of biosynthetic human growth hormone produced in *Escherichia coli*”, Eur. J. Biochem. 219: 365-373 (1994). Sin estar limitado por la teoría, se cree que estas impurezas de isoforma típicamente se generan durante el crecimiento (por ejemplo, fermentación) y expresión (síntesis y secreción) celular de B-2036 en células huésped modificadas genéticamente y/o durante la extracción y purificación de la proteína de B-2036.

Con relación al problema con la “agregación”, la formación de tal “agregación” conduce a una producción disminuida de la proteína deseada y a un coste aumentado para producir la misma. También, si el nivel de “agregación” es demasiado alto, la proteína final puede ser de una pureza tan baja que se vuelva inadecuada para uso terapéutico.

Con relación a determinadas impurezas, la Solicitud Internacional WO 94/24157 (publicada el 27 de octubre de 1994) describe un derivado hidrófobo de hGH que comprende un átomo de azufre adicional en comparación con el hGH nativo. Véase el documento WO 94/24157 en la página 3, líneas 3-10. El átomo de azufre adicional del derivado hidrófobo de hGH forma un “puente trisulfuro” que produce una variante trisulfuro de hGH. Véase el documento WO 94/24157 en la página 7, líneas 11-16. La referencia WO 94/24157 indica además que esta variante trisulfuro de hGH se puede convertir de nuevo en su forma de hGH nativa tratando la variante trisulfuro de hGH con un compuesto mercapto tal como cisteína, glutatión, 2-mercapto etanol o ditiotritol. Véase el documento WO 94/24157 en las páginas 4 y 5.

La Solicitud Internacional WO 96/02570 (publicada el 1 de febrero de 1996) describe otro procedimiento para convertir la variante trisulfuro de hGH de nuevo su forma nativa usando sulfito de sodio, sulfito de potasio, sulfito de amonio o un sulfito de metal alcalinotérreo tal como sulfato de magnesio o sulfito de calcio. Véase el documento WO 94/24157 en la página 4, líneas 17-21.

La Solicitud Internacional WO 00/02900 (publicada el 20 enero de 2000) titulada “Method for the production of recombinant peptides with a low amount of trisulfides” analiza “un procedimiento para la reducción de la cantidad de trisulfuros en la producción de péptidos recombinantes, por ejemplo, tanto proteínas como péptidos más pequeños”. La invención se basa en el hallazgo novedoso e inesperado de que la cantidad de trisulfuros en la producción de péptidos recombinantes se podía reducir mediante la adición de una sal metálica, preferiblemente en exceso, durante o después de la fermentación y no, como se ha sugerido anteriormente, mediante la conversión de los trisulfuros formados de la hormona del crecimiento en la forma nativa”. Véase el documento WO 00/02900 en la página 2, líneas 21-27. La referencia WO 00/02900 indica además “[l]a proteína puede ser cualquier proteína recombinante pero preferiblemente es una hormona del crecimiento recombinante que puede ser tanto humana como animal tal como hormona del crecimiento humana (hGH), hormona del crecimiento bovina (bHG) y hormona del crecimiento Oporcina (pGH)”. Véase el documento WO 00/02900 en la página 3, líneas 4-6.

La Solicitud Internacional N° WO 02/057478 (publicada el 25 de julio de 2002) titulada “Methods and Composition For Extracting Proteins From Cells” se refiere a un procedimiento para liberar una proteína a partir de una célula huésped poniendo en contacto la célula huésped con un agente reductor y un detergente. La referencia indica que el propósito del agente reductor es “facilitar la recuperación de proteínas en sus conformaciones nativas”. Véase el documento WO 02/057478 en la página 2, líneas 16-18. Adicionalmente, el documento WO 02/057478 describe que el “uno o más agentes reductores son agentes...que reducen los enlaces disulfuro y/o mantienen los restos sulfhidrilo en la(su) forma reducida. Cualquier agente o agentes reductores de este tipo se pueden usar. En una realización preferida, el uno o más agentes reductores usados se seleccionan entre el grupo constituido por ditiotritol (DTT); ditioeritritol (DTB); Cisteína (Cys) y Tris 2-carboxietilfosfina (TCEP)”. Véase el documento WO 02/057478 de la página 3, línea 24 a la página 4, línea 4.

Para otras referencias con respecto a purificación, véase la Patente de Estados Unidos 6.265.542 B1 (Fahmer y col. titulada "purification of Molecules"); la Patente de Estados Unidos N° 6.333.399 B1 (Blank titulada "Protein Purification"); la Patente de Estados Unidos N° 5.747.639 (Seely titulada "Use of Hydrophobic Interaction Chromatography to Purify Polyethylene Glycols"); Solicitud Internacional N° PCT/US96/19459 (Ibrahim y col. titulada "Activated Linkers and Methods for Making and Purifying the Same"); y Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/002271 A1 (Rinderknecht y col. titulada "Antibody Purification").

Sin embargo, las referencias indicadas anteriormente, no se pronuncian con respecto a la prevención, inversión, reducción o eliminación de formación de impurezas de isoforma asociadas con un antagonista de la hormona del crecimiento tal como pegvisomant o su parte proteica, B-2036 y/o la formación de agregación de proteína pegilada, por ejemplo, pegvisomant. Por consiguiente, existe una necesidad de procedimientos mejorados para preparar B-2036 que disminuya, atenúe, evite, minimice, invierta y/o elimine la formación de sus impurezas de isoformas (trisulfuro y/o des-phe) y/o la formación de agregación de proteína pegilada. Análogamente, estas referencias tampoco se pronuncian con respecto a la detección, atenuación, minimización, inversión, reducción o eliminación de la formación, de la impureza de isoforma des-phe de la hormona del crecimiento y/o la formación de agregación de proteína pegilada, por ejemplo, hormona del crecimiento pegilada u hormona del crecimiento humana pegilada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A representa la secuencia de aminoácidos de B-2036 que corresponde a la SEC ID N° 1. Los asteriscos (*) en la Figura 1A indican nueve (9) sitios potenciales para unión covalente de unidades de PEG a cada molécula de B-2036. Obsérvese que se identifican nueve (9) sitios posibles blancos, no todos los 9 sitios se tienen que unir covalentemente a unidades de PEG. Preferiblemente, existen 4-6 unidades de PEG por molécula de B-2036.

La Figura 1B representa la estructura de la impureza de isoforma trisulfuro de B-2036 (denominada "Trisulfuro (+32 amu)") en comparación con su forma deseable (denominada "GHA Nativa").

La Figura 2 es una comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG 4 encontradas dentro de las fracciones 7 a 18 de Q-Sefarosa FF determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

La Figura 3 es una comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG 5 encontradas dentro de las fracciones 7 a 18 de Q-Sefarosa FF determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

La Figura 4 es una comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG 6 encontradas dentro de las fracciones 7 a 18 de Q-Sefarosa FF determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

Sumario de la invención

Considerando la necesidad anterior de proporcionar un procedimiento mejorado para preparar un antagonista de la hormona del crecimiento polipeptídico pegilado recombinante y/o un antagonista de la hormona del crecimiento humana polipeptídico pegilado recombinante, con niveles disminuidos de agregación indeseable y/o impurezas de isoforma de las mismas, la presente invención se refiere a procedimientos mejorados para producir antagonistas de la hormona del crecimiento polipeptídicos pegilados recombinantes (incluyendo, pero sin limitación, antagonistas de la hormona del crecimiento humana) con niveles disminuidos de su agregación, impurezas de isoforma des-phe y/o trisulfuro.

Con respecto al antagonista de la Hormona del crecimiento recombinante (incluyendo, antagonista de la hormona del crecimiento humana), su impureza de isoforma trisulfuro se disminuye mediante contacto suficiente entre la impureza de isoforma trisulfuro y (1) un compuesto mercapto, (2) un agente quelante, (3) una sal metálica, (4) un compuesto mercapto junto con una sal metálica o (5) un compuesto mercapto después del contacto con un agente quelante pero en ausencia del agente quelante, respectivamente.

Con respecto al antagonista de la hormona del crecimiento recombinante (incluyendo, antagonista de la hormona del crecimiento humana), la formación de su impureza de isoforma des-phe se disminuye mediante la adición de (1) un agente quelante o (2) una sal metálica, respectivamente.

Con respecto a un antagonista de la hormona del crecimiento pegilado recombinante y/o antagonista de la hormona del crecimiento humana pegilado, el nivel de agregación se mantiene o se disminuye en o por debajo de un nivel deseado mediante cromatografía de intercambio aniónico durante la separación de las isoformas pegiladas de los mismos.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En esta solicitud se usan las siguientes abreviaturas.

5	AC	cromatografía de afinidad
	AEX	intercambio aniónico
	API	ingrediente farmacéutico activo
10	BI	intermedio voluminoso; B-2036 (sin pegilación)
	B-2036 PEG	B-2036 pegilado
15	PEG B-2036	B-2036 pegilado
	CE	electroforesis capilar
	CEX	intercambio catiónico
20	cm	centímetro
	CV	volumen de columna
25	DEAE	dietilaminoetilo
	HEPES	ácido N-(2-hidroxietil) piperazina N-(2-etano) sulfónico
	HIC	cromatografía de interacción hidrófoba
30	IEX	intercambio iónico
	kDa	kiloDaltons
35	l	litros
	LPM	litros por minuto
	ml o ml	mililitro
40	mM	miliMolar
	mS	miliSiemen
45	MWCO	peso molecular de corte
	μm	micrómetro
	N	Normalidad
50	NaCl	cloruro de sodio
	NaOH	hidróxido de sodio
55	NWP	permeabilidad de agua normalizada
	PEG	molécula de polietilenglicol o variante de la misma
	PEG-1	una molécula de B-2036 pegilado con 1 molécula de PEG o variante del mismo
60	PEG-2	una molécula de B-2036 pegilado con 2 moléculas de PEG o variante del mismo
	PEG-3	una molécula de B-2036 pegilado con 3 moléculas de PEG o variante del mismo
65	Peg	una molécula de B-2036 pegilado con 4 moléculas de PEG o variante del mismo
	PEG-5	una molécula de B-2036 pegilado con 5 moléculas de PEG o variante del mismo

ES 2 337 041 T3

	PEG-6	una molécula de B-2036 pegilado con 6 moléculas de PEG o variante del mismo
	PEG-7	una molécula de B-2036 pegilado con 7 moléculas de PEG o variante del mismo
5	PEG-8	una molécula de B-2036 pegilado con 8 moléculas de PEG o variante del mismo
	PEG-9	una molécula de B-2036 pegilado con 9 moléculas de PEG o variante del mismo
	RPHPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
10	DT	desviación típica
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico poliacrilamida
15	SEHPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño
	TMP	rendimiento transmembrana
	TRIS	tris-(2-hidroximetil) aminometano
20	UF/DF	ultrafiltración/diafiltración
	UV	ultravioleta
25	WFI	agua para inyección

La expresión “proteína pegilada” incluye una hormona, hormona del crecimiento, hormona del crecimiento humana, antagonista de la hormona del crecimiento, antagonista de la hormona del crecimiento humana, un anticuerpo (o fragmentos del mismo) y B-2036 PEG. “Proteína pegilada” también incluye una o más proteínas de interés pegiladas en uno o más sitios.

A menos que se indique de otra manera, el término “agregación” se refiere a un grupo similar a espagueti de una o más proteínas de interés, pegiladas o no pegiladas. Una “agregación” es una multiplicidad de moléculas de proteína que se han agrupado a través de una integración estérica o de otra manera la una con la otra. Los ejemplos de “agregación” incluyen enmarañamiento entre (1) una multiplicidad de moléculas de proteína pegilada, (2) una multiplicidad de moléculas de proteína no pegilada y/o (3) al menos una molécula de proteína pegilada y al menos una molécula de proteína no pegilada.

A menos que se indique de otra manera, “impureza de proteína no pegilada” incluye, proteínas no pegiladas, es decir, proteínas sin una molécula de PEG unida o variante de la misma.

A menos que se indique de otra manera, “proporción en peso estequiométrica” se refiere a la cantidad de moléculas de PEG libres a la cantidad de moléculas de proteína no pegilada de interés.

A menos que se indique de otra manera, la expresión “isoforma o isoformas de proteína pegilada” se refiere a una proteína de interés que tiene uno o más restos de PEG unidos a la misma, preferiblemente mediante unión covalente. Por ejemplo, el término “PEG-1” se refiere a B-2036 que tiene una molécula de PEG unida al mismo, preferiblemente en una posición tal como un resto de aminoácido lisina y/o el extremo amino. Análogamente, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 se refieren al número de moléculas de PEG unidas a una molécula de B-2036. Por tanto, PEG-2 se refiere a un B-2036 que tiene dos moléculas de PEG unidas al mismo y PEG-3 se refiere a tres moléculas de PEG unidas a una molécula de B-2036 y así sucesivamente.

A menos que se indique de otra manera, la expresión “volumen de lecho cargado” se refiere a un volumen de lecho cargado de una resina particular cargada de acuerdo con las condiciones de funcionamiento sugeridas por el fabricante.

A menos que se indique de otra manera, la expresión “impureza de isoforma” se refiere a al menos a la impureza de isoforma trisulfuro o la impureza de isoforma des-phe descritas en este documento. La expresión “impureza de isoforma” también puede incluir otras impurezas reconocidas en la técnica.

La expresión “conductividad de conjunto de CE” se refiere a la medición de conductividad de la fracción de CV recogida que se está sometiendo a CE.

Las expresiones “antagonista de la hormona del crecimiento” y “antagonista del receptor de la hormona del crecimiento” incluyen polipéptidos pegilados y polipéptidos que inhiben o, de otra manera, antagonizan la unión de la hormona del crecimiento a su receptor de la hormona del crecimiento para bloquear el efecto o los efectos biológicos de la hormona del crecimiento. Preferiblemente, el “antagonista de la hormona del crecimiento” pegilado o “el

antagonista del receptor de la hormona del crecimiento” pegilado es B-2036 pegilado, B-2036 o una variante de los mismos. “Variantes” incluye homólogos (particularmente homólogos con sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos conservativas con relación a B-2036), análogos, fragmentos, etc. de los mismos (respectivamente) que tienen actividad antagonista del receptor de la hormona del crecimiento.

Las expresiones “agonista de la hormona del crecimiento” y “agonista del receptor de la hormona del crecimiento” incluyen polipéptidos pegilados y polipéptidos que se unen y activan a su receptor de la hormona del crecimiento. Preferiblemente, el “agonista de la hormona del crecimiento” o el “agonista del receptor de la hormona del crecimiento” es hormona del crecimiento humana pegilada, hormona del crecimiento humana o una variante de las mismas. “Variantes” incluye homólogos (particularmente homólogos con sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos conservativas con relación a la hormona del crecimiento humana), análogos, fragmentos, pseudopéptidos, anticuerpos, etc. (respectivamente) que tienen actividad agonista del receptor de la hormona del crecimiento.

El término “y” puede significar “y” u “o” según sea apropiado o necesario para describir un procedimiento para producir la disminución deseada en el nivel de la impureza pertinente (por ejemplo, impureza de isoforma y/o agregación trisulfuro o des-phe).

El término “o” puede significar “y” u “o” según sea apropiado o necesario para describir un procedimiento para producir la disminución deseada en el nivel de la impureza pertinente (por ejemplo, impureza de isoforma y/o agregación trisulfuro o des-phe).

Como se usa en este documento, a menos que se indique de otra manera, el término “disminución” (o variaciones evidentes de la misma) se refiere a mantener, eliminar, minimizar, reducir, evitar, invertir y/o atenuar la cantidad del nivel de “agregación” de la proteína pegilada de interés y/o de la impureza de isoforma pertinente, bien sea la impureza de isoforma trisulfuro o la impureza de isoforma des-phe.

A menos que se indique de otra manera, la expresión “célula huésped” (o variaciones evidentes de la misma) se refiere a cualquier célula huésped en la que se puede formar B-2036 recombinante o hGH recombinante. Por consiguiente, la célula huésped puede ser una célula huésped de mamífero, una célula de huésped vegetal o una célula huésped microbiana tal como *E. coli* o incluso células de levadura. Es importante indicar que la célula huésped es una que sea suficiente para desarrollar el componente proteico de B-2036 recombinante o hGH recombinante deseados en la misma. Como tal, no existe limitación con respecto a cuál puede ser la célula huésped excepto que sea una capaz de producir de forma recombinante el componente proteico de B-2036 o hGH recombinante de interés o “variantes” de los mismos.

Adicionalmente, como se usa en este documento, a menos que se indique de otra manera, el término “crecer” (o variaciones evidentes del mismo, por ejemplo, crecimiento) incluye, fermentar y cultivar o de otra manera provocar que la célula o las células huésped proliferen de forma suficiente para producir cantidades deseadas del componente proteico de B-2036 recombinante o hGH recombinante.

Además, aunque la presente invención se describe con respecto a B-2036 recombinante y B-2036 PEG recombinante, a menos que se indique de otra manera, se aprecia que la invención objeto se puede usar con cualquier antagonista de la hormona del crecimiento recombinante, ya sea antagonista de la hormona del crecimiento de mamífero, antagonista de la hormona del crecimiento humana o antagonista de la hormona del crecimiento bovina, etc.

Pegvisomant (denominado en este documento PEG B-2036 o B-2036 PEG) es la forma pegilada de proteína recombinante (B-2036) producida en células huésped recombinantes (por ejemplo, células huésped de *E. coli* recombinantes modificadas genéticamente). La proteína de B-2036 se produce durante el crecimiento (por ejemplo, mediante fermentación) y expresión (síntesis y secreción) celular. Después de su producción, B-2036 se aísla (por ejemplo, mediante homogenización) seguido por purificación (por ejemplo, mediante extracción, centrifugación, cromatografía de fase inversa e intercambio aniónico e intercambio de tampón). Sin embargo, como se ha observado durante la producción recombinante de la proteína de B-2036, se forman impurezas de isoforma de B-2036 indeseables, las cuales son las impurezas de isoforma trisulfuro y des-phe de B-2036.

Como se observa, la Figura 1A ilustra la secuencia de aminoácidos de B-2036 con las abreviaturas de 1 letra convencionales que indican qué aminoácidos están presentes en qué posición de cada letra. Para referencia, véase la Tabla 1 más adelante que indica la correspondencia entre la letra y su aminoácido asociado.

ES 2 337 041 T3

TABLA 1

	Aminoácido de Polipéptido
5	Ala (A)
10	Glu (E)
	Gln (Q)
	Asp (D)
15	Asn(N)
	Leu (L)
	Gly (G)
20	Lys (K)
	Ser (S)
	Val (V)
25	Arg (R)
	Thr(T)
30	Pro (P)
	Ile (I)
	Met (M)
35	Phe (F)
	Tyr (Y)
	Cys (C)
40	Trp (W)
	His (H)

Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de B-2036 se proporciona en este documento como SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de hGH se proporciona en este documento como SEC ID N° 2.

1. Antagonista de la Hormona del Crecimiento Recombinante y su Impureza de Isoforma Trisulfuro

La Figura 1B ilustra la estructura de la secuencia de aminoácidos de la impureza de isoforma trisulfuro de B-2036. En particular, la impureza de isoforma trisulfuro contiene un átomo de azufre adicional en el puente entre las cisteínas en las posiciones 182 y 189 del componente proteico de B-2036.

a. Disminución de Impureza de Isoforma Trisulfuro con Compuesto o Compuestos Mercapto

Sin estar limitado por la teoría, se cree que el contacto entre compuesto o compuestos mercapto seleccionados y la impureza de isoforma trisulfuro del antagonista de la hormona del crecimiento recombinante B-2036 da como resultado la conversión del puente trisulfuro cisteína-S-S-S-cisteína de nuevo en su forma nativa cisteína-S-S-cisteína. Adicionalmente, también sin estar limitado por la teoría, es posible que la presencia del compuesto o los compuestos mercapto evite la formación adicional del mismo puente trisulfuro.

Típicamente, el compuesto o los compuestos mercapto se añaden a la célula o las células huésped sintetizando el componente proteico de B-2036 recombinante deseado durante o después (o durante y después) del crecimiento de la célula o células huésped. Además, después de que se han conducido las etapas de crecimiento y contacto, es preferible purificar la proteína de B-2036. A partir de entonces, la proteína purificada preferiblemente se pegila para producir PEG B-2036 (pegvisomant). Para procedimientos de pegilación véase la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535 y la Patente de Estados Unidos N° 5.672.662.

Se puede usar cualquier compuesto mercapto en relación con la presente invención que, cuando se ponga en contacto (preferiblemente con mezcla adecuada) con el componente proteico de B-2036 junto con su impureza de isoforma trisulfuro, sea uno que sea suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro, (preferiblemente sin degradar (o degradar sustancialmente) la producción de B-2036). Los compuestos mercapto preferidos adecuados para uso con la presente invención incluyen sulfitos, glutatión, beta-mercaptoetanol, ditioneitol, mercaptoetilamina, ditioneitol, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, cisteína y cisteína en combinación con cistina.

Otros compuestos mercapto adecuados para uso con la presente invención se indican en las siguientes referencias: (1) J. Houk y G. M. Whitesides, "Structure-Reactivity Relations for Thiol-Disulfide Interchange", J. M. Chem. Soc., 109: 6825-6836 (1987); (2) Sigmund, M., The Chemistry & Biochemistry of the Sulfhydro Group in Amino Acids, Peptides and Proteins, 1ª Ed. Pergamon, Nueva York (1973). En particular, véase la Tabla II de Houk y col. identificada en el artículo (1) anteriormente para una lista de compuestos mercapto ejemplares adecuados para uso con la presente invención.

