



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 120**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05826671 .9**

96 Fecha de presentación : **20.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1833841**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Método para prevenir la formación de derivados de trisulfuro de polipéptidos.**

30 Prioridad: **29.12.2004 DK 2004 02022**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.08.2010

73 Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Becker, Peter y**
Christensen, Thorkild

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 344 120 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

Método para prevenir la formación de derivados de trisulfuro de polipéptidos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para prevenir la formación de derivados de trisulfuro de polipéptidos durante la producción o tratamiento del mismo en medios líquidos.

10 En particular, la invención se refiere a la producción de una hormona del crecimiento humana, o un intermediario, derivado, análogo, variante o mutante de la misma, que está sustancialmente libre de, o contiene una cantidad reducida de, derivado(s) de trisulfuro.

Antecedentes de la invención

15 Varios polipéptidos conteniendo enlaces de disulfuro se conocen por formar derivados de trisulfuro. Entre estos están superóxido-dismutasa, interleuquina muteína y hormona del crecimiento (GH). En principio, no obstante, otros polipéptidos conteniendo enlaces de disulfuro, p. ej. insulina, interleukinas y determinados factores de coagulación (tales como factor VII) pueden formar de forma potencial derivados de trisulfuro bajo condiciones específicas.

20 Entre la mayoría de los polipéptidos estudiados conocidos por formar derivados de trisulfuro están las hormonas de crecimiento (GH), en particular la hormona del crecimiento humana. El término "hormona del crecimiento humana" (hGH; a veces también referida, entre otras cosas, como "somatropina" o "somatotropina") se entiende generalmente por referirse a la hormona proteínica (polipéptido) que consiste en una única cadena de 191 residuos de aminoácidos reticulados por dos puentes de disulfuro, teniendo la forma monomérica de la misma un peso molecular de aprox. 22.000 (22 kDa). Las preparaciones de hormonas del crecimiento aisladas de la glándula pituitaria humana no son homogéneas. Por ejemplo, también se conoce una variante más pequeña (20 kDa) producida a partir del mismo gen. La variante "hGH básica" (hGH-V) expresada por la placenta durante el embarazo es otro análogo/variante el cual es un producto de un gen separado; como el polipéptido hGH de 22 kDa éste consiste en 191 residuos de aminoácidos, pero 13 residuos de aminoácidos en diferentes posiciones en la secuencia difieren de los de la hGH de 22 kDa [véase, p. ej. Bewley *et al.*, Adv. Enzymol. 42, 73-166 (1975), y Frankenne *et al.*, J. Clin. Endocrin. and Metabol. 66, 1171-1180 (1988)].

35 En la hGH (es decir, el polipéptido de 22 kDa), cuatro residuos de cisteína están presentes proporcionando altura a los dos puentes de disulfuro. El primer puente de disulfuro forma un bucle mayor entre Cys 53 y Cys 165, mientras que el segundo forma un bucle menor entre Cys 182 y Cys 189. El bucle menor se localiza en la superficie de la molécula, mientras que el bucle mayor se introduce en la molécula de hGH. Una formación de puente de trisulfuro puede ocurrir en el bucle menor y en el mayor.

40 La hormona del crecimiento humana es esencial, entre otras cosas, para el crecimiento del hueso longitudinal y el desarrollo del crecimiento normal durante la infancia. Se conocen otros numerosos efectos o aplicaciones de la hGH, incluyendo la mejora en la curación de fracturas de hueso, la descomposición del tejido adiposo y la minimización del síndrome de fatiga postoperatoria.

45 La producción de polipéptidos terapéuticamente útiles, p. ej. la hGH, en una escala industrial se realiza en la actualidad habitualmente usando técnicas recombinantes. Algunos de los procesos recombinantes desarrollados usan huéspedes bacterianos, tales como diferentes cepas de *Escherichia coli*, mientras que otros procesos usan microorganismos eucarióticos, tales como levaduras (p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*), como huéspedes.

50 Después de la producción (fermentación), el medio comprendiendo el polipéptido recombinante normalmente se sigue procesando. Durante un tratamiento de este tipo el polipéptido puede someterse a diferentes procesos de extracción y purificación, tales como centrifugado, microfiltración y/o ultrafiltración.

55 Uno de los problemas encontrados usando métodos de fabricación recombinantes convencionales para producir polipéptidos es la formación de subproductos de polipéptidos. En la producción de polipéptidos conteniendo enlaces de disulfuro, la formación de derivados, en particular de derivados de trisulfuro, puede ser problemática.