De los compuestos mercapto adecuados, cisteína o cisteína en combinación con cistina (cisteína dimerizada), es la más preferida. La cantidad de cisteína o combinación de cisteína y cistina (cisteína dimerizada, si existe alguna) que es adecuada para uso con la presente invención debe ser esa cantidad que sea suficiente para disminuir la impureza de isoforma trisulfuro en al menos aproximadamente el 10% de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta, cuando se promedian múltiples lotes) formada. Preferiblemente, la disminución en la cantidad de la impureza de isoforma trisulfuro es al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40% o el 50% respectivamente, de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta) formada. La concentración combinada inicial de cisteína y cualquier cistina adecuada para uso con la presente invención preferiblemente es al menos aproximadamente 0,1 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, respectivamente.

Es preferible proporcionar el compuesto mercapto en un tampón. Preferiblemente, el tampón es uno que es adecuado para uso con la presente invención, es decir, que no evita la formación del componente proteico de B-2036 o lo degrada una vez que se ha formado. Los tampones adecuados para uso en relación con la presente invención incluyen, pero sin limitación, Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina. El tampón preferido es Tris. La concentración de tampón inicial preferida es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, incluso más preferiblemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 70 mM y lo más preferible es que sea de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Se pueden usar otros tampones adecuados. Preferiblemente, estos tampones son suficientes para mantener el pH del medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5 o de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0, respectivamente. En particular, cuando se usan concentraciones altas de compuesto mercapto, se pueden tolerar niveles de pH más altos, por ejemplo, tan altos como aproximadamente 9,5. Por tanto, por ejemplo, si se usa un exceso grande de cisteína a B-2036, entonces el pH del tampón puede ser tan alto como aproximadamente 9,5.

Como se ha indicado anteriormente, es preferible proporcionar el compuesto mercapto en un tampón. Adicionalmente, la cantidad del compuesto mercapto en el tampón debe ser tal que la proporción molar de los moles de compuesto mercapto a los moles de proteína de B-2036 sea de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1.000. Esto es especialmente cierto cuando el compuesto mercapto que se está usando es una combinación de cisteína y, opcionalmente, cisteína en combinación con cistina. Como alternativa, la proporción molar de los moles de compuesto mercapto a los moles de proteína de B-2036 puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente (para disminuir el nivel de impureza de isoforma trisulfuro) entre el compuesto mercapto y el componente proteico de B-2036 (dentro o partir de la célula o células huésped) se ha completado, el componente proteico de B-2036 en el tampón tiene una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, respectivamente.

Además, el intervalo de temperatura del medio de cultivo junto con el tampón, el compuesto o los compuestos mercapto y sus otros contenidos incluyendo, pero sin limitación, B-2036, se debe mantener a una temperatura preferiblemente de aproximadamente 0°C a aproximadamente 25°C después de que el compuesto mercapto se ha añadido a la célula o células huésped o lisado de las mismas que contiene el componente proteico de B-2036. También, preferiblemente, la temperatura de la célula o células huésped y/o el lisado a partir de las mismas que contiene el componente de B-2036 se mantiene de aproximadamente 1°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 2°C a aproximadamente 10°C o de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C, respectivamente. Es importante observar que la desnaturalización de la proteína de B-2036 ocurre a aproximadamente 40+°C. Como tal, es deseable mantener la temperatura del homogenado (es decir, que contiene células huésped, medio de cultivo, tampón, compuestos mercapto y B-2036, etc.) en una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteína de B-2036.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre el componente de B-2036 y el compuesto mercapto debe ser durante un tipo suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro. Los tiempos de contacto adecuados ejemplares para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro deben ser durante al menos aproximadamente

ES 2 337 041 T3

30 minutos, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente entre el compuesto o los compuestos mercapto y el componente de B-2036, el tampón que contiene el mismo tiene un volumen de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 5.000 litros, de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 500 litros o de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 300 litros, respectivamente. Otros volúmenes ejemplares adecuados pueden ser cualquiera de 160 litros a aproximadamente 500 litros.

Otros parámetros que pueden ser de interés durante el contacto entre el compuesto o los compuestos mercapto y el componente de B-2036 incluyen cosas tales como la velocidad de la mezcla. La velocidad de la mezcla debe ser aquella que sea suficiente para formar una mezcla homogénea (de la célula o células huésped, lisado de las mismas, tampón, compuesto o compuestos mercapto, el componente de B-2036 y cualquier otro componente en un medio de cultivo) a la vez que minimiza la cantidad de espuma que se puede formar. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente cuál debe ser una velocidad de mezcla suficiente. Obviamente, la velocidad de mezcla debe ser tal que la temperatura se mantenga en los intervalos indicados anteriormente y se minimice cualquier degradación del componente proteico de B-2036.

b. Disminución de Impureza de Isoforma Trisulfuro con Agente o Agentes Quelantes

Sin estar limitado por la teoría, se cree que el contacto entre agente o agentes quelantes seleccionados y (1) la impureza de isoforma trisulfuro, (2) el antagonista de la hormona del crecimiento recombinante B-2036, (3) componente o componentes celulares de células huésped (para producción recombinante del antagonista) y (4) todas las combinaciones de (1)-(3) da como resultado la conversión del puente trisulfuro de cisteína-S-S-S-cisteína de nuevo en su forma nativa de cisteína-S-S-cisteína o la disminución de los niveles de la impureza. Adicionalmente, también sin estar limitado por la teoría, es posible que la presencia del agente o agentes quelantes evite la formación adicional del mismo puente trisulfuro.

Típicamente, el agente o los agentes quelantes se añaden a la célula o células huésped que sintetizan el componente proteico de B-2036 recombinante deseado durante o después (o durante y después) del cultivo de la célula o células huésped. Además, después de que se han conducido las etapas de cultivo y contacto, es preferible purificar la proteína de B-2036. A partir de entonces, la proteína purificada preferiblemente se pega para producir PEG B-2036 (pegvisomant). Para procedimientos de pegilación véase la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535.

Se puede usar cualquier agente quelante en relación con la presente invención que, cuando se ponga en contacto (preferiblemente con mezcla adecuada) con el componente proteico de B-2036 junto con su impureza de isoforma trisulfuro, sea uno que sea suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro, preferiblemente sin degradar (o degradar sustancialmente) la producción de B-2036. Los agentes quelantes preferidos adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, EDTA, EGTA y DTPA. Los agentes quelantes ejemplares adicionales incluyen, pero sin limitación, Deferoxamina, Ditiocarb Sódico, Edetato de Calcio Disódico, Edetato Disódico, Edetato Sódico, Edetato Trisódico, Penicilamina, Pentetato de Calcio Trisódico, Ácido Pentético, Succímero y Trientina. Se ha de observar que el Edetato Sódico es la forma de sal de EDTA.

Otros agentes quelantes adecuados para uso con la presente invención se indican en las siguientes referencias: (1) The Merck Index, 12ª Edición, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, pág. THER-19 (bajo "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (3) "The United States Pharmacopeia, Revisión 21" (16ª Edición), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); y (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin ediciones (2000-2001) y (2002-2003) de la misma.

De los agentes quelantes adecuados, EDTA es el más preferido. La cantidad de agente quelante que es adecuada para uso con la presente invención debe ser esa cantidad que sea suficiente para disminuir la impureza de isoforma trisulfuro en al menos aproximadamente el 10% de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta, cuando se promedian múltiples lotes) formada. Preferiblemente, la disminución en la cantidad de la impureza de isoforma trisulfuro es al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40% o el 50% respectivamente, de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta) formada. La concentración inicial de EDTA adecuada para uso con la presente invención preferiblemente es al menos aproximadamente 0,01 mM, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mM, respectivamente.

Se prefiere proporcionar el agente quelante en un tampón. Preferiblemente, el tampón es uno que sea adecuado para uso con la presente invención, es decir, que no evite la formación del componente proteico de B-2036 o lo degrade

una vez que se ha formado. Los tampones adecuados para uso en relación con la presente invención incluyen, Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina. El tampón preferido es Tris. La concentración de tampón inicial preferida es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 70 mM y lo más preferible es que sea de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Se pueden usar otros tampones adecuados. Preferiblemente, estos tampones son suficientes para mantener el pH del medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,5, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, se prefiere proporcionar el agente quelante en un tampón. Además, la cantidad del agente quelante en el tampón debe ser tal que la proporción molar de los moles de agente quelante a los moles de proteína de B-2036 sea de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000. Como alternativa, la proporción molar de los moles de agente quelante a los moles de proteína de B-2036 puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 o de aproximadamente 60 a aproximadamente 110, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente (para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro) entre el agente quelante y el componente proteico de B-2036 (dentro o a partir de la célula o células huésped se ha completado), el componente proteico de B-2036 en el tampón tiene una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, respectivamente.

Además, el intervalo de temperatura del medio de cultivo junto con el tampón, el agente o los agentes quelantes y sus otros contenidos incluyendo, pero sin limitación, B-2036, se debe mantener a una temperatura preferiblemente de aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C después de que el agente quelante se ha añadido a la célula o células huésped o el lisado de las mismas que contiene el componente proteico de B-2036. También, preferiblemente, la temperatura de la célula o células huésped y/o el lisado a partir de las mismas que contiene el componente de B-2036 se mantiene de aproximadamente 1°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 2°C a aproximadamente 10°C o de aproximadamente 2°C a aproximadamente 15°C, respectivamente. Se observa que, preferiblemente, tras la adición del agente quelante (por ejemplo, EDTA), cuya temperatura es de aproximadamente 4°C, la temperatura del homogenado que contiene el B-2036 aumenta hasta aproximadamente 30°C tras la homogeneización. Es importante observar que la desnaturalización de la proteína de B-2036 ocurre a aproximadamente 40°C. Como tal, es deseable mantener la temperatura del homogenado (es decir, que contiene células huésped, medio de cultivo, tampón, agentes quelantes y B-2036, etc.) en una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteína de B-2036.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre el componente de B-2036 y el agente quelante debe ser durante un tiempo suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro. Los tiempos de contacto adecuados ejemplares para disminuir el nivel de impureza de isoforma trisulfuro deben ser de al menos aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 48 horas o desde aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 15 horas, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente entre el agente o los agentes quelantes y el componente de B-2036, el tampón que contiene el mismo tiene un volumen de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 5.000 litros, de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 500 litros o de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 300 litros, respectivamente. Otros volúmenes ejemplares adecuados pueden ser de 160 litros a aproximadamente 500 litros.

Otros parámetros que pueden ser de interés durante el contacto entre el agente o los agentes quelantes y el componente de B-2036 incluyen cosas tales como la velocidad de mezcla. La velocidad de mezcla debe ser aquella que sea suficiente para formar una mezcla homogénea (de la célula o células huésped, el lisado de las mismas, tampón, agente o agentes quelantes, el componente de B-2036 y cualquier otro componente en el medio de cultivo) mientras minimiza la cantidad de espuma que se puede formar. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente cuál debe ser una velocidad de mezcla suficiente. Obviamente, la velocidad de mezcla debe ser tal que la temperatura se mantenga en los intervalos indicados anteriormente y se minimice cualquier degradación del componente proteico de B-2036.

c. Disminución de Impureza de Isoforma Trisulfuro con Sal o Sales Metálicas

Sin estar limitado por la teoría, se cree que el contacto entre la sal o sales metálicas seleccionadas y (1) la impureza de isoforma trisulfuro, (2) el antagonista de la hormona del crecimiento recombinante B-2036, (3) componente o componentes celulares de células huésped (para producción recombinante del antagonista) y (4) todas las combinaciones de (1) - (3) da como resultado la conversión del puente trisulfuro cisteína-S-S-S-cisteína de nuevo en su forma nativa cisteína-S-S-cisteína o la disminución de los niveles de la impureza. Adicionalmente, también sin estar limitado por la teoría, es posible que la presencia de la sal o sales metálicas evite la formación adicional del mismo puente trisulfuro.

Típicamente, se añade la sal o las sales metálicas a la célula o células huésped que sintetizan el componente proteico de B-2036 recombinante deseado durante o después (o durante y después) el cultivo de la célula o células huésped. Además, después de que se han conducido las etapas de cultivo y contacto, es preferible purificar la proteína de B-2036. A partir de entonces, la proteína purificada preferiblemente se pega para producir PEG B-2036 (pegvisomant).
 5 Para procedimientos de pegilación véase la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535.

Se puede usar cualquier sal metálica en relación con la presente invención que, cuando se ponga en contacto (preferiblemente con mezcla adecuada) con el componente proteico de B-2036 junto con su impureza de isoforma trisulfuro, sea una que sea suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro, preferiblemente
 10 sin degradar (o degradar sustancialmente) la producción de B-2036. La sal o sales metálicas adecuadas para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, sal o sales de metales alcalinos, sal o sales de metales alcalino-térreos, sal o sales de metales de transición y combinaciones de los mismos. Las sales metálicas preferidas adecuadas para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfato potásico, acetato potásico, fosfato sódico, acetato sódico, cloruro de cinc y combinaciones de los mismos.

Otras sales metálicas adecuadas se indican en las siguientes referencias: (1) The Merck Index, 12ª Edición, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, pág. THER-19 (bajo "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (3) "The United States Pharmacopeia, Revisión 21" (16ª Edición), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); y (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin ediciones (2000-2001) y (2002-2003) de la misma.
 25

De las sales metálicas adecuadas para uso con la presente invención el fosfato sódico, ZnCl_2 y las combinaciones de los mismos también son preferidos. La cantidad de sal o sales metálicas adecuada para uso con la presente invención debe ser esa cantidad que sea suficiente para disminuir la impureza de isoforma trisulfuro en al menos aproximadamente el 10% de su concentración más alta (o su concentración promedio más alta, cuando se promedian múltiples lotes) formada. Preferiblemente, la disminución en la cantidad de la impureza de la isoforma trisulfuro es al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40% o el 50%, respectivamente, de su concentración más alta (o su concentración promedio más alta) formada. La concentración inicial de sal metálica (por ejemplo, fosfato sódico) adecuada para uso con la presente invención preferiblemente es al menos aproximadamente 0,1 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM o de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mM, respectivamente.
 30
 35

Es preferible proporcionar la sal metálica en un tampón. Sin embargo, el fosfato sódico puede actuar tanto como un tampón como una sal metálica adecuada. Sin embargo, se pueden añadir sal o sales metálicas adecuadas adicionales al tampón de fosfato sódico. Preferiblemente, el tampón es uno que sea adecuado para uso con la presente invención, es decir, que no evite la formación del componente proteico de B-2036 o que lo degrade una vez que se ha formado. Los tampones adecuados para uso en relación con la presente invención incluyen, pero sin limitación, Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina. La concentración de tampón inicial preferida es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 70 mM y lo más preferible es que sea de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Se pueden usar otros tampones adecuados. Preferiblemente, estos tampones son suficientes para mantener el pH del medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, respectivamente.
 40
 45
 50

Después de que la sal metálica se proporciona en un tampón (o en el caso de NaP, donde la solución de NaP actúa tanto como la sal metálica como el tampón), la cantidad de la sal metálica en el tampón (o solución de NaP que también actúa como tampón) debe ser tal que la proporción molar de los moles de sal metálica a los moles de proteína de B-2036 sea de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000. Como alternativa, la proporción molar de los moles de la sal metálica a los moles de la proteína de B-2036 puede ser de aproximadamente 300 a aproximadamente 10.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500, respectivamente.
 55

Típicamente, después del contacto suficiente (para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro) entre la sal o sales metálicas y el componente proteico de B-2036 (dentro o a partir de que la célula o células huésped se han completado), el componente proteico de B-2036 en el tampón tiene una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, respectivamente.
 60

Además, el intervalo de temperatura del medio de cultivo junto con el tampón, la sal o sales metálicas y sus otros contenidos incluyendo, pero sin limitación, B-2036, preferiblemente se debe mantener en una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C después de que la sal metálica se ha añadido a la célula o células huésped o lisado de las mismas que contienen el componente proteico de B-2036. También, preferiblemente, la temperatura de
 65

la célula o células huésped y/o el lisado a partir de las mismas que contiene el componente de B-2036 se mantiene de aproximadamente 1°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 2°C a aproximadamente 10°C o de aproximadamente 2°C a aproximadamente 15°C, respectivamente. Se observa que tras la homogenización con la sal metálica (por ejemplo, NaP) la temperatura del homogenado puede aumentar. Es importante observar que la desnaturalización de la proteína de B-2036 ocurre a aproximadamente 40+°C. Como tal, es deseable mantener la temperatura del homogenado (es decir, que contiene células huésped, medio de cultivo, tampón, sal metálica, B-2036 y opcionalmente compuesto mercapto, etc.) en una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteína de B-2036.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre el componente de B-2036 y el agente quelante debe ser durante un tiempo suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma trisulfuro. Los tiempos de contacto adecuados ejemplares para disminuir el nivel de impureza de isoforma trisulfuro deben ser durante al menos aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 48 horas o desde aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 15 horas, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente entre la sal o sales metálicas y el componente de B-2036, el tampón que contiene el mismo tiene un volumen de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 5.000 litros, de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.000 litros o de aproximadamente 200 litros a aproximadamente 1.500 litros, respectivamente.

Otros parámetros que pueden ser de interés durante el contacto entre la sal o sales metálicas y el componente de B-2036 incluyen cosas tales como la velocidad de mezcla. La velocidad de mezcla debe ser aquella que sea suficiente para formar una mezcla homogénea (de la célula o células huésped, el lisado de las mismas, tampón, sal o sales metálicas, el componente de B-2036 y cualquier otro componente en el medio de cultivo) mientras que minimiza la cantidad de espuma que se puede formar. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente cuál debe ser una velocidad de mezcla suficiente. Obviamente, la velocidad de mezcla debe ser tal que la temperatura se mantenga en los intervalos indicados anteriormente y se minimice cualquier degradación del componente proteico de B-2036.

2. Antagonista de la Hormona del Crecimiento Recombinante y su Impureza de Isoforma Des-phe

a. Disminución de Impureza de Isoforma Des-phe con Agente Quelante

Sin estar limitado por la teoría, se cree que la adición de agente o agentes quelantes al antagonista de la hormona del crecimiento recombinante B-2036 da como resultado una disminución del nivel de la impureza de isoforma des-phe mediante una reducción real del nivel de la misma y/o la prevención de formación de des-phe adicional.

Típicamente, el agente o los agentes quelantes se añaden a la célula o células huésped que sintetizan el componente proteico de B-2036 recombinante deseado durante o después (o durante y después) del cultivo de la célula o células huésped. Además, después de que se han conducido las etapas de cultivo y contacto, es preferible purificar la proteína de B-2036. A partir de entonces, la proteína purificada preferiblemente se pegila para producir PEG B-2036 (pegvisomant). Para procedimientos de pegilación véase la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535.

Se puede usar cualquier agente quelante en relación con la presente invención el cual, cuando se pone en contacto (preferiblemente con mezcla adecuada) con el componente proteico de B-2036 junto con su impureza de isoforma des-phe, es uno que es suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe, preferiblemente sin degradar (o degradar sustancialmente) la producción de B-2036. Los agentes quelantes preferidos adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, EDTA, EGTA y DTPA. Los agentes quelantes ejemplares adicionales incluyen, pero sin limitación, Deferoxamina, Ditiocarb Sódico, Edetato de Calcio Disódico, Edetato Disódico, Edetato Sódico, Edetato Trisódico, Penicilamina, Pentetato de Calcio Trisódico, Ácido Pentético, Succímero y Trientina. Se ha de observar que el Edetato Sódico es la forma de sal de EDTA.

Otros agentes quelantes adecuados para uso adecuado con la presente invención se indican en las siguientes referencias: (1) The Merck Index, 12ª Edición, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, pág. THER-19 (bajo "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (3) "The United States Pharmacopeia, Revisión 21" (16ª Edición), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); y (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin ediciones (2000-2001) y (2002-2003) de la misma.

De los agentes quelantes adecuados, EDTA es el más preferido. La cantidad de agente quelante que es adecuada para uso con la presente invención debe ser esa cantidad que sea suficiente para disminuir la impureza de isoforma des-phe en al menos aproximadamente el 10% de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta, cuando se promedian múltiples lotes) formada. Preferiblemente, la disminución en la cantidad de la impureza de isoforma des-phe es al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40% o el 50% respectivamente, de su concentración de equilibrio más alta (o su concentración de equilibrio promedio más alta) formada. La concentración

inicial de EDTA adecuada para uso con la presente invención preferiblemente es al menos de aproximadamente 0,01 mM, de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mM, respectivamente.

5 Se prefiere proporcionar el agente quelante en un tampón. Preferiblemente, el tampón es uno que es adecuado para uso con la presente invención, es decir, que no evita la formación del componente proteico de B-2036 o lo degrada una vez que se ha formado. Los tampones adecuados para uso en relación con la presente invención incluyen, pero sin limitación, Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina. El tampón preferido es Tris. La concentra-
10 ción de tampón inicial preferida es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aún más preferiblemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 70 mM y lo más preferible es que sea de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Se pueden usar otros tampones adecuados. Preferiblemente, estos tampones son suficientes para mantener el pH del medio de cul-
15 tivo en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,5, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, se prefiere proporcionar el agente quelante en un tampón. Además, la cantidad del agente quelante en el tampón debe ser tal que la proporción molar de los moles de agente quelante a los moles de proteína de B-2036 sea de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000. Como alternativa, la proporción molar
20 de los moles de agente quelante a los moles de proteína de B-2036 puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 o de aproximadamente 60 a aproximadamente 110, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente (para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe) entre
25 el agente quelante y el componente proteico de B-2036 (dentro o a partir de que la célula o células huésped se han completado), el componente proteico de B-2036 en el tampón tiene una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, respectivamente.