60 El derivado del trisulfuro en cuestión es uno donde la molécula peptídica contiene un átomo de azufre extra que forma un "puente de trisulfuro" dentro de la molécula. Tal derivado de trisulfuro se ha aislado durante la producción de la hormona del crecimiento, donde ésta constituye un subproducto indeseable.

65 Así, WO 94/24157 expone un método para detectar un derivado hidrofóbico de hGH comprendiendo un átomo de azufre extra en comparación con la hGH nativa. El átomo de azufre extra del derivado hidrofóbico de hGH forma un "puente de trisulfuro" produciendo un derivado de trisulfuro de hGH (TS-hGH). También se describe un método para reconvertir este derivado de trisulfuro de la hGH de nuevo a su forma nativa de hGH tratando el derivado de trisulfuro de la hGH con un compuesto de mercapto, tal como cisteína, glutatona, 2-mercaptoetanol o ditiotreitól.

Además, el derivado de trisulfuro de la hGH se ha descrito por Andersson *et al.*, "Isolation and characterization of a trisulfide variant of recombinant human growth hormone formed during expression in *Escherichia coli*", ("Aislamiento y caracterización de una variante de trisulfuro de la hormona del crecimiento humana recombinante formada durante la expresión de *Escherichia coli*") Int. J. Peptide Protein Res. 47 (1996) págs. 311-321, y por A. Jespersen *et al.*, "Characterisation of a trisulfide derivative of biosintetic human growth hormone produced in *Escherichia coli*", ("Caracterización de un derivado de trisulfuro de la hormona del crecimiento humana producida en *Escherichia coli*") Eur J. Biochem. 219 (1994) págs. 365-373 (1994), y derivados de trisulfuro también se han proporcionado para otros péptidos, es decir, superóxido-dismutasa recombinante [Briggs *et al.*, Biochem. Biophys. Acta, 537 (1978) págs. 100-109] y una muteína de interleuquina [J. Bretón *et al.*, J. Chromatogr. A 709 (1) (1995) págs. 135-46].

WO 96/02570 describe otro método para reconvertir el derivado de trisulfuro de la hGH de nuevo a su forma nativa de hGH tratando el derivado con un compuesto de sulfito, tal como sulfito de sodio, sulfito de potasio o sulfito de amonio, o un sulfito de metal alcalinotérreo tal como sulfito de magnesio o sulfito de calcio.

WO 00/02900 describe, entre otras cosas, un método para la producción de péptidos recombinantes con una cantidad baja de trisulfuros, caracterizado por la adición de una sal metálica (p. ej. potasio o sal sódica) durante o después de la etapa de fermentación.

WO 04/31213 expone, entre otras cosas, un método para reducir la cantidad de una impureza de isoforma de trisulfuro producida en la producción recombinante de un "polipéptido de antagonista de la hormona del crecimiento" en células huéspedes genéticamente modificadas, donde la impureza se pone en contacto con un "compuesto de mercapto" (ejemplificado por sulfitos, glutatión, β -mercapto-etanol, ditiotretol, cisteína y otros). La solicitud también expone el uso de agentes quelantes o sales metálicas para conseguir una reducción en la cantidad de trisulfuro formado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la distribución de especies de sulfuro de hidrógeno (H_2S , HS y S^{2-} , respectivamente) en agua a 20°C como una función del pH.

La Figura 2 muestra mecanismos sugeridos de formación de derivados de trisulfuro de péptidos en presencia de H_2S .

La Figura 3 muestra el impacto de la exposición en la formación de TS-hGH en homogeneizado micro-filtrado, a partir de un cultivo discontinuo produciendo hGH.

Breve descripción de la invención

Se ha descubierto sorprendentemente que la formación de un derivado de trisulfuro de un polipéptido durante la producción y/o el tratamiento del polipéptido en un medio líquido puede minimizarse o evitarse mediante un proceso en el cual el medio líquido se deshace con un gas, p. ej. por aireación del medio mediante el pasaje a través del mismo de una corriente de burbujas del gas en cuestión.

Descripción detallada de la invención

Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a un método para reducir o prevenir sustancialmente la formación de un derivado de trisulfuro de un polipéptido en un medio líquido (típicamente un medio acuoso) conteniendo el polipéptido, comprendiendo el método la desorción del medio líquido con un gas tal y como se define en las reivindicaciones.