Además, el intervalo de temperatura del medio de cultivo junto con el tampón, el agente o los agentes quelantes y sus otros contenidos incluyendo, pero sin limitación, B-2036, se debe mantener a una temperatura preferiblemente de aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C después de que el agente quelante se ha añadido a la célula o células huésped o lisado de las mismas que contiene el componente proteico de B-2036. También, preferiblemente,
30 la temperatura de la célula o células huésped y/o el lisado a partir de las mismas que contiene el componente de B-2036 se mantiene de aproximadamente 1°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 2°C a aproximadamente 10°C o de aproximadamente 2°C a aproximadamente 15°C, respectivamente. Se observa que, preferiblemente, tras la adición del agente quelante (por ejemplo, EDTA), cuya temperatura es de aproximadamente 4°C, la temperatura del homogenado que contiene el B-2036 aumenta hasta aproximadamente 30°C tras la homogeneización. Es importante
35 observar que la desnaturalización de la proteína de B-2036 ocurre a aproximadamente 40+°C. Como tal, es deseable mantener la temperatura del homogenado (es decir, que contiene células huésped, medio de cultivo, tampón, agentes quelantes y B-2036, etc.) en una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteína de B-2036.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre el componente de B-2036 y el agente quelante debe ser durante un tiempo suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe. Los tiempos de contacto adecuados
45 ejemplares para disminuir el nivel de impureza de isoforma des-phe deben ser de al menos aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 48 horas o desde aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 15 horas, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente entre el agente o los agentes quelantes y el componente de B-2036,
50 el tampón que contiene el mismo tiene un volumen de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 5.000 litros, de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 500 litros o de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 300 litros, respectivamente. Otros volúmenes ejemplares adecuados pueden ser de 160 litros a aproximadamente 500 litros.

Otros parámetros que pueden ser de interés durante el contacto entre el agente o los agentes quelantes y el compo-
55 nente de B-2036 incluyen cosas tales como la velocidad de mezcla. La velocidad de mezcla debe ser aquella que sea suficiente para formar una mezcla homogénea (de la célula o células huésped, el lisado de las mismas, tampón, agente o agentes quelantes, el componente de B-2036 y cualquier otro componente en el medio de cultivo) mientras minimiza la cantidad de espuma que se puede formar. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente cuál debe ser
60 una velocidad de mezcla suficiente. Obviamente, la velocidad de mezcla debe ser tal que la temperatura se mantenga en los intervalos indicados anteriormente y se minimice cualquier degradación del componente proteico de B-2036.

b. *Disminución de Impureza de Isoforma Des Phe con Sal Metálica*

65 Sin estar limitado por la teoría, se cree que la adición de sal o sales metálicas al antagonista de la hormona del crecimiento humana recombinante B-2036 da como resultado una disminución en el nivel de la impureza de isoforma des-phe mediante una reducción real en el nivel de la misma y/o la prevención de formación adicional de des-phe.

Típicamente, se añade la sal o las sales metálicas a la célula o células huésped que sintetizan el componente proteico de B-2036 recombinante deseado durante o después (o durante y después) del cultivo de la célula o células huésped. Además, después de que se han conducido las etapas de cultivo y contacto, es preferible purificar la proteína de B-2036. A partir de entonces, la proteína purificada preferiblemente se pegila para producir PEG B-2036 (pegvisomant).

5 Para procedimientos de pegilación véase la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535.

Se puede usar cualquier sal metálica en relación con la presente invención que, cuando se ponga en contacto (preferiblemente con mezcla adecuada) con el componente proteico de B-2036 junto con su impureza de isoforma des-phe, sea una que sea suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe, preferiblemente sin degradar (o degradar sustancialmente) la producción de B-2036. La sal o sales metálicas adecuadas para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, sal o sales de metales alcalinos, sal o sales de metales alcalino-térreos, sal o sales de metales de transición y combinaciones de los mismos. Las sales metálicas preferidas adecuadas para uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfato potásico, acetato potásico, fosfato sódico, acetato sódico, cloruro de cinc y combinaciones de los mismos.

15 Otras sales metálicas adecuadas se indican en las siguientes referencias: (1) The Merck Index, 12ª Edición, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, pág. THER-19 (bajo "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (3) The United States Pharmacopeia, 21ª Revisión (16ª Edición), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) y todas y cada una de las ediciones posteriores a la fecha de la misma; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); y (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin ediciones (2000-2001) y (2002-2003) de la misma.

25 De las sales metálicas adecuadas para uso con la presente invención el fosfato sódico, ZnCl_2 y las combinaciones de los mismos también son preferidos. La cantidad de sal o sales metálicas adecuada para uso con la presente invención debe ser esa cantidad que sea suficiente para disminuir la impureza de isoforma des-phe en al menos aproximadamente el 10% de su concentración más alta (o su concentración promedio más alta, cuando se promedian múltiples lotes) formada. Preferiblemente, la disminución en la cantidad de la impureza de la isoforma des-phe es al menos aproximadamente el 20%, el 30%, el 40% o el 50% respectivamente, de su concentración más alta (o su concentración promedio más alta) formada. La concentración inicial de sal metálica (por ejemplo, fosfato sódico) adecuada para uso con la presente invención preferiblemente es al menos aproximadamente 0,1 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM o de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 mM, respectivamente.

Es preferible proporcionar la sal metálica en un tampón. Sin embargo, el fosfato sódico puede actuar tanto como un tampón como una sal metálica adecuada. Sin embargo, se pueden añadir sal o sales metálicas adecuadas adicionales al tampón de fosfato sódico. Preferiblemente, el tampón es uno que sea adecuado para uso con la presente invención, es decir, que no degrade la formación del componente proteico de B-2036. Los tampones adecuados para uso en relación con la presente invención incluyen, pero sin limitación, Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina. La concentración de tampón inicial preferida es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM; aún más preferiblemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 70 mM y lo más preferible es que sea de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. Se pueden usar otros tampones adecuados. Preferiblemente, estos tampones son suficientes para mantener el pH del medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 9, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5 o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, respectivamente.

50 Después de que la sal metálica se proporciona en un tampón (o en el caso de NaP, donde la solución de NaP actúa tanto como la sal metálica como el tampón), la cantidad de la sal metálica en el tampón (o solución de NaP que también actúa como tampón) debe ser tal que la proporción molar de los moles de sal metálica a los moles de proteína de B-2036 sea de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000. Como alternativa, la proporción molar de los moles de la sal metálica a los moles de la proteína de B-2036 puede ser de aproximadamente 300 a aproximadamente 10.000, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente (para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe) entre la sal o sales metálicas y el componente proteico de B-2036 (dentro o a partir de que la célula o células huésped se han completado), el componente proteico de B-2036 en el tampón tiene una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, respectivamente.

65 Además, el intervalo de temperatura del medio de cultivo junto con el tampón, la sal o sales metálicas y sus otros contenidos incluyendo, pero sin limitación, B-2036, preferiblemente se debe mantener en una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C después de que la sal metálica se ha añadido a la célula o células huésped o lisado de las mismas que contienen el componente proteico de B-2036. También, preferiblemente, la temperatura de la célula o células huésped y/o el lisado a partir de las mismas que contiene el componente de B-2036 se mantiene

ES 2 337 041 T3

desde aproximadamente 1°C hasta aproximadamente 15°C, desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 10°C o desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 15°C, respectivamente. Se observa que tras la homogenización con la sal metálica (por ejemplo, NaP) la temperatura del homogenado puede aumentar. Es importante observar que la desnaturalización de la proteína de B-2036 ocurre a aproximadamente 40+°C. Como tal, es deseable mantener la temperatura del homogenado (es decir, que contiene células huésped, medio de cultivo, tampón, sal metálica, B-2036 y opcionalmente compuesto mercapto, etc.) en una temperatura inferior a la temperatura de desnaturalización de la proteína de B-2036.

Adicionalmente, el tiempo de contacto entre el componente de B-2036 y la sal metálica debe ser durante un tiempo suficiente para disminuir el nivel de la impureza de isoforma des-phe. Los tiempos de contacto adecuados ejemplares para disminuir el nivel de impureza de isoforma des-phe deben ser durante al menos aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 48 horas o desde aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 15 horas, respectivamente.

Típicamente, después del contacto suficiente entre la sal o sales metálicas y el componente de B-2036, el tampón que contiene el mismo tiene un volumen de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 3.000 litros, de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 2.000 litros o de aproximadamente 200 litros a aproximadamente 1.500 litros, respectivamente.

Otros parámetros que pueden ser de interés durante el contacto entre la sal o sales metálicas y el componente de B-2036 incluyen cosas tales como la velocidad de mezcla. La velocidad de mezcla debe ser aquella que sea suficiente para formar una mezcla homogénea (de la célula o células huésped, del lisado de las mismas, tampón, sal o sales metálicas, el componente de B-2036 y cualquier otro componente en el medio de cultivo) mientras que minimiza la cantidad de espuma que se puede formar. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente cuál debe ser una velocidad de mezcla suficiente. Obviamente, la velocidad de mezcla debe ser tal que la temperatura se mantenga en los intervalos indicados anteriormente y se minimice cualquier degradación del componente proteico de B-2036.

4. Polipéptido Pegilado y Su Agregación

a. Disminución de Agregación con Cromatografía de Intercambio Aniónico

En la preparación y purificación de B-2036 PEG, el intermedio voluminoso o molécula de B-2036 se prepara como se ha indicado anteriormente. A partir de entonces, la molécula de B-2036 se procesa de acuerdo con las siguientes seis etapas para producir API final que es la proteína B-2036 PEG de interés. Estas seis etapas son las siguientes:

1. pegilación para producir B-2036 pegilado,
2. cromatografía de HIC (etapa opcional) para producir una combinación de HIC,
3. ultrafiltración/diafiltración (etapa opcional) para producir una combinación de diafiltración,
4. cromatografía de AEX junto con combinación para producir una combinación de AEX,
5. diafiltración de la combinación de AEX para producir una combinación de diafiltración y
6. filtración de API (con propósitos de esterilización, preferiblemente, a través de un filtro de 0,22 micrómetros en botellas de recolección para congelamiento) para producir un API final.

Las etapas 1-6 indicadas anteriormente son ejemplares y se describen en el diagrama de flujo 1 en el Ejemplo 1.

Con referencia a la etapa 1, la etapa de pegilación consigue la primera etapa de la invención indicada de proporcionar isoformas de proteína pegilada de interés. A partir de entonces, la etapa 2 de HIC y la etapa 3 posterior de diafiltración, las cuales se consideran opcionales, preferiblemente se conducen para retirar cualquier proteína no pegilada, moléculas de PEG libres o cualquiera de otras impurezas que se puedan retirar durante la etapa 2. Después de la etapa 3, la combinación de diafiltración de la etapa 3 se somete después a cromatografía de intercambio aniónico de la etapa 4 para separar las isoformas PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 que después posteriormente se combinan para enriquecer preferiblemente el nivel de isoformas PEG-4, PEG-5 y PEG-6 en un producto final para procesamiento adicional en la etapa 5 de la diafiltración que vendrá seguida por la filtración de esterilización de la etapa 6 para producir un producto final API.

Ahora, con referencia de nuevo a la etapa 1 de pegilación, la molécula de B-2036 se somete a condiciones suficientes para pegar la misma molécula de B-2036 en B-2036 PEG incluyendo las isoformas PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. Los parámetros de pegilación preferidos se proporcionan en el diagrama de flujo 1 y Ejemplo 1. La molécula de B-2036 y cualquier otra molécula a la cual se puedan unir las moléculas de PEG, preferiblemente, mediante unión covalente son moléculas de PEG seleccionadas entre el grupo constituido por PEG-N-hidrosuccinimida-5K, PEG-succinimidil carbonato-5K, PEG-succinimidil propionato-5K, PEG2-maleimida-40K

(2 x 20K), PEG2-N-hidrosuccinimida-40K (2 x 20K) y PEG2-aldehído-40K (2 x 20K). La cantidad de la molécula de PEG añadida a la molécula de B-2036 para la pegilación (o cualquier otra proteína de interés que se necesite pegilar) debe ser tal que la proporción en peso estequiométrica de la cantidad de moléculas de PEG libres (no unidas) a la cantidad de moléculas de proteína no pegiladas sea de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100, preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5, más preferiblemente de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 2 y lo más preferible es que sea de aproximadamente 1,95 a aproximadamente 2,05. Durante la pegilación, la molécula de B-2036 (o cualquier otra proteína de interés que se tenga que pegilar) se pega a un pH de pegilación de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8, más preferiblemente de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,8 y lo más preferible es que sea de aproximadamente 7,40 a aproximadamente 7,80. La temperatura a la cual se conduce la etapa de pegilación se denomina la temperatura de pegilación. La temperatura de pegilación es de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, preferiblemente desde aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C y más preferiblemente de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C.

Con referencia ahora a la etapa 2 opcional de HIC, los parámetros preferidos para conducir esta etapa se proporcionan en el Ejemplo 1 y en el diagrama de flujo 1. Durante la etapa 2 de cromatografía de HIC opcional, la proteína pegilada y cualquier proteína no pegilada se carga en la resina de HIC a una carga de HIC de \leq aproximadamente 10 g de proteína por litro de volumen de lecho cargado de resina de HIC, preferiblemente \leq aproximadamente 5 gramos de proteína por litro de volumen de lecho cargado de resina HIC o S de aproximadamente 4,1 g de proteína por litro de volumen de lecho cargado de resina HIC. También, la conductividad de carga de HIC es desde aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 52 mS/cm o más preferiblemente de aproximadamente 45 a aproximadamente 51 mS/cm. Además, la etapa de HIC se conduce a una temperatura de HIC de aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30°C y más preferiblemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 25°C. La etapa 2 de HIC opcional retira al menos algún PEG libre, proteína no pegilada y agregación, respectivamente, presente en la carga de HIC.

A continuación de la etapa 2 de HIC, se obtiene una combinación de HIC. La combinación de HIC después se somete a una etapa 3 de ultrafiltración/diafiltración que es opcional en el sentido de que si la etapa 2 de HIC se conduce, entonces las etapas de ultrafiltración/diafiltración también se conducen. Sin embargo, si la etapa 2 de HIC no se conduce, entonces no existe necesidad de conducir la etapa 3 de ultrafiltración/diafiltración. Como alternativa, la etapa 3 de ultrafiltración/diafiltración todavía se puede conducir en ausencia de la etapa 2 de HIC opcional. Las condiciones preferidas en las cuales la etapa 3 de ultrafiltración/diafiltración se conduce se indican en el Ejemplo 1 y en el diagrama de flujo 1. En este documento, se denomina a esta etapa UF/DF #3. La etapa UF/DF #3 se conduce con una membrana de UF/DF #3 que tiene un peso molecular de corte (MWCO) de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 20 kDa, preferiblemente de aproximadamente 8 kDa a aproximadamente 15 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 12 kDa y lo más preferible es que sea aproximadamente 10 kDa.

Después de la etapa 3, el producto obtenido en este punto se denomina la combinación de diafiltración. Esta combinación de diafiltración después se somete a la etapa 4 que es la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y de combinación. Las condiciones preferidas para realizar esta etapa de cromatografía del AEX y combinación se proporcionan en el Ejemplo 1 y en el diagrama de flujo 1. La combinación de diafiltración de la etapa anterior (es decir, etapa 3) o la proteína pegilada (por ejemplo, B-2036 PEG de la etapa 1, si no se han conducido las etapas 2 y 3) se somete a la etapa 4. De hecho, sin el procesamiento de HIC de la etapa 2, la combinación de diafiltración de la etapa 3 que contiene B-2036 PEG o el B-2036 PEG de la etapa 1 se carga en una resina de intercambio aniónico junto con cualquier PEG libre, cualquier proteína pegilada, proteína no pegilada, proteína parcialmente pegilada y cualquier impureza (tal como la impureza de trisulfuro o la impureza de des-phe) y cualquier agregación de los mismos.

Preferiblemente, la resina usada es una resina de intercambio aniónico (AEX). Las resinas de AEX preferidas incluyen, pero sin limitación, ANX4, DEAE, Q-Sefarosa, Q-Sefarosa FF, Q-Sefarosa HP y Q-Sefarosa XL. La resina de AEX preferida es Q-Sefarosa FF.

Preferiblemente, la resina de AEX comprende grupos funcionales seleccionados entre el grupo constituido por aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias y combinaciones de las mismas. Adicionalmente, la resina de AEX comprende grupos funcionales seleccionados entre grupos constituidos por grupos funcionales de dietilaminoetilo, dietilaminopropilo, dimetiletanolamina, trimetilamonio-etilo, trimetilbenzil amonio, dimetiletanol bencilo y poliamina. Además, la resina de AEX preferiblemente comprende un material de soporte seleccionado entre el grupo constituido por poliéter hidrófilo, divinil benceno poliestireno reticulado, agarosa reticulada, polipropileno, acrilamidoivinil hidrófilo, metacrílico, hidrogel polimerizado con una base de perla cerámica, material de sílice-dextrano compuesto, sílice injertado con polímero, divinil benceno estireno, divinil benceno poliacrílico, celulosa reticulada, copolímero de metacrilato, poliestireno, acrílico, gel hidrófilo G5000 y celulosa. También, se prefiere usar una resina de AEX que comprenda una resina macroporosa o una resina de gel. Típicamente, el material de soporte tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 μm y preferiblemente aproximadamente 30 μm .

La carga de AEX se conduce a una conductividad de carga de AEX que es \leq aproximadamente 10 mS/cm, preferiblemente \leq aproximadamente 5 mS/cm y más preferiblemente \leq aproximadamente 2,4 mS/cm. La resina de AEX se carga a un pH de carga de AEX de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9, más preferiblemente de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.

La carga de la proteína pegilada incluyendo cualquier impureza tal como la impureza trisulfuro o impureza des-phe o agregación de las mismas es tal que la carga de AEX es ≤ 10 g de proteína/l de volumen del lecho cargado de resina de AEX, preferiblemente $\leq 5,5$ g de proteína/l de volumen del lecho cargado de resina de AEX, más preferiblemente S a aproximadamente 4,1 g de proteína/l de volumen del lecho cargado de resina de AEX.

De acuerdo con una realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporción de una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar de una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar de una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-4, PEG-5, PEG-6 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada y cualquier molécula de PEG libre.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-4, PEG-5, PEG-6 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de la proteína pegilada.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro de las mismas.

De acuerdo con otra realización, la proteína pegilada que se carga en la resina de AEX o que se proporciona en la primera etapa de proporcionar una proteína pegilada incluye una o más isoformas de proteína pegilada, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

La proteína pegilada junto con cualquier agregación, impureza trisulfuro y/o des-phe de la misma, cualquier proteína no pegilada o parcialmente pegilada y cualquier PEG libre, después de la carga en la resina de AEX se somete a eluirse con una solución eluyente durante una etapa de elución seguida por la recogida del eluyente en múltiples fracciones. Las fracciones son fracciones de volumen de volumen de columna. La etapa de elución se puede conducir mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica. Si la elución se conduce con un gradiente de fuerza iónica, la elución se realiza con una solución salina en un tampón de elución que contiene una sal iónica a una concentración de sal suficiente para eluir la proteína pegilada cargada a partir de la resina de AEX. Preferiblemente, la sal iónica es una sal de cloruro. Más preferiblemente, la sal iónica se selecciona entre el grupo constituido por NaCl, cloruro de litio, fosfato de Na, sulfato de Na, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, KI y KCl. Otras sales iónicas adecuadas se reconocen para uso con resinas de AEX y se incorporan como si se hubieran indicaron este

documento. Preferiblemente, la sal iónica es cloruro de sodio proporcionado en un tampón. Durante la elución con una solución salina proporcionada en un tampón de elución, el gradiente de concentración de sal (por ejemplo, para una solución salina de NaCl) es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM por CV, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM por CV y más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM por CV y lo más preferible es que sea de 10 a aproximadamente 12,5 mM por CV. El tampón de elución en el que se proporciona la solución salina tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9 y lo más preferible es que sea de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1. Además, la etapa de elución se conduce a una temperatura de elución \leq aproximadamente 50°C, preferiblemente \leq aproximadamente 35°C, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 30°C, incluso más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30°C y lo más preferible es que sea de aproximadamente 18 a aproximadamente 25°C.

El tampón de elución que contiene la solución salina se introduce en la columna de resina de AEX y fluye a través de la columna a una velocidad lineal de \leq 300 cm/h, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 cm/h, más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 cm/h, aún más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 cm/h, incluso aún más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 cm/h, incluso adicionalmente aún más preferiblemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 65 cm/h y lo más preferible a aproximadamente 60 cm/h.

Cuando se recoge el eluyente de la resina de AEX, preferiblemente se recoge el eluyente en fracciones de volumen múltiples que varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 volúmenes de columna (CV), preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 fracciones de CV, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 CV y lo más preferible es que sea de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 CV fracciones de volumen. Por tanto, por ejemplo, se pueden recoger 100 fracciones separadas, número que puede ser menor o mayor dependiendo de la cantidad total de solución salina y del tampón de elución enviado a través de la resina de AEX para recoger las diversas fracciones de CV. Se debe apreciar que las fracciones de CV se recogen de forma seriada a medida que el eluyente se recoge en la salida (típicamente en la parte inferior de la columna de AEX) de la columna de AEX.

Cada una de las fracciones de CV recogidas preferiblemente contendrá una isoforma de proteína pegilada dada tal como PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. Las fracciones de CV recogidas después se someten a combinación para determinar qué fracción contiene qué isoforma de proteína pegilada y después para permitir que se combine selectivamente las isoformas de proteína pegilada deseadas recogida de esa forma.

b. Combinación

Por tanto, las fracciones de CV recogidas a partir de la resina de AEX después se someten a una etapa de combinación para seleccionar cantidades específicas de las isoformas de proteína pegilada tales como PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. Se pueden usar diversas técnicas analíticas para combinar de forma selectiva las isoformas de proteína pegilada deseadas. Estas técnicas incluyen, pero sin limitación CE, SDS-PAGE, cromatografía de IEX, cromatografía de HIC, cromatografía de AEX, cromatografía de CEX, RPHPLC, SEHPLC, cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas. CE o RPHPLC se prefieren por encima de SDS-PAGE. Además, sin estar limitado por la teoría, se cree que el reactivo (por ejemplo, dodecil sulfato sódico) usado con SDS-PAGE oculta la medición de cualquier agregación formada. Se cree que el dodecil sulfato sódico (SDS) usado en el ensayo de SDS-PAGE destruye la agregación de forma que se mide una cantidad reducida de agregación o no se mide ninguna cantidad de agregación. Sin embargo, se puede usar SDS-PAGE satisfactoriamente para identificar genéticamente (por ejemplo, determinar la composición cualitativa y cuantitativa de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 de una fracción recogida) las proteínas pegiladas individuales. Cuando se conduce el análisis por CE para la combinación, el análisis se conduce a una temperatura de CE de aproximadamente 5 a aproximadamente 50°C, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 45°C, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 40°C y lo más preferible es que sea de aproximadamente 30 a aproximadamente 32°C.

También, cuando se usa CE, la CE se conduce a una conductividad de combinación de CE (se refiere a la conductividad de la fracción de muestra) de aproximadamente 0 a aproximadamente 60 mS/cm y más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mS/cm. La fracción de muestra que tiene una conductividad dentro de los intervalos de conductividad de combinación por CE indicados anteriormente después se introduce en el capilar de CE para identificación genética de la proteína pegilada. La identificación genética de isoforma de proteína pegilada obtenida de este modo de la fracción de CV pertinente se compara frente a un patrón de referencia para identificar la isoforma de proteína pegilada particular presente en esa muestra.

El área por ciento obtenido por cada pico de identificación genética es proporcional al % en peso de la isoforma correspondiente a ese pico en esa fracción. Después, la fracción identificada de este modo mediante CE que contiene la isoforma de proteína pegilada deseada en el % en peso deseado de la isoforma después se mezcla opcionalmente con otras fracciones seleccionadas de forma similar para producir la mezcla de isoforma deseada. Este procesamiento produce composición API.

Véase, por ejemplo, Swapan K. Chowdhury y col., "Fingerprinting Proteins Coupled with Polymers by Mass Spectrometry: Investigation of Polyethylene Glycol-Conjugated Superoxide Dismutase", American Society for Mass Spectrometry, Vol. 6, págs. 478-487, 1995.

5 Para conducir el análisis de CE en la fracción de CV recogida, la concentración de proteína pegilada en tampón es al menos aproximadamente 0,2 mg/ml, al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/l o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 mg/ml, respectivamente. Usando CE o cualquiera de las técnicas de análisis indicadas anteriormente para combinación, se pueden combinar diversas isoformas de proteína pegilada para producir una combinación deseada de la proteína pegilada. Por tanto, por ejemplo, una proteína pegilada combinada puede comprender una o más de PEG-1 a PEG-9, una o más de PEG-2 a PEG-9, una o más de PEG-3 a PEG-9, una o más de PEG-3 a PEG-8, una o más de PEG-3 a PEG-7, una o más de PEG-3 a PEG-6, una o más de PEG-4 a PEG-6, una o más de PEG-4 y PEG-5, una o más de PEG-5 y PEG-6 y PEG-5, respectivamente.

15 Entre las combinaciones indicadas anteriormente, se prefieren diversas combinaciones de proteínas pegiladas. Por ejemplo, con respecto a una combinación de PEG-4, PEG-5 y PEG-6, la combinación de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 debe ser una que comprenda al menos el 70% en peso de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 basándose en un peso total de las isoformas de proteína pegilada en esta combinación particular. Preferiblemente, la fracción de proteína pegilada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 es al menos aproximadamente el 75% en peso basándose en un peso total de las isoformas de proteína pegilada presentes en la combinación. Este valor es más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% en peso, al menos aproximadamente el 85% peso, al menos aproximadamente el 90% en peso y al menos aproximadamente el 94% en peso, al menos aproximadamente el 95% en peso, al menos aproximadamente el 96% en peso, al menos aproximadamente el 97% en peso, al menos aproximadamente el 98% en peso, al menos aproximadamente el 99% en peso, al menos aproximadamente el 99,5% en peso y al menos aproximadamente el 99,9% en peso, respectivamente.

25 Para la combinación, la combinación se conduce en las isoformas de proteína pegilada recogidas en las fracciones de CV en donde las isoformas de proteína pegilada se proporciona en un tampón. Ese tampón en el que se proporcionan las isoformas de proteína pegilada tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9 y más preferiblemente de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1. Además, ese tampón es uno que se selecciona entre el grupo constituido por Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina.

35 En este punto, las isoformas de proteína pegilada combinada procesadas de acuerdo con la metodología indicada anteriormente (también descrita en los Ejemplos 1, 3 y 4 descritos más adelante) deben ser tales que el nivel de agregación del producto combinado sea \leq aproximadamente el 10% en peso basándose en un peso total de las isoformas de proteína pegilada y cualquier agregación de las mismas que se sometió a las etapas 1-5 indicadas anteriormente siendo las etapas 2 y 3 opcionales. Preferiblemente, el nivel de agregación es \leq aproximadamente el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1,5%, el 1%, el 0,9%, el 0,8%, el 0,7%, el 0,6%, el 0,5%, el 0,4%, el 0,3%, el 0,2%, el 0,1%, el 0,05% y el 0,01% en peso basándose en el peso total indicado anteriormente, respectivamente.

40 La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por una o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y PEG-8. La proteína pegilada combinada de ese modo básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 y PEG-7. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5 y PEG-6. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-4, PEG-5 y PEG-6. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-4 y PEG-5. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-5 y PEG-6. La proteína pegilada combinada de esta forma básicamente está constituida de forma preferida por uno o más de PEG-5.

55 La metodología de combinación indicada anteriormente se puede utilizar para combinar isoformas de proteína pegilada independientemente de si tales isoformas se han sometido a cromatografía de intercambio aniónico.

60 Cuando la proteína pegilada es un antagonista de la hormona de crecimiento pegilado, se prefiere que el nivel de agregación sea \leq el 6% en peso basándose en un peso total de las isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento pegilado y cualquier agregación del mismo en la combinación o la fracción de CV recogida. Más preferiblemente el nivel de agregación es \leq aproximadamente el 5%, el 4%, el 3%, el 2% y el 1% en peso basándose en el peso total indicado anteriormente, respectivamente. Adicionalmente, cuando la proteína pegilada es un antagonista de la hormona del crecimiento pegilado con diversas isoformas del mismo, el "nivel total" de una suma de cualquier impureza trisulfuro, cualquier impureza des-phe y cualquier agregación de los mismos preferiblemente está en un nivel de \leq aproximadamente el 15% en peso basándose en un peso total de las isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento pegilado, cualquier impureza de trisulfuro, cualquier impureza des-phe y cualquier agregación de las mismas en la combinación o en la fracción de CV recogida. Preferiblemente, el nivel total indicado anteriormente (de

una suma de cualquier impureza de trisulfuro, cualquier impureza des-phe y cualquier agregación de los mismos) es \leq aproximadamente el 12%, el 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% y el 1% en peso basándose en el peso total, respectivamente.

- 5 También preferiblemente, cuando el antagonista de la hormona de crecimiento de proteína pegilada es B-2036 PEG, su cadena principal polipeptídica es B-2036 de SBQ ID N° 1.

Después de la etapa 4 de cromatografía de AEX y combinación, se conduce una etapa 5 de seguimiento de ultra-filtración/diafiltración. Los parámetros preferidos para conducir esta etapa 5 UF/DF se proporcionan en el Ejemplo 1 y en el diagrama de flujo 1. Al final de la etapa 5, se recoge una combinación de diafiltración. Esta combinación de diafiltración después se somete a la etapa 6 que es tomar el ingrediente farmacéutico activo obtenido de esta forma en la combinación de diafiltración indicada anteriormente y esterilizarlo, preferiblemente, mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μ m. Los parámetros preferidos para conducir la etapa 6 de filtración API se proporcionan en el Ejemplo 1 y en el diagrama de flujo 1.

Finalmente, en el Ejemplo 1 más adelante, se proporciona un procedimiento preferido para la invención reivindicada que describe los detalles de cada una de las etapas 1-6 indicadas anteriormente, usando una etapa de cromatografía de resina de intercambio aniónico. Con propósitos comparativos, se proporciona un Ejemplo 2 comparativo en el que la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se reemplaza con una etapa de cromatografía de intercambio catiónico junto con la etapa de intercambio de tampón apropiada asociada con la misma. Los resultados del procedimiento del Ejemplo 2 se proporcionan en la Tabla 2 en la que el nivel de agregación varía desde tan alto como aproximadamente el 60% hasta tan bajo como aproximadamente el 6% de agregación en peso. El Ejemplo 3 describe una metodología de combinación que es aplicable al procedimiento del Ejemplo 1 y del diagrama de flujo 1 o al procedimiento del Ejemplo 2 y del diagrama de flujo 2 donde se usa RPHPLC como las técnicas analíticas la cual se compara con la técnica analítica de CE. Las figuras 2, 3 y 4 muestran que RPHPLC es equivalente a CE. El Ejemplo 4 proporciona procedimientos preferidos para la técnica analítica de CE.

Realizaciones de la invención

- 30 1. Un procedimiento para disminuir un nivel de agregación de un antagonista de la hormona del crecimiento pegilado e isoformas del mismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) proporcionar dicho antagonista de la hormona de crecimiento pegilado e isoformas del mismo;
- (b) cargar dicho antagonista de la hormona de crecimiento pegilado e isoformas del mismo incluyendo cualquier impureza y cualquier agregación del mismo en una resina de intercambio aniónico (AEX), en el que la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 10 mS/cm, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 y a una concentración de proteína de menos de o igual a aproximadamente 10 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de AEX; y
- (c) separar dicho antagonista de la hormona del crecimiento pegilado e isoformas del mismo mediante cromatografía de AEX.

- 45 2. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha resina de AEX se selecciona entre el grupo constituido por ANX4TM, DEAETM, Q-SefarosaTM Q-Sefarosa FFTM, Q-Sefarosa HPTM y Q-Sefarosa XLTM.

3. El procedimiento de la realización 1 o realización 2, en el que, en la etapa (b), la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 5 mS/cm.

- 50 4. El procedimiento de la realización 1 o realización 2, en el que, en la etapa (b), la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 2,4 mS/cm.

- 55 5. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que dicha etapa (b), se conduce a un pH de carga de AEX de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9.

6. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que dicha etapa (b), se conduce a un pH de carga de AEX de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.

- 60 7. El procedimiento de la realización 1, en el que dicho antagonista de la hormona de crecimiento pegilado comprende uno o más de dichas isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento pegilado seleccionado entre el grupo constituido por:

65 PEG-1 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con una molécula de PEG o variante de la misma),

PEG-2 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con dos moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-3 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con tres moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-4 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con cuatro moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-5 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con cinco moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-6 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con seis moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-7 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con siete moléculas de PEG o variante de las mismas),

PEG-8 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con ocho moléculas de PEG o variante de las mismas), y

PEG-9 (una molécula de antagonista de la hormona del crecimiento con nueve moléculas de PEG o variante de las mismas),

y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe del mismo y cualquier impureza no pegilada de dicho antagonista de la hormona del crecimiento y cualquier molécula de PEG libre.

8. El procedimiento de la realización 1, comprendiendo además una etapa de combinación (d) para combinar cantidades específicas de las isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento pegilada para producir un antagonista de la hormona del crecimiento pegilado combinado mediante una técnica seleccionada del grupo constituido de: electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RPHPLC), cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SEHPLC), cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas.

9. El procedimiento de la realización 8, en el que dicho antagonista de la hormona del crecimiento pegilado combinado comprende uno o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

10. El procedimiento de la realización 9, en el que una hormona de crecimiento pegilada combinada o una fracción del antagonista de la hormona del crecimiento de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 70% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

11. El procedimiento de la realización 1, en el que dicho nivel reducido de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 10% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas y dicha agregación.

Expuestas en lo sucesivo en este documento existen determinadas realizaciones diferentes que se describen con los propósitos de comprensión general de la invención reivindicada:

1. Un procedimiento para disminuir un nivel de agregación de isoformas de proteína pegilada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

(a) proporcionar dichas isoformas de proteína pegilada; y

(c) separar dichas isoformas de proteína pegilada mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una resina de intercambio aniónico en condiciones suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación.

2. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha etapa (a) comprende la etapa de (a1) pegilar una forma no pegilada o parcialmente pegilada de dicha proteína o pegilar ambas.

3. El procedimiento de la realización 2 en el que dicha etapa (a1) comprende pegilar con PEG libre seleccionado entre el grupo constituido por PEG-N-hidroxisuccinimida-5K, PEG-succinimidil carbonato-5K, PEG-succinimidil propionato-5K, PEG2-maleimida-40K (2 x 20K), PEG2-N-hidroxisuccinimida-40K (2 x 20K) y PEG2-aldehído-40K (2 x 20K).

4. El procedimiento de la realización 3 en el que una proporción en peso estequiométrica de dicho PEG libre a dicha proteína no pegilada es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100.

ES 2 337 041 T3

5. El procedimiento de la realización 4 en el que dicha proporción en peso estequiométrica es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5.

6. El procedimiento de la realización 5 en el que dicha proporción en peso estequiométrica es de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 2.

7. El procedimiento de la realización 6 en el que dicha proporción en peso estequiométrica es de aproximadamente 1,95 a aproximadamente 2,05.

8. El procedimiento de la realización 2 en el que dicha etapa de pegilación (a1) se conduce a un pH de pegilación de aproximadamente 3 a aproximadamente 10.

9. El procedimiento de la realización 8 en el que dicho pH de pegilación es de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8.

10. El procedimiento de la realización 9 en el que dicho pH de pegilación es de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,8.

11. El procedimiento de la realización 10 en el que dicho pH de pegilación es de aproximadamente 7,40 a aproximadamente 7,80.

12. El procedimiento de la realización 2 en el que dicha etapa de pegilación (a1) se conduce a una temperatura de pegilación que es de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C.

13. El procedimiento de la realización 12 en el que dicha temperatura de pegilación es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30°C.

14. El procedimiento de la realización 13 en el que dicha temperatura de pegilación es de aproximadamente 18 a aproximadamente 25°C.

15. El procedimiento de la realización 1 comprendiendo además una etapa de HIC opcional (a2) de selección de dicha proteína pegilada mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de HIC.

16. El procedimiento de la realización 2 comprendiendo además una etapa de HIC opcional (a2) de selección de dicha proteína pegilada mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de HIC.

17. El procedimiento de la realización 16 en el que dicha etapa de HIC (a2) comprende cargar dicha proteína pegilada y cualquier proteína no pegilada en dicha resina de HIC a una carga de HIC de menos de o igual a aproximadamente 10 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de HIC.

18. El procedimiento de la realización 17 en el que dicha carga de HIC es menor que o igual a aproximadamente 5 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de HIC.

19. El procedimiento de la realización 18 en el que dicha carga de HIC es menor que o igual a aproximadamente 4,1 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de HIC.

20. El procedimiento de la realización 17 en el que en dicha etapa de HIC (a2) dicha carga se conduce a una conductividad de carga de HIC de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mS/cm.

21. El procedimiento de la realización 20 en el que dicha conductividad de carga de HIC es de aproximadamente 40 a aproximadamente 52 mS/cm.

22. El procedimiento de la realización 21 en el que dicha conductividad de carga de HIC es de aproximadamente 45 a aproximadamente 51 mS/cm.

23. El procedimiento de la realización 17 en el que en dicha etapa de HIC (a2) se conduce a una temperatura de HIC de aproximadamente 10 a aproximadamente 40°C.

24. El procedimiento de la realización 23 en el que en dicha etapa temperatura de HIC es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30°C.

25. El procedimiento de la realización 24 en el que en dicha temperatura de HIC es de aproximadamente 18 a aproximadamente 25°C.

26. El procedimiento de la realización 16 comprendiendo además una etapa de UF/DF#3 (a3) de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF#3) de un eluyente de dicha etapa de HIC (a2).

ES 2 337 041 T3

27. El procedimiento de la realización 26 en el que dicha etapa de UF/DF#3 (a3) se conduce con una membrana de UF/DF#3 que tiene un peso molecular de corte de membrana de UF/DF#3 (MWCO) de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 20 kDa.
- 5 28. El procedimiento de la realización 27 en el que dicho MWCO de membrana de UF/DF#3 es de aproximadamente 8 kDa a aproximadamente 15 kDa.
29. El procedimiento de la realización 28 en el que dicho MWCO de membrana de UF/DF#3 es de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 12 kDa.
- 10 30. El procedimiento de la realización 29 en el que dicho MWCO de membrana de UF/DF#3 es aproximadamente 10 kDa.
31. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b1) de carga de dicha proteína pegilada incluyendo cualquier impureza y cualquier agregación de la misma sobre dicha resina de intercambio aniónico (AEX) para proporcionar proteína pegilada cargada.
- 15 32. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha resina de AEX se selecciona entre el grupo constituido por ANX4, DEAE, Q-Sefarosa, Q-Sefarosa FF, Q Sefarosa HP y Q-Sefarosa XL.
- 20 33. El procedimiento de la realización 32 en el que dicha resina de AEX es Q-Sefarosa FF.
34. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b1) se conduce a una conductividad de carga de AEX de menos de o igual a aproximadamente 10 mS/cm.
- 25 35. El procedimiento de la realización 34 en el que dicha conductividad de carga de AEX es menor que o igual a aproximadamente 5 mS/cm.
36. El procedimiento de la realización 35 en el que dicha conductividad de carga de AEX es menor que o igual a aproximadamente 2,4 mS/cm.
- 30 37. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b1) se conduce a un pH de carga de AEX de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.
38. El procedimiento de la realización 37 en el que dicho pH de carga de AEX es de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9.
- 35 39. El procedimiento de la realización 38 en el que dicho pH de carga de AEX es de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.
- 40 40. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b1) se conduce a una carga de AEX de proteína pegilada incluyendo cualquier impureza o dicha agregación de las mismas de menos de o igual a aproximadamente 10 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de AEX.
41. El procedimiento de la realización 40 en el que dicha carga de AEX es menor que o igual a aproximadamente 5,5 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de AEX.
- 45 42. El procedimiento de la realización 40, en el que dicha carga de AEX es menor que o igual a aproximadamente 4,1 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de AEX.
43. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.
- 50 44. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de la misma y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.
- 55 45. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.
- 60 46. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.
- 65

47. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.

5

48. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.

10

49. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-4, PEG-5, PEG-6 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína y cualquier molécula de PEG libre.

15

50. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-4, PEG-5, PEG-6 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de la misma y cualquier impureza no pegilada de dicha proteína.

20

51. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación, impureza trisulfuro e impureza des-phe de las mismas.

25

52. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación e impureza trisulfuro de las mismas.

30

53. El procedimiento de la realización 1, en el que dicha proteína pegilada comprende una o más de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

35

54. El procedimiento de la realización 1, comprendiendo además una etapa de combinación (c) para combinar cantidades específicas de dichas isoformas de proteína pegilada para producir una proteína pegilada combinada mediante una técnica seleccionada entre el grupo constituido por electroforesis capilar (CE) electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RPHPLC), cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SEHPLC), cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas.

45

55. El procedimiento de la realización 42, comprendiendo además una etapa de combinación (c) para combinar cantidades específicas de dichas isoformas de proteína pegilada de dicha proteína pegilada para producir una proteína pegilada combinada mediante una técnica seleccionada entre el grupo constituido por electroforesis capilar (CE) electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC), cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SEHPLC) y cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas.

50

56. El procedimiento de la realización 54 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce mediante dicha CE a una temperatura de CE de aproximadamente 5 a aproximadamente 50°C.

57. El procedimiento de la realización 55 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce mediante dicha CE a una temperatura de CE de aproximadamente 5 a aproximadamente 50°C.

55

58. El procedimiento de la realización 56 en el que dicha temperatura de CE es de aproximadamente 5 a aproximadamente 45°C.

59. El procedimiento de la realización 58 en el que dicha temperatura de CE es de aproximadamente 20 a aproximadamente 40°C.

60

60. El procedimiento de la realización 59 en el que dicha temperatura de CE es de aproximadamente 30 a aproximadamente 32°C.

61. El procedimiento de la realización 56 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce mediante dicha CE a una conductividad de combinación de CE de aproximadamente 0 a aproximadamente 60 mS/cm.