Polipéptidos

El polipéptido de interés puede ser de origen natural o sintético, y el método según la invención por tanto no está limitado a aplicaciones para polipéptidos recombinantes o para polipéptidos producidos por otros medios bajo condiciones controladas, sino que pueden aplicarse de forma potencial a polipéptidos extraídos a partir de cualquier fuente, p. ej. de una planta o un animal.

Como se ha mencionado anteriormente, varios polipéptidos se conocen por ser propensos a formar derivados de trisulfuro. Estos polipéptidos, particularmente polipéptidos terapéuticos, normalmente contienen uno o más enlaces de disulfuro, y entre estos están superóxido-dismutasa, interleuquina muteína y hormonas del crecimiento (GH). En principio, otros polipéptidos conteniendo enlaces de disulfuro, p. ej. insulina, pueden formar de forma potencial derivados de trisulfuro bajo condiciones apropiadas.

Entre la mayoría de los polipéptidos estudiados conocidos por formar impurezas derivadas de TS están las hormonas de crecimiento (GH), y en formas de realización de la invención el polipéptido de interés es una hormona del crecimiento, tal como una hormona del crecimiento mamífera (p. ej. GH humana, bovina, equina, porcina, ovina, canina o felina), una GH aviar, o GH de salmón, trucha o atún, particularmente la hormona del crecimiento humana (hGH), hGH producida de forma notablemente recombinante (rhGH). El término hormona del crecimiento en el contexto de la invención también comprende: formas truncadas de GH, es decir formas truncadas de una hormona

del crecimiento donde uno o más residuos de aminoácidos se ha/han delecionado; análogos de GH, donde uno o más residuos de aminoácidos en la molécula nativa se ha/han sustituido por otro residuo de aminoácido, preferiblemente un residuo de un aminoácido de origen natural, mientras que la sustitución no cause ningún efecto adverso tal como antigenicidad o actividad reducida; y derivados de GH, p. ej. formas deamidadas o sulfoxidadas de la hormona del crecimiento, o formas con una extensión N- o C-terminal (tal como Met-hGH, Met-Glu-Ala-Glu-hGH o Ala-Glu-hGH). Otros derivados de GH de relevancia incluyen aquellos en los cuales una GH (p. ej. hGH) se conjuga a una molécula tal como una albúmina, p. ej. albúmina de suero humano (véase, p. ej., WO 97/24445), o un polímero hidrosoluble tal como un polietilenoglicol (PEG) (véase, p. ej., WO 03/044056), para conseguir, p. ej., una duración prolongada de la actividad de GH. Como ya se ha indicado, entre las hormonas del crecimiento *per se*, la hormona del crecimiento preferida en relación con el tratamiento de seres humanos es normalmente hGH [es decir, la hormona del crecimiento humana natural, la hormona del crecimiento humana producida de forma particularmente recombinante (rhGH) la cual es idéntica a la hormona natural], y formas truncadas, análogos y derivados de hGH de los tipos últimos son de relevancia en el contexto de la presente invención.

15 Desorción

En el contexto presente, el término “desorción” se refiere al desplazamiento o la eliminación de un componente volátil (p. ej. un componente disuelto que en su estado nativo bajo condiciones ambientales es un gas) del medio líquido mediante la aireación del medio líquido con un gas adecuado (véase abajo) a una velocidad y temperatura apropiadas, y durante un espacio de tiempo apropiado.

Esto puede hacerse, por ejemplo, pasando el gas en cuestión a través del medio líquido (p. ej. enviando una corriente de burbujas de gas en el medio), con o sin agitación u otros medios de mezcla, o mediante otros medios creando una gran interfaz de fase gaseosa/fase líquida en la cual pueda tener lugar una difusión de gas entre fases. A este respecto, los parámetros que pueden ajustarse para conseguir un efecto de desorción deseado incluyen:

duración del contacto entre el gas (gas de desorción) y el medio líquido;

velocidad de introducción/pasaje del gas de desorción en el medio líquido;

volumen del gas de desorción empleado;

magnitud del área de superficie de contacto entre la fase gaseosa y la fase líquida;

vigorosidad de agitación/mezclado;

pH del medio líquido; y

temperatura del medio líquido y/o el gas de desorción.

El sulfuro de hidrógeno puede formarse en presencia de una fuente conteniendo sulfuro apropiada (p. ej. un polipéptido conteniendo un puente de disulfuro en sí mismo) en un medio líquido bajo condiciones redox apropiadas, y en relación con la presente invención se cree (véase abajo) que la presencia de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y/o de formas deprotonadas de las mismas (es decir, HS^- y/o S^{2-}) juega un papel importante en la formación de derivados de trisulfuro (TS) de polipéptidos.

Sin estar atado a ninguna teoría, se cree que H_2S puede inducir la formación de derivados de TS de determinados polipéptidos conteniendo puentes de disulfuro [p. ej. hormonas del crecimiento (GH), tales como la hormona de crecimiento humana (hGH)] por uno o los dos mecanismos ilustrados esquemáticamente en la Fig. 2. En el primer mecanismo propuesto (parte superior de la Figura 2), un agente oxidante (denominado “Ox.”), p. ej. oxígeno (O_2), presente en la solución actúa por oxidación de S en H_2S con la formación presente de un puente de trisulfuro en el polipéptido. En el segundo mecanismo propuesto (parte inferior de la Figura 2), el polipéptido en sí mismo actúa como un agente oxidante, formando un puente de trisulfuro en presencia de H_2S .

Sin estar atado a ninguna teoría, se cree que el desplazamiento o la eliminación de H_2S del medio líquido en cuestión puede jugar un papel más importante a la hora de reducir o eliminar la formación de derivados de TS indeseados.

El sulfuro de hidrógeno es un gas moderadamente hidrosoluble débilmente ácido, el cual en solución acuosa existe en equilibrio dinámico con las especies aniónicas HS^- y S^{2-} , respectivamente. Es aparente a partir de la Fig. 1 aquí (véase abajo), la cual muestra la distribución de las tres especies H_2S , HS^- y S^{2-} , respectivamente, en agua a 20°C como función del pH, de manera que la proporción de H_2S en solución es extremadamente pequeña a valores de pH mayores de aprox. 9, y se acerca al 100% a un pH de aprox. 4. Suponiendo que H_2S es el único de las tres especies en cuestión que existe en estado gaseoso bajo condiciones ambientales, si la presencia de H_2S en el medio líquido es de hecho de gran importancia en relación con la formación de derivados de TS de polipéptidos, entonces se cree apropiado que la desorción del medio líquido con un gas se desarrolla a pH 9 en el medio líquido, tal como a pH 8, p. ej. a pH 6. Debería, no obstante, destacarse que puesto que el equilibrado entre las tres especies de sulfuro (H_2S , HS^- y S^{2-}) en solución es rápido, en un principio debería ser posible ejecutar la desorción de gas a un pH mayor que 9.

La elección del pH en el medio líquido durante la desorción del gas a la manera de la invención, por supuesto, también será influida por otros factores, tales como la estabilidad del polipéptido de interés durante la formación de otros derivados de los mismos (p. ej. dímeros o oligómeros más altos de las mismas, formas deamidadas de las mismas, formas sulfoxidadas de las mismas, etc.), la invalidación de la precipitación, etcétera.

Gas de desorción

El gas empleado en la desorción del medio líquido a la manera de la invención es un gas que no reacciona significativamente con o de lo contrario afecta contrariamente al polipéptido de interés (u otros componentes centrales o esenciales contenidos en el medio líquido) y se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono de nitrógeno y los gases nobles, en particular helio o argón, helio, argón, o combinaciones de los mismos. No obstante, si la presente creencia del inventor (véase arriba) de que la presencia de H_2S en el medio líquido es de central importancia en relación a la formación de derivados de TS de polipéptidos es correcta, entonces estos gases que son más apropiados para el uso en esa conexión se cree que son gases los cuales son de forma sustancial químicamente inertes, particularmente con respecto a causar oxidación, reducción u otras reacciones, y/o influenciar en las condiciones de pH pertenecientes al medio líquido, y las cuales están fácilmente disponibles en una forma sustancialmente pura a un coste aceptable. Gases de particular relevancia a este respecto incluyen entonces nitrógeno (N_2) y los elementos más abundantes y fácilmente disponibles de los denominados "gases nobles" [los cuales incluyen helio (He), neón (Ne), argón (Ar), kriptón (Kr) y xenón (Xe)], sobre todo helio y argón, particularmente argón. Estos gases (sobre todo N_2 , He y Ar) están fácilmente disponibles a nivel comercial en un alto estado de pureza (típicamente un $\geq 99,8\%$ en volumen para N_2 , y un $\geq 99,9\%$ en volumen o más para He y Ar) en forma comprimida en cilindros de capacidad variable.