65

62. El procedimiento de la realización 61 en el que dicha conductividad de combinación de CE es de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mS/cm.

ES 2 337 041 T3

63. El procedimiento de la realización 54 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce en dichas isoformas de proteína pegilada proporcionadas en un tampón a una concentración de proteína de al menos aproximadamente 0,2 mg/ml.
- 5 64. El procedimiento de la realización 56 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce en dichas isoformas de proteína pegilada proporcionadas en un tampón a una concentración de proteína de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml.
- 10 65. El procedimiento de la realización 54 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce en dichas isoformas de proteína pegilada proporcionadas en un tampón a una concentración de proteína de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml.
- 15 66. El procedimiento de la realización 65 en el que dicha concentración de proteína es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml.
- 20 67. El procedimiento de la realización 66 en el que dicha concentración de proteína es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 mg/ml.
- 25 68. El procedimiento de la realización 56 en el que dicha etapa de combinación (c) se conduce en dichas isoformas de proteína pegilada proporcionadas en un tampón a una concentración de proteína de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml.
- 30 69. El procedimiento de la realización 67 en el que dicha concentración de proteína es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml.
- 35 70. El procedimiento de la realización 68 en el que dicha concentración de proteína es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 mg/ml.
- 40 71. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.
- 45 72. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.
- 50 73. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.
- 55 74. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y PEG-8.
- 60 75. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 y PEG-7.
- 65 76. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5 y PEG-6.
77. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-4, PEG-5 y PEG-6.
78. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-4 y PEG-5.
79. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende uno o más de PEG-5 y PEG-6.
80. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada comprende PEG-5.
81. El procedimiento de la realización 71 en el que una fracción de proteína pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 70% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.
82. El procedimiento de la realización 71 en el que dicha fracción de proteína pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 75% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

ES 2 337 041 T3

83. El procedimiento de la realización 71 en el que dicha fracción de proteína pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 80% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

84. El procedimiento de la realización 71 en el que dicha fracción de proteína pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 90% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

85. El procedimiento de la realización 71 en el que dicha fracción de proteína pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 94% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas de proteína pegilada PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de las mismas.

86. El procedimiento de la realización 64 en el que dicho tampón en el que dicha proteína pegilada se proporciona tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.

87. El procedimiento de la realización 86 en el que dicho tampón tiene un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9.

88. El procedimiento de la realización 87 en el que dicho tampón tiene un pH de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.

89. El procedimiento de la realización 64 en el que dicho tampón en el que se proporciona dicha proteína pegilada se selecciona entre el grupo constituido por Tris, fosfato, HEPES, ácido cítrico, trietilamina e histidina.

90. El procedimiento de la realización 1 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 10% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas y dicha agregación.

91. El procedimiento de la realización 90 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 9% en peso basándose en dicho peso total.

92. El procedimiento de la realización 91 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 8% en peso basándose en dicho peso total.

93. El procedimiento de la realización 92 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 7% en peso basándose en dicho peso total.

94. El procedimiento de la realización 93 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 6% en peso basándose en dicho peso total.

95. El procedimiento de la realización 94 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 5% en peso basándose en dicho peso total.

96. El procedimiento de la realización 95 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 4% en peso basándose en dicho peso total.

97. El procedimiento de la realización 96 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 3% en peso basándose en dicho peso total.

98. El procedimiento de la realización 97 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 2% en peso basándose en dicho peso total.

99. El procedimiento de la realización 98 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 1,5% en peso basándose en dicho peso total.

100. El procedimiento de la realización 99 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 1% en peso basándose en dicho peso total.

101. El procedimiento de la realización 100 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,9% en peso basándose en dicho peso total.

102. El procedimiento de la realización 101 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,8% en peso basándose en dicho peso total.

103. El procedimiento de la realización 102 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,7% en peso basándose en dicho peso total.

ES 2 337 041 T3

104. El procedimiento de la realización 103 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,6% en peso basándose en dicho peso total.
105. El procedimiento de la realización 104 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,5% en peso basándose en dicho peso total.
106. El procedimiento de la realización 105 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,4% en peso basándose en dicho peso total.
107. El procedimiento de la realización 106 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,3% en peso basándose en dicho peso total.
108. El procedimiento de la realización 107 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,2% en peso basándose en dicho peso total.
109. El procedimiento de la realización 108 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,1% en peso basándose en dicho peso total.
110. El procedimiento de la realización 109 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,05% en peso basándose en dicho peso total.
111. El procedimiento de la realización 110 en el que dicho nivel de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 0,01% en peso basándose en dicho peso total.
112. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) que comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido de una etapa (b3) de elución con una solución eluyente de dicha proteína pegilada cargada mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica y una etapa (b4) de recolección de un eluyente en múltiples fracciones de volumen.
113. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido de una etapa de elución (b3) para eluir dicha proteína pegilada cargada con una solución salina en un tampón de elución que contiene una sal iónica en un gradiente de concentración de sal suficiente para eluir dicha proteína pegilada cargada de dicha resina de AEX.
114. El procedimiento de la realización 113 en el que dicha sal iónica es una sal de cloruro.
115. El procedimiento de la realización 114 en el que dicha sal iónica es NaCl.
116. El procedimiento de la realización 115 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna que tiene un volumen de columna (CV) y en el que dicho gradiente de concentración de sal es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM por CV.
117. El procedimiento de la realización 116 en el que dicho gradiente de concentración de sal es de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM por CV.
118. El procedimiento de la realización 117 en el que dicho gradiente de concentración de sal es de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mM por CV.
119. El procedimiento de la realización 113 en el que dicho tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10.
120. El procedimiento de la realización 119 en el que dicho tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9.
121. El procedimiento de la realización 120 en el que dicho tampón de elución tiene un pH de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.
122. El procedimiento de la realización 113 en la que dicha etapa de elución (b) se conduce a una temperatura de elución de menos de o igual a 50°C.
123. El procedimiento de la realización 122 en el que dicha temperatura de elución es menor que o igual a aproximadamente 35°C.
124. El procedimiento de la realización 123 en el que dicha temperatura de elución es de aproximadamente 2 a aproximadamente 30°C.
125. El procedimiento de la realización 123 en el que dicha temperatura de elución es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30°C.

ES 2 337 041 T3

126. El procedimiento de la realización 123 en el que dicha temperatura de elución es de aproximadamente 18 a aproximadamente 25°C.

127. El procedimiento de la realización 113 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna y en el que dicho tampón de elución tiene una velocidad lineal a través de dicha columna de menos que o igual a aproximadamente 300 cm/h.

128. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 cm/h.

129. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 cm/h.

130. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 cm/h.

131. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 cm/h.

132. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 60 a aproximadamente 65 cm/h.

133. El procedimiento de la realización 127 en el que dicha velocidad lineal es de aproximadamente 60 cm/h.

134. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha proteína pegilada se selecciona entre el grupo constituido por hormona, hormona del crecimiento, hormona del crecimiento humana, antagonista de la hormona del crecimiento, antagonista de la hormona del crecimiento humana, un anticuerpo y B-2036 PEG.

135. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha resina de intercambio aniónico (AEX) comprende grupos funcionales seleccionados entre el grupo constituido por aminas primarias, secundarias, terciarias, cuaternarias y combinaciones de las mismas.

136. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha resina de intercambio aniónico (AEX) comprende grupos funcionales seleccionados entre el grupo constituido por grupos funcionales de dietilaminoetilo, dietilaminopropilo, dimetiletanolamina, trimetil-amonio-etilo, trimetilbenzil amonio, dimetiletanol benzilo y poliamina.

137. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha resina de intercambio aniónico (AEX) comprende un material de soporte seleccionado entre el grupo constituido por poliéter hidrófilo, divinil benceno poliesterieno reticulado, agarosa reticulada, polipropileno, acrilamidovinil hidrófilo, metacrílico, hidrogel polimerizado con una base de perla cerámica, material compuesto de sílice-dextrano, sílice injertado con polímero, divinil benceno estireno, divinil benceno poliacrílico, celulosa reticulada, co-polímero de metacrilato, poliestireno, acrílico, gel hidrófilo G5000 y celulosa.

138. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha resina de intercambio aniónico (AEX) comprende una resina macroporosa.

139. El procedimiento de la realización 1 en el que dicha resina de intercambio aniónico (AEX) comprende una resina en gel.

140. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

141. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

142. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

143. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y PEG-8.

144. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 y PEG-7.

145. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5 y PEG-6.

146. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-4, PEG-5 y PEG-6.

147. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-4 y PEG-5.

148. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por uno o más de PEG-5 y PEG-6.

149. El procedimiento de la realización 63 en el que dicha proteína pegilada combinada está constituida esencialmente por PEG-5.

150. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna que tiene un volumen de columna (CV) y en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido por una etapa (b3) de elución con una solución eluyente de dicha proteína pegilada cargada mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica y una etapa (b4) de recolección de un eluyente en múltiples fracciones de volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 de dicho volumen de columna (CV).

151. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna que tiene un volumen de columna (CV) y en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido por una etapa (b3) de elución con una solución eluyente de dicha proteína pegilada cargada mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica y una etapa (b4) de recolección de un eluyente en múltiples fracciones de volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 de dicho volumen de columna (CV).

152. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna que tiene un volumen de columna (CV) y en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido por una etapa (b3) de elución con una solución eluyente de dicha proteína pegilada cargada mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica y una etapa (b4) de recolección de un eluyente en múltiples fracciones de volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 de dicho volumen de columna (CV).

153. El procedimiento de la realización 31 en el que dicha etapa (b) se conduce en una columna que tiene un volumen de columna (CV) y en el que dicha etapa (b) comprende además una etapa (b2) de lavado de dicha proteína pegilada cargada seguido por una etapa (b3) de elución con una solución eluyente de dicha proteína pegilada cargada mediante un gradiente de pH o un gradiente de fuerza iónica y una etapa (b4) de recolección de un eluyente en múltiples fracciones de volumen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 de dicho volumen de columna (CV).

154. El procedimiento de la realización 113 en el que dicha sal iónica se selecciona entre el grupo constituido por NaCl, cloruro de litio, fosfato de Na, sulfato de Na, cloruro de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, KI y KCl.

155. El procedimiento de la realización 118 en el que dicho gradiente de concentración de sal es de aproximadamente 10 a aproximadamente 12,5 mM por CV.

156. Un procedimiento para combinar isoformas de proteína pegilada, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de:

(a) separar y recoger dichas isoformas de proteína pegilada mediante una técnica seleccionada entre el grupo constituido por electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía de intercambio iónico (IEX), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RPHPLC), cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SEHPLC), cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas.

157. El procedimiento de la realización 140 en el que dicha técnica es RPHPLC o CE.

158. Un procedimiento para disminuir un nivel de agregación de isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas que tienen un peso total de dichas isoformas y dicha agregación, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) proporcionar dichas isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas; y
b) separar dichas isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas en una resina de intercambio aniónico (AEX) mediante cromatografía de intercambio aniónico en condiciones suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 6% en peso basándose en dicho peso total.

ES 2 337 041 T3

159. El procedimiento de la realización 158 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 5% en peso basándose en dicho peso total.

160. El procedimiento de la realización 158 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 4% en peso basándose en dicho peso total.

161. El procedimiento de la realización 158 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 3% en peso basándose en dicho peso total.

162. El procedimiento de la realización 158 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 2% en peso basándose en dicho peso total.

163. El procedimiento de la realización 158 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 1% en peso basándose en dicho peso total.

164. Un procedimiento para disminuir un nivel total de una suma de cualquier impureza trisulfuro, cualquier impureza des-phe y cualquier agregación de isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas que tienen un peso total de dichas isoformas, dichas impurezas y dicha agregación, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) proporcionar dichas isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas; y

b) separar dichas isoformas de antagonista de la hormona del crecimiento pegiladas en una resina de intercambio aniónico (AEX) mediante cromatografía de intercambio aniónico en condiciones suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquiera de dicha impureza trisulfuro, cualquiera de dicha impureza des-phe y cualquiera de dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 15% en peso basándose en dicho peso total.

165. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 12% en peso basándose en dicho peso total.

166. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 10% en peso basándose en dicho peso total.

167. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 9% en peso basándose en dicho peso total.

168. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 8% en peso basándose en dicho peso total.

169. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 7% en peso basándose en dicho peso total.

170. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 6% en peso basándose en dicho peso total.

171. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 5% en peso basándose en dicho peso total.

172. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 4% en peso basándose en dicho peso total.

173. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 3% en peso basándose en dicho peso total.

174. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 2% en peso basándose en dicho peso total.

ES 2 337 041 T3

175. El procedimiento de la realización 164 en el que las condiciones son suficientes para disminuir dicho nivel total de cualquier dicha impureza trisulfuro, cualquier dicha impureza des-phe y cualquier dicha agregación hasta menos de o igual a aproximadamente el 1% en peso basándose en dicho peso total.

5 176. El procedimiento de la realización 134 en el que dicho antagonista de la hormona del crecimiento es B-2036 PEG en el que dicho B-2036 PEG comprende una cadena principal de polipéptido antagonista de la hormona del crecimiento de B-2036 de [SEC ID N° 1].

10 177. El procedimiento de la realización 134 en el que dicha hormona del crecimiento es una forma pegilada de un polipéptido de [SEC ID N° 2]

178. El procedimiento de la realización 137 en el que dicho material de soporte tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 μm .

15 179. El procedimiento de la realización 178 en el que dicho diámetro tiene un promedio de 90 μm .

180. Un procedimiento para combinar isoformas de proteína pegilada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

20 (a) separar dichas isoformas de proteína pegilada en isoformas seleccionadas; y

(b) combinar dichas isoformas seleccionadas para producir una combinación enriquecida de dichas isoformas seleccionadas.

25 181. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son PEG-4, PEG-5 y PEG-6 con una proporción en peso combinada de ((un primer peso de PEG-4 + PEG-5 + PEG-6)/(un segundo peso de cualquier PEG-1 + PEG-2 + PEG-3 + PEG-4 + PEG-5 + PEG-6 + PEG-7 + PEG-8 + PEG-9 presente en dicha combinación enriquecida)), proporción en peso combinada que es mayor que o igual a aproximadamente el 70% en peso.

30 182. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 75% en peso.

35 183. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 80% en peso.

184. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 85% en peso.

40 185. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 90% en peso.

45 186. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 94% en peso.

187. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 95% en peso.

50 188. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 96% en peso.

189. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 97% en peso.

55 190. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 98% en peso.

60 191. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 99% en peso.

192. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 99,5% en peso.

65 193. El procedimiento de la realización 181 en el que dicha proporción en peso combinada es mayor que o igual a aproximadamente el 99,9% en peso.

194. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

195. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

196. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

197. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

198. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 y PEG-8.

199. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4, PEG-5, PEG-6 y PEG-7.

200. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4, PEG-5 y PEG-6.

201. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4 y PEG-5.

202. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-5 y PEG-6.

203. El procedimiento de la realización 180 en el que dichas isoformas seleccionadas son una o más de PEG-4 y PEG-6.

204. Un procedimiento para obtener una isoforma de proteína pegilada seleccionada a partir de una mezcla de al menos dos isoformas de proteína pegilada, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de:

(a) separar dicha isoforma de proteína pegilada seleccionada de dicha mezcla.

205. Un procedimiento para preparar una composición enriquecida a partir de una composición de partida, en el que dicha composición de partida comprende B-2036 no pegilado y una o más isoformas pegiladas de B-2036 seleccionadas entre el grupo constituido por PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

(a) separar dicha composición de partida en una pluralidad de fracciones, donde una proporción en peso de la primera fracción de las isoformas PEG-4, PEG-5 y PEG-6 a isoformas B-2036 no pegilada total y B-2036 pegilada en al menos una fracción difiere de una proporción en peso de la segunda fracción de isoformas PEG-4, PEG-5 y PEG-6 a isoformas B-2036 no pegilada y B-2036 pegilada en al menos una fracción diferente,

(b) determinar una proporción en peso de isoformas PEG-4, PEG-5 y PEG-6 a isoformas B-2036 no pegilada y B-2036 pegilada de un resto de cada fracción o en un muestreo de fracciones, y

(c) combinar selectivamente menos de todas dichas fracciones para producir dicha composición enriquecida, donde una proporción en peso de fracción enriquecida de isoformas PEG-4, PEG-5 y PEG-6 a isoformas B-2036 no pegilada y B-2036 pegilada totales es mayor en dicha composición enriquecida que en dicha composición de partida.

Todos los valores numéricos y moléculas identificadas en esta solicitud son ejemplares y no tienen por objeto interpretarse como limitantes de reivindicación. Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no se debe interpretar como una limitación del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Mantener o Disminuir el Nivel de Agregación de Antagonista de la Hormona del Crecimiento Pegilado (B-2036-PEG) mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico

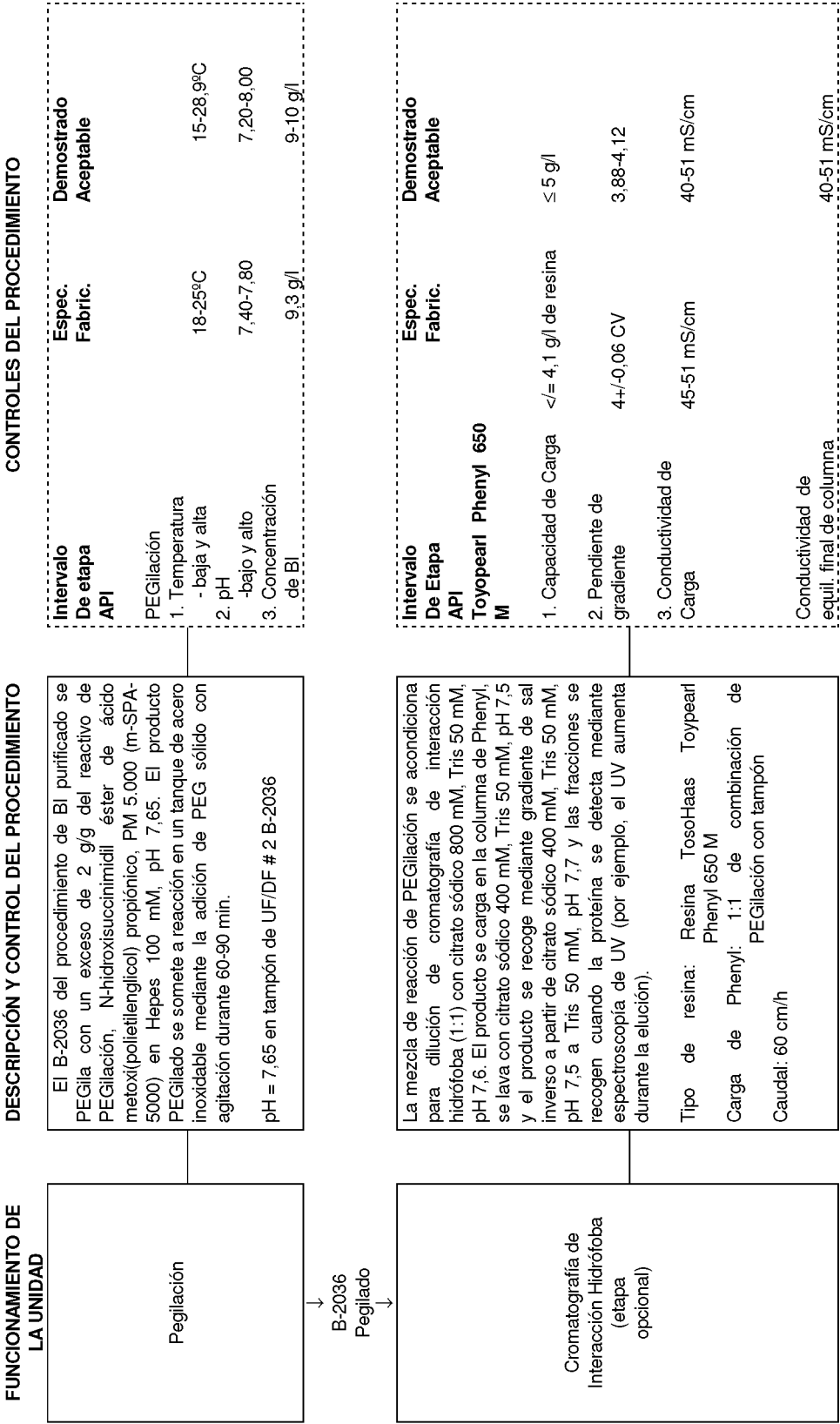
El mantenimiento (por debajo de un nivel deseado, por ejemplo, $\leq 6\%$ en peso del peso total) o la disminución de los niveles de agregación de B-2036 PEG se consiguió usando BI (el Intermedio Voluminoso B-2036) como el material de partida preparado como se ha indicado en la solicitud de patente de los Estados Unidos no provisional interim N° de serie P-107.891 titulada Method for the Production Of Growth Hormone And Antagonist Thereof Having lower Levels Of Isoform Impurities Thereof, presentada el 25 de agosto de 2003 ante la Oficina de Patentes y Marcas de los

ES 2 337 041 T3

Estados Unidos. La fermentación (para producir B-2036) en un sistema de expresión de *E. coli* recombinante se realizó como se ha descrito por Cunningham y col. en la Patente de Estados Unidos N° 5.849.535. La purificación de B-2036 BI se realizó como se ha descrito en la solicitud de Patente de los Estados Unidos no provisional identificada anteriormente N° (P-107.891). Después, este material se procesó usando las etapas iniciales de pegilación y cromatografía de interacción hidrófoba como se ha indicado en el diagrama de flujo 1 más adelante para producir B-2036 PEG. A continuación de la cromatografía de interacción hidrófoba (etapa 2), el B-2036 PEG se UF/DF en tampón de pH Tris 7,25 mM (en lugar de tampón de acetato de sodio pH 4 como en el procedimiento del Ejemplo 2, etapa 3, diagrama de flujo 2). Después el material retenido se sometió a cromatografía de intercambio aniónico fuerte en columna de Q Sefarosa FF. Esta etapa separa diferencialmente especies PEGiladas en fracciones para combinación para conseguir la distribución de especies PEGiladas necesaria para liberación de API. Esta columna enriquece para los productos PEG-4, PEG-5 y PEG-6 de BI PEGilado (B-2036 PEG). El producto se eluye con un gradiente lineal de 20 CV de NaCl 0-250 mM en Tris 25 mM, pH 7,0 a continuación de etapas de equilibrio y un lavado de 2 CV con Tris 25 mM, pH 7,0. El análisis de las fracciones se consigue usando CE en lugar de SDS-PAGE como se ha indicado en el Ejemplo 2, diagrama de flujo 2. Véase el análisis anterior con respecto a lo mismo. Pegvisomant (Somavert®; Pharmacia) se recoge a partir del perfil de cromatografía como una combinación a partir de fracciones analizadas mediante CE con un criterio de combinación de $\geq 75\%$ de PEG4+5+6 (primera fracción) y $\geq 94\%$ de PEG4+5+6 (última fracción) y $\geq 0,5$ mg/ml. Después, el producto resultante después se pasó a través del resto del procedimiento de purificación de B-2036 PEG como se ha descrito en el diagrama de flujo 1. Después de la selección y combinación de las fracciones, el análisis del material combinado y API final mediante SEHPLC no demostró agregación detectable. Véase la Tabla 1 que indica lo mismo más adelante.