En un principio se pueden formar derivados de trisulfuro en cualquier etapa durante la producción y la purificación de un polipéptido del tipo en cuestión. No obstante, hay indicaciones de que es de enorme importancia evitar la formación derivada de TS durante las etapas de purificación post-producción, particularmente las etapas de filtración; así, por ejemplo, en el caso de la hormona del crecimiento humana recombinante (hGH), parece que la formación sustancial de TS-hGH se desarrolla durante, en particular, los procedimientos de filtración subsecuentes a la producción *per se*.

El método según la invención es particularmente adecuado para la aplicación subsecuente a la producción del polipéptido de interés (p. ej. la producción por fermentación en un medio conteniendo un microorganismo modificado expresando recombinantemente el polipéptido), p. ej. conjuntamente con la separación de flujo descendente (post-producción) y/o las etapas de purificación, tales como filtración, microfiltración, ultrafiltración, separación de columna y similares. Empleado en relación a la hormona del crecimiento humana, el método se aplica adecuadamente durante los procedimientos de post-producción antes de las etapas de purificación finales.

En otras formas de realización de métodos según la invención, compuestos que influyen en la estabilidad de, o reducen la formación de derivados indeseables de, el polipéptido deseado pueden añadirse al medio líquido en relación a las etapas de tratamiento post-producción. Así, por ejemplo, se pueden añadir sales de sulfito (p. ej. un sulfito de metal alcalino tal como sulfito de sodio o potasio) o compuestos de mercapto (p. ej. uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en glutatona, β -mercaptoetanol, ditiotreitól, ditioeritritól, mercaptoetilamina, cisteína y cistina) al medio líquido que se va a someter a desorción a la manera de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desorción de H_2S a partir de caldo de fermentación

Se tomó una muestra comprendiendo microorganismos recombinantes de caldo de fermentación [*E. Coli* conteniendo un cassette de expresión comprendiendo el gen codificante para la hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH)] de un lote de producción de hGH. La muestra se homogeneizó, y 6 sub-muestras, cada una de 1.500 ml, se introdujeron en cilindros de medición de 2.000 ml y se agitaron magnéticamente. La desorción de H_2S a partir de sub-muestras se realizó por gas de nitrógeno de burbujeo (obtenible, por ejemplo, a través de Air Liquide Danmark A/S, Ballerup, Dinamarca; $\geq 99,8\%$ de pureza) en cada sub-muestra (temperatura $20^\circ C$) a una velocidad de 15-20 l/hora a través de un tubo de silicona que se extiende hasta el fondo del cilindro de medición. La sub-muestra 1 no se sometió a desorción (control), la sub-muestra 2 se sometió a desorción durante 2,5 horas, mientras que las sub-muestras 3, 4, 5 y 6 se sometieron a desorción durante 20 horas.

Después de la desorción del gas de esta manera, las sub-muestras se purificaron usando un sistema de microfiltración en escala de laboratorio [sistema Millipore Labscale™ TFF usando membranas de polietersulfona modificadas (BIOMAX™-1000)], dando como resultado una formación de TS-hGH muy baja en el permeado recogido. No obstante, en el caso de las sub-muestras 4, 5 y 6, se añadió sulfuro de sodio (Na_2S) hasta concentraciones de aprox. 5, 10 y 15 ppm, respectivamente, antes de la microfiltración.

ES 2 344 120 T3

Determinación de hGH

La cantidad de hGH en las sub-muestras microfiltradas se midió usando un método ELISA dirigido por hGH: en este método un anticuerpo de cobaya policlonal dirigido contra la hormona del crecimiento humana se une a una placa de microtest. Este anticuerpo (anticuerpo de revestimiento) reacciona con la hormona del crecimiento de las muestras. Un anticuerpo policlonal de cobaya marcada con peroxidasa (anticuerpo de detección) dirigido contra hGH reacciona entonces con la hormona de crecimiento ahora fijada. Al añadir sustrato enzimático (sustrato de peroxidasa), la actividad de la peroxidasa en el anticuerpo marcado de peroxidasa resulta en el desarrollo de un color con una intensidad proporcional a la concentración de hormona del crecimiento en la muestra. La reacción se detiene por la adición de ácido, y la absorbancia se lee en un fotómetro a 450 nm, al igual que a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Determinación de TS-hGH