(Esquema pasa a página siguiente)

DIAGRAMA DE FLUJO 1
Ejemplo 1
(Procedimiento que Usa Resina de Intercambio Aniónico)



ES 2 337 041 T3

FUNCIONAMIENTO DE LA UNIDAD	DESCRIPCIÓN Y CONTROL DEL PROCEDIMIENTO	CONTROLES DEL PROCEDIMIENTO																								
<p>2 (cont.)</p> <p>Cromatografía de Interacción Hidrófoba (continuación de etapa opcional)</p>	<p>Columna de lavado: ≥ 2 CV de Tris 50 mM, Citrato de sodio 400 mM pH 7,5</p> <p>Elución: 4 CV gradiente del 100% al 0% de citrato</p> <p>Fracciones de combinación que contienen especies de B-2036-PEG después de análisis de SDS-PAGE de cada fracción</p>	<p>Conductividad de Carga Final 40-51 mS/cm</p> <p>Inicio de Recolección de Pico UV al 2%</p> <p>Combinación: Bandas observadas entre 36,5 - 200 kDa</p>																								
Combinación de HIC																										
<p>3</p> <p>Diafiltración (intercambio de tampón a tampón intercambiador aniónico) (etapa opcional)</p>	<p>La solución de combinación de proteína de la columna de Toyopearl Phenyl se concentra hasta 6 g/l de concentración y se diafiltra frente a 9 volúmenes de renovación de Tris 25 mM, pH 7,0 usando una membrana Millipore 10K MWCO Biomax.</p> <p>Tampón de DF (diafiltración): Tris 25 mM, pH 7,0</p> <p>Presión de transmembrana (TMP): 137,90-172,37 (kPa) (20-25 psi)</p> <p>Volúmenes de diafiltración Total: 9</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Intervalo De etapa API</th><th>Espec. Fabric.</th><th>Demstrado Aceptable</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>UF/DF # 3</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>1. Conc. de proteína final</td><td>5,4-6,6 g/l</td><td>$\leq 7,2$ 103,42-189,61</td></tr> <tr> <td>2. TMP</td><td>137,90-172,37 kPa (20-25 psi)</td><td>≥ 53 kPa (15-27,5 psi)</td></tr> <tr> <td>3. Flujo cruzado de Material retenido</td><td>LPM</td><td>$\leq 0,5$ mS/cm</td></tr> <tr> <td>Fin de conductividad De Enjuagues WFI</td><td></td><td>$\geq 60\%$</td></tr> <tr> <td>% de NWP Original</td><td></td><td>$\geq 85\%$</td></tr> <tr> <td>g total de B-2036 (Rendimiento de Etapa)</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Intervalo De etapa API	Espec. Fabric.	Demstrado Aceptable	UF/DF # 3			1. Conc. de proteína final	5,4-6,6 g/l	$\leq 7,2$ 103,42-189,61	2. TMP	137,90-172,37 kPa (20-25 psi)	≥ 53 kPa (15-27,5 psi)	3. Flujo cruzado de Material retenido	LPM	$\leq 0,5$ mS/cm	Fin de conductividad De Enjuagues WFI		$\geq 60\%$	% de NWP Original		$\geq 85\%$	g total de B-2036 (Rendimiento de Etapa)		
Intervalo De etapa API	Espec. Fabric.	Demstrado Aceptable																								
UF/DF # 3																										
1. Conc. de proteína final	5,4-6,6 g/l	$\leq 7,2$ 103,42-189,61																								
2. TMP	137,90-172,37 kPa (20-25 psi)	≥ 53 kPa (15-27,5 psi)																								
3. Flujo cruzado de Material retenido	LPM	$\leq 0,5$ mS/cm																								
Fin de conductividad De Enjuagues WFI		$\geq 60\%$																								
% de NWP Original		$\geq 85\%$																								
g total de B-2036 (Rendimiento de Etapa)																										
Combinación de Diafiltración																										
<p>4</p> <p>Cromatografía De Intercambio Aniónico y Combinación</p>	<p>Se realiza cromatografía en columna usando una resina de Q Sefarosa FF de intercambio aniónico fuerte usando el material retenido de UF/DF #3 final. Esta etapa separa diferencialmente especies PEGiladas en fracciones para combinación para conseguir la distribución de especies PEGiladas necesaria para liberación de API. Esta columna enriquece para los productos PEG-4, PEG-5 y PEG-6 de BI PEGilado (B-2036-PEG).</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Intervalo de Etapa API</th><th>Espec. Fabric.</th><th>Demstrado Aceptable</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Q-Sefarosa FF</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>1. pH de carga/elución</td><td>6,9-7,1</td><td>6,7-8,0</td></tr> <tr> <td>2. Conductividad de carga</td><td>$\leq 2,2$ mS/cm</td><td>$\leq 2,4$ mS/cm</td></tr> <tr> <td>3. Capacidad de carga</td><td>$\leq 4,1$ g/l</td><td>$\leq 5,5$ g/l</td></tr> </tbody> </table>	Intervalo de Etapa API	Espec. Fabric.	Demstrado Aceptable	Q-Sefarosa FF			1. pH de carga/elución	6,9-7,1	6,7-8,0	2. Conductividad de carga	$\leq 2,2$ mS/cm	$\leq 2,4$ mS/cm	3. Capacidad de carga	$\leq 4,1$ g/l	$\leq 5,5$ g/l									
Intervalo de Etapa API	Espec. Fabric.	Demstrado Aceptable																								
Q-Sefarosa FF																										
1. pH de carga/elución	6,9-7,1	6,7-8,0																								
2. Conductividad de carga	$\leq 2,2$ mS/cm	$\leq 2,4$ mS/cm																								
3. Capacidad de carga	$\leq 4,1$ g/l	$\leq 5,5$ g/l																								

ES 2 337 041 T3

FUNCIONAMIENTO DE LA UNIDAD		DESCRIPCIÓN Y CONTROL DE PROCEDIMIENTO	CONTROLES DEL PROCEDIMIENTO		
5	4 (cont.)	(Cromatografía de Intercambio Aniónico y Combinación Continuada)	El producto se eluye con un gradiente lineal de 20 CV a partir de NaCl 0-250 mM en Tris 25 mM, pH 7,0 a continuación de etapas de equilibrio y un lavado de 2 CV con Tris 25 mM, pH 7,0. Pegvisomant se recoge a partir del perfil de cromatografía como una combinación de fracciones analizadas por CE con un criterio de combinación de $\geq 75\%$ de PEG4+5+6 (primera fracción) y $\geq 94\%$ de PEG4+5+6 (última fracción) y $\geq 0,5$ mg/ml.		
10			pH de Equil. de Columna Final 6,7-8,0 Fin de Conductividad Equil. $\leq 2,4$ mS/cm Conductividad de Solución de Carga $\leq 2,4$ mS/cm Elución de UV al Inicio de la Recolección 1,0%		
15			Intervalo De Etapa API Espec. Fabric. Demostrado Aceptable		
20			Electroforesis Capilar PEG4+5+6 (fracciones) $\geq 75\%$ PEG4+5+6 (primera fracción) $\geq 94\%$ UV (fracciones) (última fracción) $\geq 0,5$ g/l		
25	Combinación de AEX				
30	5	Diafiltración (intercambio de tampón a tampón de API final)	El propósito de esta etapa es concentrar la combinación de producto a partir de la columna de Q Sefarosa FF a 10 mg/l y realizar un intercambio de tampón usando membranas 10K MWCO Biomax en 18 g/l de manitol, 0,68 g/l de glicina, fosfato de sodio 5 mM, pH 7,4 a través de una diálisis total de 9 diavolumenes. Después el material se congela como API		
35			Volúmenes de diafiltración total: 9		
40			Intervalo De etapa API Espec. Fabric. Demostrado Aceptable		
45			UF/DF # 4		
50	Combinación de Diafiltración				
55	6	Carga de API	El propósito de esta etapa es ajustar la concentración de la solución de proteína voluminosa, si es necesario y rellenar de forma estéril usando filtros de 0,2 μ m en botellas de Teflón para congelamiento.		
60			Filtros: cápsula de Sartobran P 0,45/9,2 μ m		
65			Intervalo de Etapa API de Higienización Espec. Fabric. Demostrado Aceptable		
			1. Concentración de Proteína 5 g/l o 7,5 g/l o 10 g/l $\geq 90\%$ 2. Rendimiento: Estéril 3. Ensayo de esterilidad		
	API Final				

Tabla 1: Parámetros de Cromatografía de Intercambio

Tabla 1: Parámetros de Cromatografía de Intercambio

	pH			Gradiente			Alt. de Lecho	Carga	En procedimiento	Rendimiento (%)	% de Agregación	Nº de PEG Prom.*
	Equilibrar	Carga	Eluir	tampón A	Tampón B	Pendiente (CV)						
Resina							.6 cm col. (cm)	(mg/ml de resina)	analítica			
ANX4FF	8,0	8,0	6,7	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 90 mM, pH 6,7	15	20	5,1	combinado mediante SDS-PAGE	50	0	N/D
ANX4FF (40 ml CV)	8,0	8,0	6,7	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 90 mM, pH 6,7	15	20	5,1	combinado mediante SDS-PAGE	54,7	0	N/D
Q Sefarosa FF	8,0	8,0	6,7	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25mM pH Tris, NaCl 150 mM, pH 6,7	20	20	3,6	combinado mediante SDS-PAGE/ 1 ^{er} uso de CE	65,8	0	5,7
Q Sefarosa FF	8,0 (añadir 3 CV de Tris 1 M, pH 8,0 etapa de pre-equil	8,0	6,7	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6,7	20	20	3,6	combinado mediante SDS-PAGE/ 2 ^o uso de CE	64,4	0	5,1
Q Sefarosa FF	8,0 (3 CV Tris 1 M pH 8,0 etapa de pre-equil	8,0	8,0	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 90 mM, pH 8,0	20	20	3,6	combinado mediante SDS-PAGE/3 ^{er} uso de CE	48,8	0	5,0

Resina	pH			Gradiente			Alt. de Lecho (cm)	Carga (mg/ml de resina)	En procedimiento analítica	Rendimiento (%)	% de Agregación	Nº de PEG Prom.*
	Equilibrar	Carga	Eluir	tampón A	Tampón B	Pendiente (CV)						
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 8,0 etapa de pre-equil	8,0	7,0	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	20	20	3,58	combinado mediante SDS-PAGE/4º uso de CE	60,7	0	4,8
Q Sefarosa FF	9,0 (3 CV) Tris 1M pH 8,0 etapa de pre-equil	9,0	9,0	Tris 25 mM pH 8,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 9,0	20	20	3,58	combinado mediante SDS-PAGE/5º uso de CE	59,2	0	5,0
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 7,0 etapa de pre-equil	7,0	7,0	Tris 25 mM pH 7,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	20	28	4,0	unido con SDS-page, combinado mediante CE criterio de combinación evaluado <10% PEG-7 y <10% PEG-3	58,6	0	5,0

Resina	pH			Gradiente			Alt. de Lecho (cm)	Carga (mg/ml de resina)	En procedimiento analítica	Rendimiento (%)	% de Agregación	Nº de PEG Prom.*
	Equilibrar	Carga	Eluir	tampón A	Tampón B	Pendiente (CV)						
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 7,0 etapa de pre-equil	7,0	7,0	Tris 25 mM pH 7,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	20	28	4,0	combinado mediante criterio de CE = 90% PEG-4+5+6	52,0	0	5,0
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 7,0 etapa de pre-equil	7,0	7,0	Tris 25 mM pH 7,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	10	28	6,0	combinado mediante criterio de CE = 90% PEG-4+5+6	52,8	0	4,9
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 7,0 etapa de pre-equil	7,0	7,0	Tris 25 mM pH 7,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	10	39	4,0	combinación teórica mediante CE = 90% PEG-4+5+6	72,0	0	5,0
Q Sefarosa FF	7,0 (3 CV) Tris 1M pH 7,0 etapa de pre-equil	7,0	7,0	Tris 25 mM pH 7,0	Tris 25 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0	10	39	4,0	CE de combinación y combinación no completada	N/D	N/D	N/D

* = calculado basándose en análisis de CE

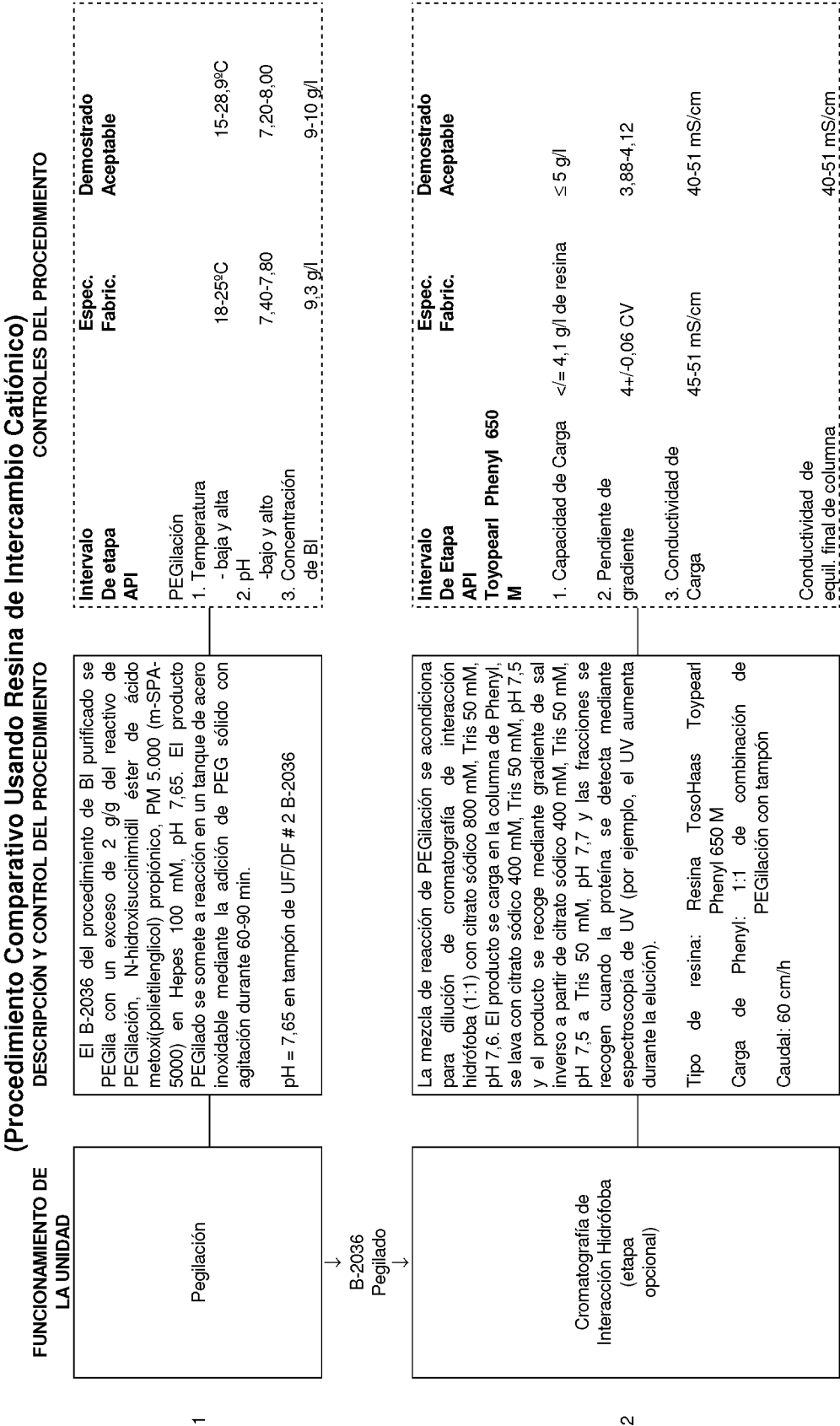
Ejemplo 2

Procedimiento a Pequeña Escala para Evaluación del Efecto de Aditivos sobre la Agregación en S-Sefarosa FF (Resina de Cromatografía de Intercambio Catiónico) de B-2036 PEG

A un tubo de centrifuga de 15 ml, se añadieron 1,5 ml de resina S-Sefarosa FF (volumen de lecho depositado). La resina se preparó para unión de proteína enjuagando dos veces con 10 ml de una solución al 1% del aditivo que se tiene que evaluar en acetato de Sodio 25 mM, pH 4. Después de cada enjuague, se recogió el sobrenadante (mediante centrifugación) y se decantó y descartó. Al sedimento de resina enjuagado, se añadieron 2,5 ml de solución al 1% del aditivo que se tiene que evaluar en acetato de Sodio 25 mM, pH 4 y se añadió una cantidad de material retenido de UF/DF que contenía aproximadamente 5 mg de B-2036 PEG de la etapa 3 (preparado mediante el procedimiento del diagrama de flujo 2, etapas 1 a 3). Después la resina se resuspendió en la solución y se incubó con mezcla moderada durante 2 a 24 h. Después de la incubación, la solución se centrifugó y el sobrenadante se decantó y se descartó. Después el B-2036 PEG se eluyó a partir de la resina mediante la adición al sedimento de resina de 2,5 ml de una solución al 1% del aditivo que se tiene evaluar en acetato de Sodio 25 mM, pH 4 y 0,25 ml de cloruro de sodio 2,5 M. La resina en la solución resultante se resuspendió y se incubó con mezcla moderada durante 20 minutos. Después de la incubación, el sobrenadante se conserva mediante centrifugación y se decanta para análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, SEHPLC (HPLC de exclusión por tamaño)). Después el sedimento de resina usado se descarta. El procedimiento anterior se repitió para cada aditivo que se tenía que evaluar usando Resina de Cromatografía de Intercambio Catiónico para determinar si la formación de agregación se podría eliminar o disminuir de forma suficiente. Usando este procedimiento indicado anteriormente, se obtuvieron los resultados de la Tabla 2 más adelante. Como se refleja en la Tabla 2, ninguno de los aditivos ensayados usando una resina catiónica fue tan satisfactorio como cambiar a una resina aniónica para disminuir el nivel de agregación formado.

(Esquema pasa a página siguiente)

DIAGRAMA DE FLUJO 2
Ejemplo 2



65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

FUNCIONAMIENTO DE LA UNIDAD

DESCRIPCIÓN Y CONTROL DEL PROCEDIMIENTO

CONTROLES DEL PROCEDIMIENTO

Cromatografía de Intercambio Hidrófoba (continuación de etapa opcional)

Columna de lavado: ≥ 2 CV de Tris 50 mM, Citrato de sodio 400 mM pH 7,5
Elución: 4 CV gradiente del 100% al 0% de citrato
Fracciones de combinación que contienen especies de B-2036-PEG después de análisis de SDS-PAGE de cada fracción

Conductividad de Carga Final 40-51 mS/cm
Inicio de Recolección de Pico UV al 2%
Combinación: Bandas observadas entre 36,5 - 200 kDa

2 (cont.)

Combinación de HIC

Diafiltración (intercambio de tampón a tampón intercambiador aniónico) (etapa opcional)

La solución de combinación de proteína de la columna de Toyopearl Phenyl se concentra hasta 6 g/l de concentración y se diafiltra frente a 9 volúmenes de renovación de Acetato de Sodio 25 mM, pH 4,0 usando una membrana Millipore 10K MWCO Biomax.
Tampón de DF (diafiltración): Acetato de Na 25 mM, pH 4,0
Presión de transmembrana (TMP): 137,90-172,37 (kPa)
Volúmenes de diafiltración 9
Total:

Intervalo De etapa API UF/DF # 3	Espec. Fabric.	Demostrado Aceptable
1. Conc. de proteína final	5,4-6,6 g/l	$\leq 7,2$
2. TMP	137,90-172,37 kPa (20-25 psi)	
3. Flujo cruzado de Material retenido	53-80 LPM	
Fin de conductividad De Enjuagues WFI		$\leq 0,5$ mS/cm
% de NWP Original		$\geq 60\%$
g Total de B-2036 (Rendimiento de Etapa)		$\geq 85\%$

3

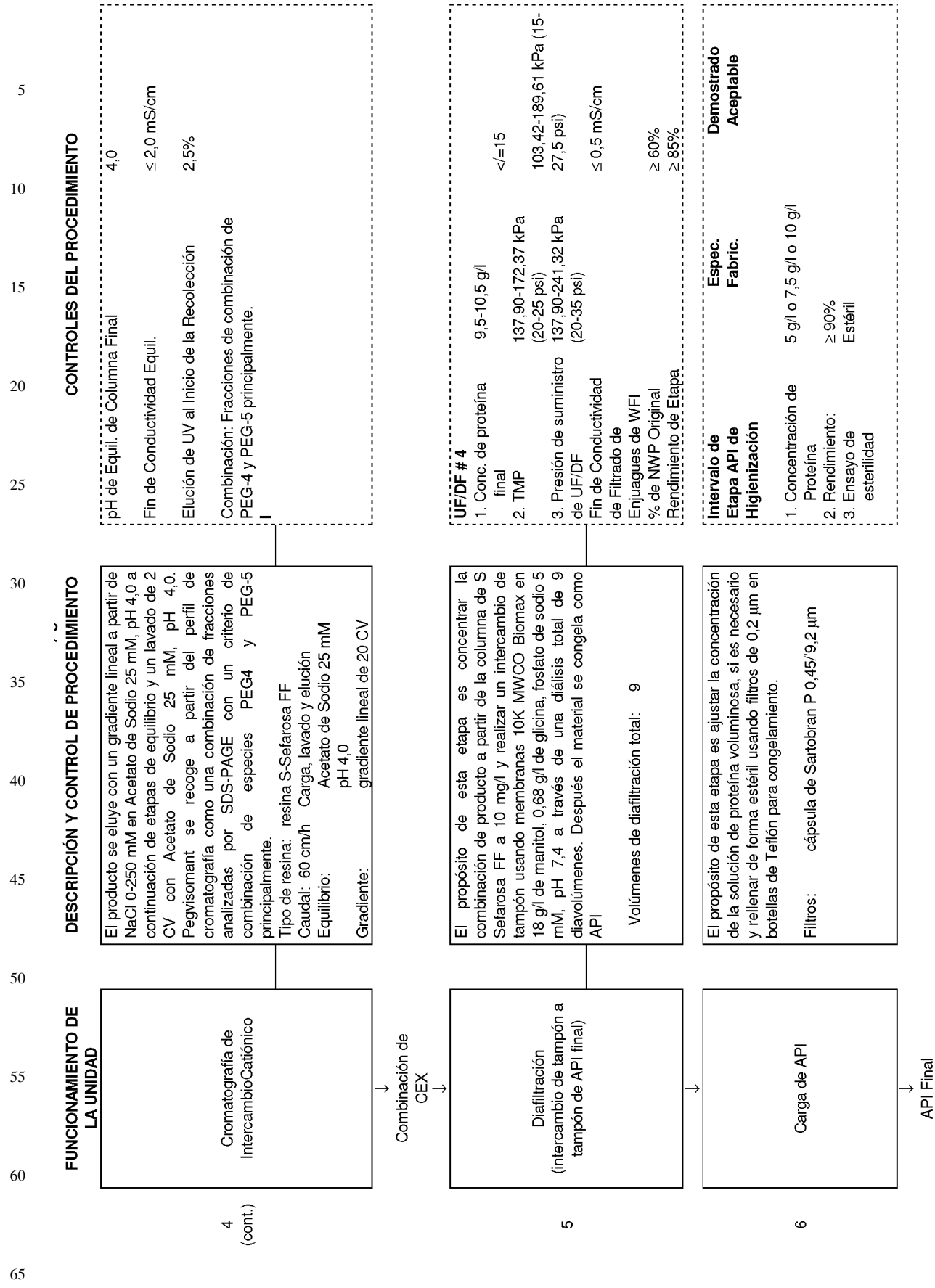
Combinación de Diafiltración

Cromatografía De Intercambio Catiónico

Se realiza cromatografía en columna usando una resina de S Sefarosa FF de intercambio catiónico usando el material retenido de UF/DF #3 final. Esta etapa separa diferencialmente especies PEGiladas en fracciones para combinación para conseguir la distribución de especies PEGiladas necesaria para liberación de API. Esta columna enriquece para los productos PEG-4, PEG-5 y PEG-6 de BI PEGilado (B-2036-PEG).

Intervalo de Etapa API Q-Sefarosa FF	Espec. Fabric.	Demostrado Aceptable
1. pH de carga/elución	3,90-4,10	
2. Conductividad de carga	$\leq 2,0$ mS/cm	
3. Capacidad de carga	$\leq 4,0$ g/l	

4



ES 2 337 041 T3

TABLA 2

5	(Resultados Obtenidos Usando Resina de Intercambio Catiónico)
	Procedimiento a Pequeña Escala de Ejemplo 2
10	Procedimiento Resina cargada a 3,3 g/l
	1,5 ml de resina por ensayo
	Equilibrar resina con aditivo antes de la carga de proteína
15	Eluir mediante adición de NaCl 2,5 M/ acetato pH 4,1: 10 v/v
	24 h de incubación todos al 1% excepto como se ha indicados

<u>Aditivo/Condición</u>	<u>% de Agregación</u>
Control	21,5
Urea 6M	6,0
CHAPS	18,7
25 Sarcosyl	9,3
PEG 3350	20,3
Isopropanol	19,3
30 n propanol	24,7
n butanol	27,1
35 TRIS 750 mM pH 7	30,3
control	32,2 mantenido durante una noche
40 urea 7,5 M urea	10,7
urea 6 M	8,1
urea 3 M	32,3
45 urea 1,5 M	35,0
tween 20	19,3
metanol	33,7
50 etanol	33,5
sacarosa al 5%	31,6
manitol	30,8
55 polifosfato al 1%	61,2
polifosfato al 0,1%	42,5
60 polifosfato al 0,01%	33,6
fosfato 25 mm pH 2,2	19,7
fosfato 25 mm pH 3	22,3

<u>Aditivo/Condición</u>	<u>% de Agregación</u>
fosfato 25 mm pH 5,5	63,1
fosfato 25 mm pH 6,5	42,9
formato 25 mm pH 4	29,0
control 1	31,8
control 2	31,1

Ejemplo 3

Técnica Analítica de RPHPLC

En este documento se usa RPHPLC para supervisar y cuantificar los porcentajes de especies pegiladas (por ejemplo, PEG-4, PEG-5 y PEG-6) encontrados en las fracciones de columna de Q-Sefarosa a partir de la purificación por intercambio aniónico de pegvisomant.

25 μ l de cada fracción de Q-Sefarosa (etapa de intercambio aniónico, véase el Ejemplo 1 anteriormente) (concentraciones de proteína que varían de 0,5 a 1,3 mg/ml) se aplican a una columna Zorbax 300SB-CN (4,6 mm x 150 mm; 3,5 μ m; Número de Parte 863973-905; número de serie USMJ001205). La fase móvil A es ácido trifluoroacético al 0,1% mientras que la fase móvil B está constituida por ácido trifluoroacético al 0,085% en acetonitrilo. Se usa un gradiente lineal de 40 a 50 por ciento de Tampón B durante 20 minutos a un caudal de 1,0 ml/min a temperatura ambiente para separación de las diferentes formas Pegiladas de Pegvisomant. La absorbancia se supervisa a 214 nm.

Los resultados obtenidos mediante RPHPLC son similares a los obtenidos mediante electroforesis capilar (CE) como se ha indicado en las Figuras 2-4 más adelante. También, véase el Ejemplo 4 más adelante para el procedimiento ejemplar de la técnica analítica de CE.

TABLA 3

Análisis de Fracciones Q-Sefarosa de Pegvisomant mediante Electroforesis Capilar con Propósitos de Determinación de los Porcentajes de Cada Especie PEGilada (también se analizaron las fracciones 7 a 18 mediante RPHPLC - véase la Tabla 4)

fracción	concentración de partida (mg/ml)	% de PEG-2	% de PEG-3	% de PEG-4	% de PEG-5	% de PEG-6	% de PEG-7	% de PEG-8
2	0,59	0,0	0,0	2,8	26,3	39,6	25,3	6,0
3	0,88	0,0	0,0	4,6	28,6	44,8	18,8	3,2
4	1,04	0,0	0,0	5,8	28,1	48,6	15,9	1,7
5	1,16	0,0	0,0	6,2	28,3	49,8	14,1	1,6

ES 2 337 041 T3

fracción	concentración de partida (mg/ml)	% de PEG-2	% de PEG-3	% de PEG-4	% de PEG-5	% de PEG-6	% de PEG-7	% de PEG-8
6	1,23	0,0	0,0	5,4	29,9	54,5	10,2	0,0
7	1,27	0,0	0,0	5,2	33,0	54,1	7,7	0,0
8	1,27	0,0	0,0	5,3	39,3	50,6	4,8	0,0
9	1,27	0,0	0,0	4,5	49,9	41,8	3,8	0,0
10	1,24	0,0	0,0	5,1	59,5	33,1	2,3	0,0
11	1,21	0,0	0,0	6,2	65,9	26,4	2,5	0,0
12	1,17	0,0	0,0	7,9	74,4	17,7	0,0	0,0
13	1,12	0,0	0,0	15,3	72,6	12,2	0,0	0,0
14	1,09	0,0	0,0	21,4	70,7	8,0	0,0	0,0
15	1,05	0,0	0,0	37,3	57,3	5,1	0,0	0,0
16	1,01	0,0	0,0	48,2	47,0	4,8	0,0	0,0
17	0,97	0,0	0,0	55,8	40,2	3,9	0,0	0,0
18	0,91	0,0	2,1	62,4	31,8	3,6	0,0	0,0
19	0,84	0,0	0,0	80,8	19,2	0,0	0,0	0,0
20	0,77	0,0	1,2	78,2	20,7	0,0	0,0	0,0
21	0,71	0,0	6,8	77,3	15,9	0,0	0,0	0,0
22	0,65	0,0	12,3	75,9	11,9	0,0	0,0	0,0
23	0,61	0,0	18,9	70,3	10,8	0,0	0,0	0,0
24	0,56	0,0	21,5	69,5	9,0	0,0	0,0	0,0

La región sombreada (es decir, las fracciones 7 a 18) representan las fracciones que también se analizaron mediante RPHPLC.

TABLA 4

Distribución de Diferentes Formas PEGiladas de Pegvisomant a Través de Fracciones de Q-Sepharosa según se Determinó Mediante CE y RPHPLC

fracción	% de PEG-4		% de PEG-5		% de PEG-6		% de PEG-7	
	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC
7	5,2	5,8	33,0	30,3	54,1	55,6	7,7	8,3
8	5,3	6,5	39,3	39,4	50,6	48,6	4,8	5,5
9	4,5	5,5	49,9	52,6	41,8	37,3	3,8	4,6

ES 2 337 041 T3

fracción	% de PEG-4		% de PEG-5		% de PEG-6		% de PEG-7	
	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC	CE	RP-HPLC
10	5,1	6,1	59,5	63,3	33,1	27,5	2,3	3,1
11	6,2	6,5	65,9	71,6	25,4	19,5	2,5	2,3
12	7,9	11,4	74,4	72,7	17,7	13,9	0,0	2,0
13	15,3	17,2	72,6	71,2	12,2	11,6	0,0	0,0
14	21,4	28,4	70,7	63,7	8,0	7,9	0,0	0,0
15	37,3	42,6	57,3	51,6	5,4	5,8	0,0	0,0
16	48,2	54,0	47,0	41,8	4,8	4,1	0,0	0,0
17	55,8	64,1	40,2	32,5	3,9	3,4	0,0	0,0
18	62,4	71,5	31,8	25,2	3,6	3,1	0,0	0,0

Los resultados comparativos de CE frente a RPHPLC se representan en las Figuras 2, 3 y 4 para B-2036 PEG-4, B-2036 PEG-5 y B-2036 PEG-6.

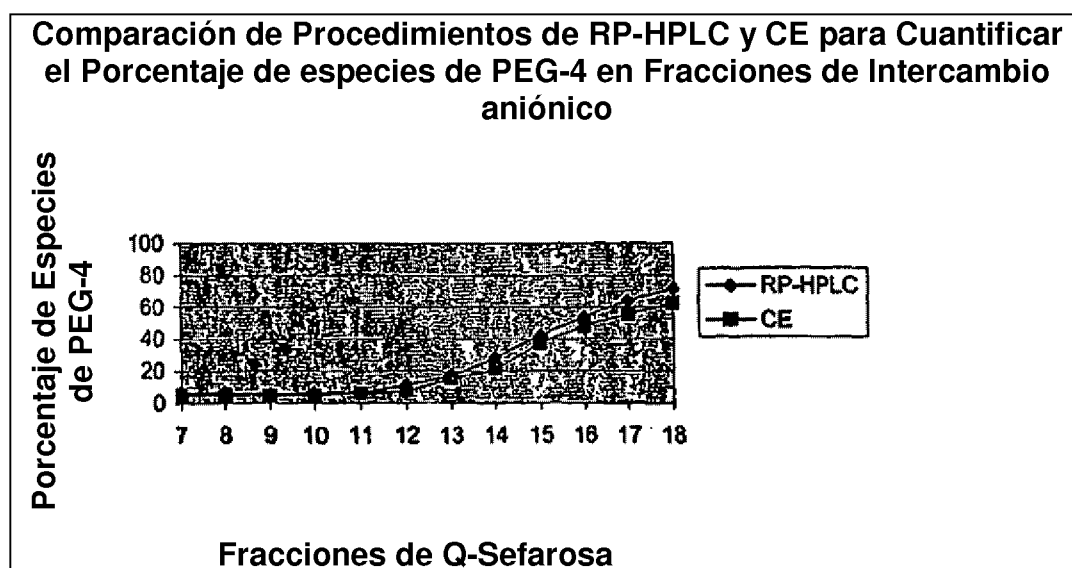


Figura 2 Comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG-4 encontrados dentro de las fracciones de Q-Sefarosa 7 a 8 determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

Comparación de Procedimientos de RP-HPLC y CE para Cuantificar el Porcentaje de especies de PEG-5 en Fracciones de Intercambio aniónico

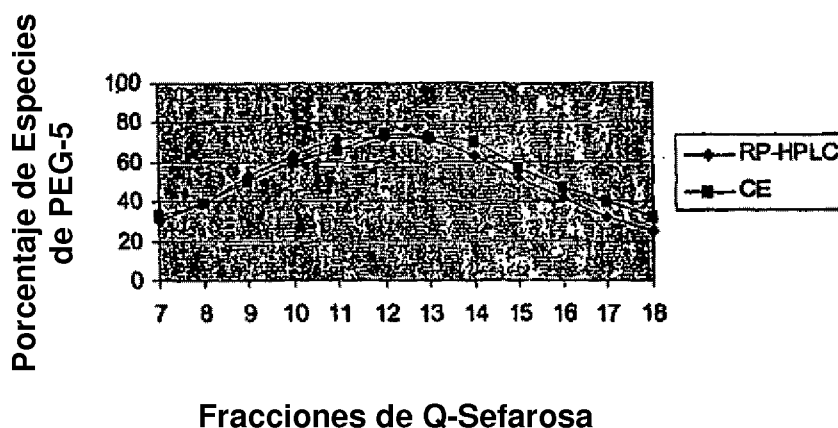


Figura 3 Comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG-5 encontrados dentro de las fracciones de Q-Sefarosa 7 a 8 determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

Comparación de Procedimientos de RP-HPLC y CE para Cuantificar el Porcentaje de especies de PEG-6 en Fracciones de Intercambio aniónico

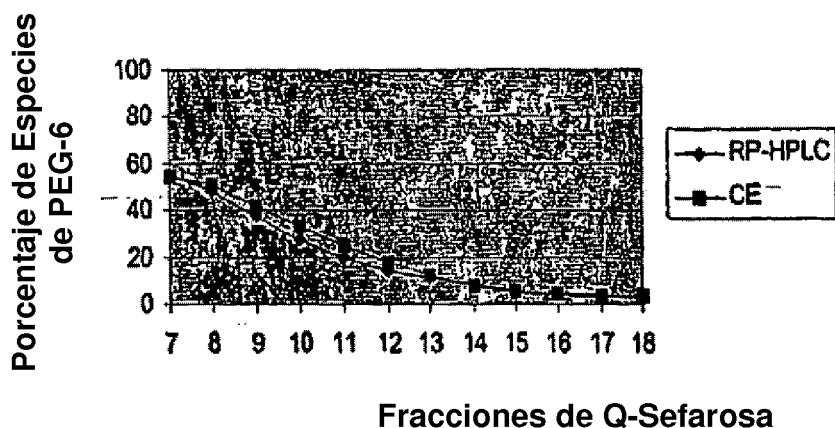


Figura 4 Comparación gráfica de los porcentajes de especies de B-2036 PEG-6 encontrados dentro de las fracciones de Q-Sefarosa 7 a 8 determinados por electroforesis capilar y HPLC de fase inversa.

Ejemplo 4

Técnica Analítica de CE

Se analizaron fracciones de Q-Sefarosa mediante Electroforesis Capilar de la manera siguiente. El capilar, que tiene un Diámetro Interior de 50 μm y una longitud eficaz de 37 cm, se acondicionó mediante enjuague con NaOH 1,0 N durante 10 minutos a 137,90 kPa (20 psi) de presión seguido por un enjuague de 20 minutos con tampón de desarrollo. El tampón de desarrollo, ácido Fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'O-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, 0,1 mg/ml de óxido de polietileno, pH 1,9-2,0, se preparó a partir de una solución madre 10X y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm para retirar las partículas que puedan provocar obstrucciones en el capilar.

ES 2 337 041 T3

Las muestras se calentaron hasta temperatura ambiente para evitar la formación de agregación cuando se ponían en contacto con tampón de dilución de muestra (ácido Fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'O'-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, pH 1,9-2,2) o tampón de desarrollo. Las muestras que eran <0,5 mg/ml no se analizaron. Las muestras $\geq 0,5$ mg/ml se inyectaron puras mientras que las muestras con una concentración > 2,0 mg/ml se diluyeron hasta 2,0 mg/ml usando tampón de dilución de muestra. Las muestras se inyectaron en el capilar usando presión de 3,45 kPa (0,5 psi) durante 10-60 segundos. A continuación de la inyección de muestra, se inyectó tampón de desarrollo durante 3 segundos a 3,45 kPa (0,5 psi) para concentrar la muestra. Las muestras se separaron durante 25 minutos a 30 kV a un mínimo de 30°C y se detectaron a 214 nm. El capilar se enjuagó antes de cada inyección de muestra posterior con NaOH 0,1 N durante al menos un minuto a 137,90 kPa (20 psi) y tampón de desarrollo durante dos minutos para retirar cualquier muestra retenida de la pared del capilar. El almacenamiento de la muestra se mantuvo a 25-30°C.

Los electroferogramas resultantes se integraron dividiendo los picos en el punto más bajo entre picos vecinos y se calculó el área por ciento corregida.

Usando el procedimiento indicado anteriormente junto con la descripción de la Etapa 4, diagrama de flujo 1, Ejemplo 1, los resultados obtenidos mediante CE son los que se han indicado en las Figuras 2-4 anteriormente.

Ejemplo 5

Primer Ejemplo de Combinación

Fracciones de Q-Sepharosa se analizaron mediante CE de la forma siguiente. Los capilares, que tenían un diámetro interior de 50 μ m y una longitud eficaz de 37 cm, se acondicionaron enjuagándolos con NaOH 1,0 N durante 10 minutos a una presión de 137,90 kPa (20 psi) seguido por un enjuague de 20 minutos con tampón de desarrollo. El tampón de desarrollo, ácido fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'O'-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, 0,1 mg/ml de óxido de polietileno, pH 1,9-2,0, se preparó a partir de una solución madre 10X y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m para retirar las partículas que pueden causar obstrucciones en los capilares.

Las muestras se calentaron hasta temperatura ambiente para evitar la formación de agregación cuando se ponían en contacto con tampón de dilución de muestra (ácido Fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'O'-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, pH 1,9-2,2) o tampón de desarrollo. Las muestras que eran <0,5 mg/ml no se analizaron. Las muestras $\geq 0,5$ mg/ml se inyectaron puras mientras que las muestras con una concentración > 2,0 mg/ml se diluyeron hasta 2,0 mg/ml usando tampón de dilución de muestra. Las muestras se inyectaron en el capilar usando presión de 3,45 kPa (0,5 psi) durante 10-60 segundos. A continuación de la inyección de muestra, se inyectó tampón de desarrollo durante 3 segundos a 3,45 kPa (0,5 psi) para concentrar la muestra. Las muestras se separaron durante 25 minutos a 30 kV a un mínimo de 30°C y se detectaron a 214 nm. El capilar se enjuagó antes de cada inyección de muestra posterior con NaOH 0,1 N durante al menos un minuto a 137,90 kPa (20 psi) y tampón de desarrollo durante dos minutos para retirar cualquier muestra retenida de la pared del capilar. El almacenamiento de la muestra se mantuvo a 25-30°C.

Los electroferogramas resultantes se integraron dividiendo los picos en el punto más bajo entre picos vecinos y se calculó el área por ciento corregida.

Usando el procedimiento indicado anteriormente junto con la descripción de la Etapa 4, diagrama de flujo 1, Ejemplo 1, los resultados obtenidos mediante CE son los que se indican en la Tabla 5a más adelante. Se preparó una combinación de isoformas pegiladas enriquecidas usando los criterios de aceptar como fracciones de combinación, las fracciones analizadas mediante CE con una composición de $\geq 74\%$ de PEG4+5+6 (primera fracción) y $\geq 94\%$ de PEG4+5+6 (última fracción) y $\geq 0,5$ mg/ml. Las fracciones 6 a 25 (Tabla 5a más adelante) se seleccionaron y se combinaron en un grupo usando estos criterios. El material de partida de UF/DF#3 y las fracciones agrupadas combinadas se sometieron a análisis de CE como se ha indicado anteriormente. Después de la selección y combinación de las fracciones, el análisis del material combinado muestra enriquecimiento de las isoformas de PEG-4, PEG-5 y PEG-6. Véase la Tabla 5b que indica lo mismo más adelante.

TABLA 5a

Nº de Fracción	Conc. de Proteína mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG-(4+5+6)
1	0,23								
2	0,65								0
3	0,91			2	18	40	32	9	60
4	1,06			3	19	41	31	6	63
5	1,15			4	22	43	27	5	69

ES 2 337 041 T3

	Nº de Fracción	Conc. de Proteína mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG-(4+5+6)
5	6	1,21			4	26	44	23	3	74
	7	1,27			3	28	49	20		80
	8	1,28			3	25	55	17		83
10	9	1,28			3	25	60	12		88
	10	1,27			4	30	58	8		92
	11	1,25			4	47	43	6		94
15	12	1,23			4	52	39	5		95
	13	1,20			3	62	31	4		96
	14	1,15			5	70	23	3		98
20	15	1,11			6	69	24	1		99
	16	1,06			10	76	15			101
	17	1,02			23	70	7			100
25	18	0,98			31	63	6			100
	19	0,94			44	50	5			99
	20	0,90			54	41	5			100
30	21	0,84			60	35	5			100
	22	0,78			66	29	5			100
	23	0,71			77	21	2			100
35	24	0,64			82	16	2			100
	25	0,58		2	83	13	2			98
40	26	0,54		9	74	17	3			94
	27	0,50		18	68	14	0			82

TABLA 5b

	Nº Fracción	Conc. de Proteína mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
50										
55	Combinación UF/DF#3	5,86		5	21	33	30	9	1	84
60	Fracciones Combinadas	1,04			25	38	30	7		93

Ejemplo 6

Segundo Ejemplo de Combinación

5 Fracciones de Q-Sefarosa se analizaron mediante CE de la forma siguiente. Los capilares, que tenían un diámetro interior de 50 μm y una longitud eficaz de 37 cm, se acondicionaron enjuagándolos con NaOH 1,0 N durante 10 minutos a una presión de 137,90 kPa (20 psi) seguido por un enjuague de 20 minutos con tampón de desarrollo. El tampón de desarrollo, ácido fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'-O-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, 0,1 mg/ml de óxido de polietileno, pH 1,9-2,0, se preparó a partir de una solución madre 10X y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm para retirar las partículas que pueden causar obstrucciones en los capilares.

15 Las muestras se calentaron hasta temperatura ambiente para evitar la formación de agregación cuando se ponían en contacto con tampón de dilución de muestra (ácido Fosfórico 40 mM, 4 mg/ml de O'-O-Bis (2-aminopropil) polietilenglicol, pH 1,9-2,2) o tampón de desarrollo. Las muestras que eran <0,5 mg/ml no se analizaron. Las muestras $\geq 0,5$ mg/ml se inyectaron puras mientras que las muestras con una concentración > 2,0 mg/ml se diluyeron hasta 2,0 mg/ml usando tampón de dilución de muestra. Las muestras se inyectaron en el capilar usando presión de 3,45 kPa (0,5 psi) durante 10-60 segundos. A continuación de la inyección de muestra, se inyectó tampón de desarrollo durante 3 segundos a 3,45 kPa (0,5 psi) para concentrar la muestra. Las muestras se separaron durante 25 minutos a 30 kV a un mínimo de 30°C y se detectaron a 214 nm. El capilar se enjuagó antes de cada inyección de muestra posterior con NaOH 0,1 N durante al menos un minuto a 137,90 kPa (20 psi) y tampón de desarrollo durante dos minutos para retirar cualquier muestra retenida de la pared del capilar. El almacenamiento de la muestra se mantuvo a 25-30°C.

25 Los electroferogramas resultantes se integraron dividiendo los picos en el punto más bajo entre picos vecinos y se calculó el área por ciento corregida.

30 Usando el procedimiento indicado anteriormente junto con la descripción de la Etapa 4, diagrama de flujo 1, Ejemplo 1, los resultados obtenidos mediante CE son los que se indican en la Tabla 6a más adelante. Se preparó una combinación de isoformas pegiladas enriquecidas usando los criterios de aceptar como fracciones de combinación, las fracciones analizadas mediante CE con una composición de $\geq 75\%$ de PEG4+5+6 (primera fracción) y $\geq 94\%$ de PEG4+5+6 (última fracción) y $\geq 0,5$ mg/ml. Las fracciones 3 a 20 (Tabla 6a más adelante) se seleccionaron y se combinaron en un grupo usando estos criterios. El material de partida de UF/DF#3 y las fracciones agrupadas combinadas se sometieron a análisis de CE como se ha indicado anteriormente. Después de la selección y combinación de las fracciones, el análisis del material combinado muestra enriquecimiento de las isoformas de PEG-4, PEG-5 y PEG-6. Véase la Tabla 6b que indica lo mismo más adelante.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 337 041 T3

TABLA 6a

	Nº de Fracción	Conc de proteína mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
5	1	0,17								
10	2	0,59			3	26	40	25	5	69
	3	0,88			5	29	45	19	3	78
	4	1,04			6	28	49	16	2	83
15	5	1,16			6	28	50	14		98
	6	1,24			5	30	55	10		100
	7	1,27			5	33	54	8		100
20	8	1,27			5	39	51	5		100
	9	1,27			5	50	42	4		100
	10	1,24			5	60	33	2		100
25	11	1,21			6	66	25	3		100
	12	1,17			8	74	18			100
	13	1,13			15	73	12			100
30	14	1,09			21	71	8			100
	15	1,05			37	57	5			100
	16	1,01			48	47	5			100
35	17	0,97			56	40	4			100
	18	0,91		2	62	32	4			98
	19	0,84		0	81	19				100
40	20	0,77		1	78	21				99
	21	0,71		7	77	16				93
	22	0,66		12	76	12				88
45	23	0,61		19	70	11				81
	24	0,57		22	70	9				79

50

TABLA 6b

	Nº de Fracción	Conc. Proteína mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
55	Combinación de UF/DF#3*	3,51		9	27	37	22	4		86
60	Fracciones combinadas	1,08			22	46	28	5		96
65	* medido en la combinación de HIC									

ES 2 337 041 T3

Aunque la descripción anterior se proporciona con respecto a B-2036 recombinante y B-2036 PEG recombinante, a menos que se indique de otra manera, se aprecia que el sujeto de la invención se puede usar con cualquier antagonista de la hormona del crecimiento pegilado recombinante, ya sea antagonista de la hormona del crecimiento de mamíferos, antagonista de la hormona del crecimiento humana pegilado o antagonista de la hormona del crecimiento bovino pegilado, etc.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para disminuir un nivel de agregación de un antagonista de hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) proporcionar dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo;
- (b) cargar dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo incluyendo cualquier impureza y cualquier agregación del mismo en una resina de intercambio aniónico (AEX), en el que la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 10 mS/cm, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 y a una concentración de proteína de menos de o igual a aproximadamente 10 g de proteína/l de volumen de lecho cargado de resina de AEX; y
- (c) separar dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo mediante cromatografía de AEX.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha resina de AEX se selecciona entre el grupo constituido por ANX4TM, DEAETM, Q-SefarosaTM, Q-Sefarosa FFTM, Q-Sefarosa HPTM y Q-Sefarosa XLTM.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que, en la etapa (b), la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 5 mS/cm.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que, en la etapa (b), la carga se conduce a una conductividad de menos de o igual a aproximadamente 2,4 mS/cm.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa (b) se conduce a un pH de carga de AEX de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 9.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa (b) se conduce a un pH de carga de AEX de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo comprenden antagonista de la hormona del crecimiento (GH) e isoformas del mismo pegilados en uno o más sitios.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado e isoformas del mismo comprenden una o más de dichas isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado seleccionadas entre el grupo constituido por:

PEG-1 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con una molécula de PEG o variante del mismo),

PEG-2 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con dos moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-3 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con tres moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-4 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con cuatro moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-5 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con cinco moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-6 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con seis moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-7 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con siete moléculas de PEG o variante del mismo),

PEG-8 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con ocho moléculas de PEG o variante del mismo), y

PEG-9 (una molécula de B-2036 (SEC ID N°: 1) con nueve moléculas de PEG o variante del mismo),

y cualquier agregación, impureza trisulfuro (molécula de antagonista de la hormona del crecimiento (GH) que contiene un átomo de azufre adicional que forma un "puente trisulfuro" dentro de la molécula) e impureza des-phe (molécula de antagonista de la hormona del crecimiento (GH) a la que le falta su fenilalanina amino-terminal) del mismo y cualquier impureza no pegilada de dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) y cualquier molécula de PEG libre.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo además una etapa de combinación (d) para combinar cantidades específicas de las isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado para producir

ES 2 337 041 T3

un antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado combinado mediante una técnica seleccionada entre el grupo constituido por:

electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografía de intercambio iónico (IEX) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico (AEX), cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RPHPLC), cromatografía líquida de presión alta de exclusión por tamaño (SEHPLC), cromatografía de afinidad (AC) y combinaciones de las mismas.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado combinado comprende uno o más de PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que una fracción antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilada combinada de PEG-4, PEG-5 y PEG-6 comprende al menos aproximadamente el 70% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas del antagonista de la hormona del crecimiento (GH) pegilado PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 y PEG-9 y cualquier agregación de los mismos.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho nivel disminuido de dicha agregación es menor que o igual a aproximadamente el 10% en peso basándose en un peso total de dichas isoformas y dicha agregación.

FIG. 1A

B-2036

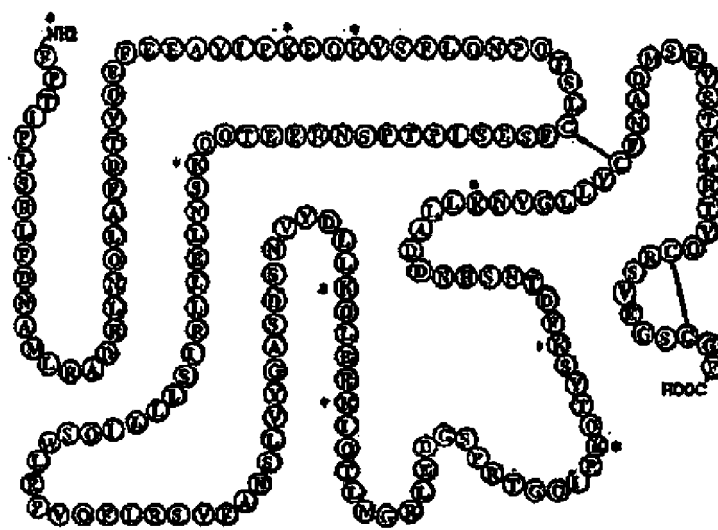
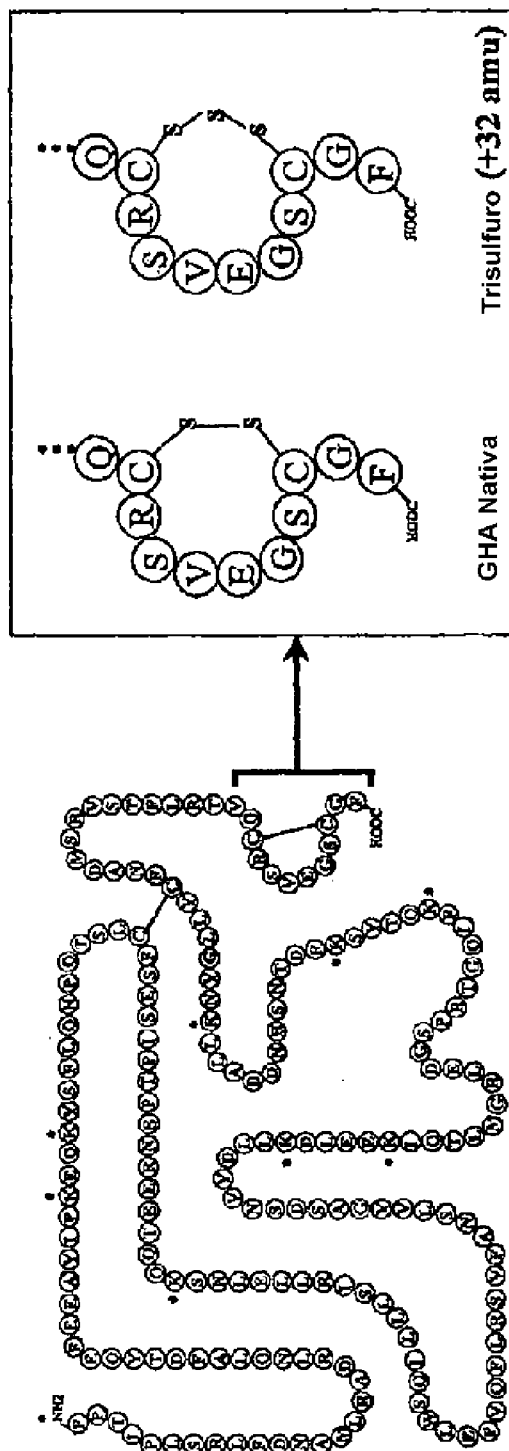


FIG. 1B

(Impureza de Isoforma Trisulfuro de B-2036)



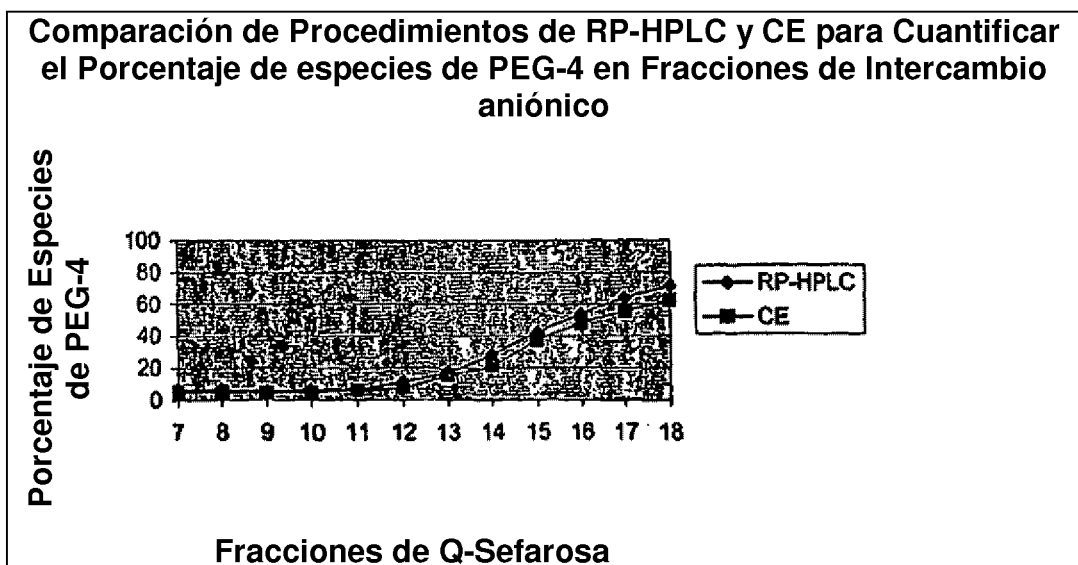


Figura 2

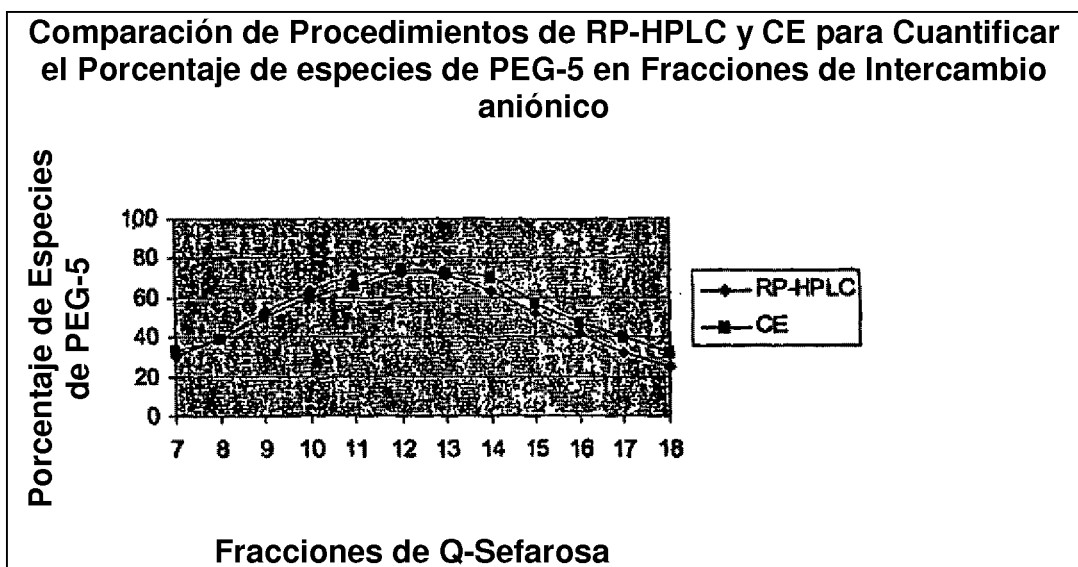


Figura 3

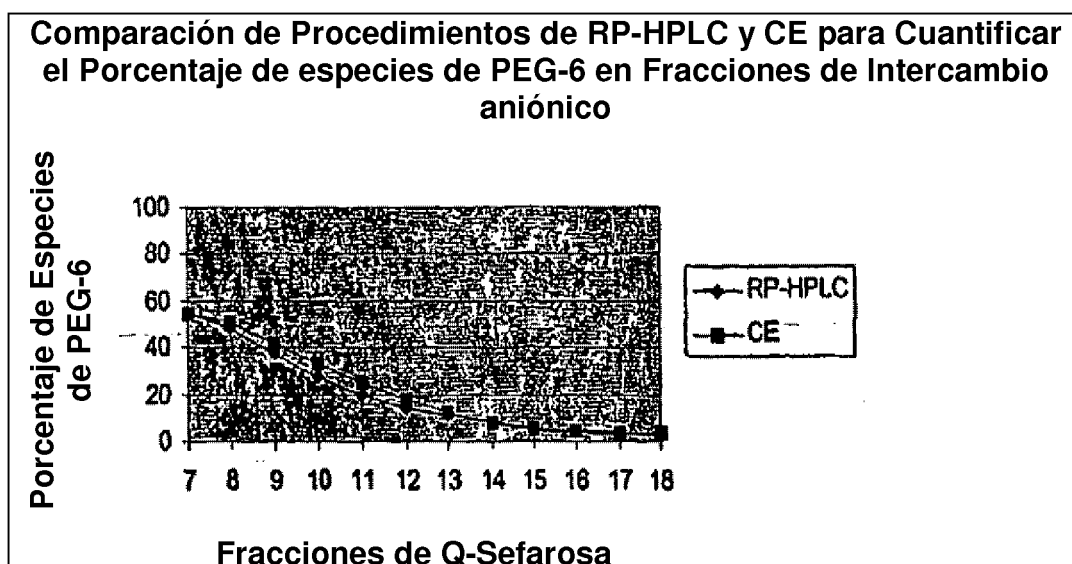


Figura 4

ES 2 337 041 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Boyle y col.

5 <120> Procedimiento para Disminuir los Niveles de Agregación de Proteína Pegilada

<130> 161765.00521

10 <150> US 60/412.227

<151> 02-09-2002

<160> 2

15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

20 <211> 191

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg
	1				5					10					15	
30	Ala	Asp	Arg	Leu	Asn	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu
				20					25					30		
	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro
			35					40					45			
	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg
35		50					55				60					
	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu
	65					70				75						80
	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val
					85				90						95	
40	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp
			100						105					110		
	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu
			115					120					125			
	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser
45		130					135					140				
	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr
	145					150				155						160
	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Asn	Ala	Asp	Met	Ser	Arg	Val	Ser	Thr	Phe
					165					170					175	
50	Leu	Arg	Thr	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	
				180					185					190		

55 <210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 337 041 T3

<400> 2

	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg
5	1				5					10					15	
	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu
				20					25					30		
	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro
			35				40						45			
10	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg
		50					55					60				
	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu
	65					70				75					80	
	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val
15					85					90					95	
	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp
				100					105					110		
	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu
			115					120					125			
20	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser
		130					135					140				
	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr
	145					150					155				160	
25	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe
					165					170					175	
	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	
				180					185					190		