Los niveles de TS-hGH se determinaron por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC): Las condiciones de medición optimizadas se ha observado que se obtienen a una concentración de hGH aproximada en la muestra de 0,71 g l⁻¹, y por tanto se diluyeron muestras para ajustarla a esta concentración de hGH particular. La concentración de hGH inicial se determina a partir de una medición de la absorbancia a 277 nm según la ecuación:

$$C_{hGH} = \text{Absorbancia (277 nm)} * 0.82 \quad (\text{en g l}^{-1})$$

Un volumen total de 15 µl de muestra ajustada se aplicó a una columna de 200 mm de largo y 4,6 mm de ancho. Una elución de gradiente con los siguientes dos eluyentes:

A: 1M (NH₄)₂SO₄; 0,1M de Na₂HPO₄; pH 6.5

B: 0,1M Na₂HPO₄; 5% v/v de CH₃CN; pH 6.5

se realizó como se resume en la siguiente tabla:

Flujo [ml/min]	Tiempo total [min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
0,5	0,0	70	30
0,5	8,0	45	55
0,5	35,0	0	100
0,5	45,0	0	100
0,5	45,1	70	30
0,5	70,0	70	30
0,5	73,0	70	30
0,05	73,5	0	100
Total: 73,5			

Otras condiciones fueron de la siguiente manera:

Temperatura, muestra ajustada: 2°C-8°C

Temperatura, calefactor de columna: 28°C ± 2°C

Longitud de onda, detección de UV: 220 nm

ES 2 344 120 T3

La cantidad relativa de TS-hGH (en porcentaje de peso) en la muestra investigada se obtiene entonces a partir de la siguiente ecuación:

$$TS - hGH \text{ [\%]} = \frac{Area_{TS-hGH} \cdot 100}{Area_{TS-hGH} + Area_{hGH}}$$

Este procedimiento da un límite de cuantificación (LOQ) de 20 ng de TS-hGH contenido en la muestra investigada. Para verificar los resultados medidos para las muestras, se mide un estándar al principio de cada serie y también al final de cada serie.

Determinación de H₂S

Se determinaron las concentraciones de sulfuro de hidrógeno en las muestras líquidas usando la prueba rápida Merck Spectroquant™. Esta prueba está diseñada para medir todas las especies de sulfuro disueltas en muestras acuosas en una extensión de concentración de 0,03 a 3,3 ppm usando un análisis fotométrico. El kit de la prueba contiene tres reactivos diferentes que causan una reacción de color: El sulfuro de hidrógeno reacciona con dicloruro de N,N'-dimetil-1,4-fenilenediamonio (Reactivo 2) para dar leucometilene azul incoloro, el cual se oxida luego con sulfato férrico (Reactivo 3) a cloruro de metiltioninio. El ácido sulfámico (Reactivo 1) previene la interferencia de nitrito. La reacción de color que genera cloruro de metiltioninio resulta en un máximo de absorción pronunciado a 665 nm, con espacios en blanco mostrando prácticamente ninguna absorbancia a esta longitud de onda. Para la medición de niveles de H₂S en caldo de fermentación no filtrado, el caldo se centrifugó (10 min, 5.000 r.p.m.) después de la adición de los tres reactivos. Se usaron soluciones estándar de H₂S de concentración conocida para la calibración.

Los resultados se muestran en la Tabla 1, abajo.

TABLA 1

	(1) Sin desorción			(2) Reducido en sulfuro (2.5h)			(3) Libre de sulfuro (20h)		
Tiempo de filtración (min)	hGH (mg/l)	TS-hGH (%)	H ₂ S (ppm)	hGH (mg/l)	TS-hGH (%)	H ₂ S (ppm)	hGH (mg/l)	TS-hGH (%)	H ₂ S (ppm)
0§	489	19,1	12	515	1,75	3,5	557	1,45	0
10§§	83	32,95	0	79	2,52	0	127	0,53	0
20§§	119	24	0	40	0,28	0	129	0,52	0
	(4) ≈ 5ppm H ₂ S			(5) ≈ 10ppm H ₂ S			(6) ≈ 15ppm H ₂ S		
0§	468	9,48	3,2	507	15,9	7,2	522	21,83	15
10§§	114	6,27	0	121	15,83	0	121	22,96	4,2
20§§	128	5,01	0	144	9,76	0	143	15,29	2,5
§No filtrado									
§§Mediciones hechas sobre permeado de microfiltración									

Estos experimentos indican que H₂S se implica en una formación de TS-hGH, y que la desorción de H₂S del caldo de fermentación homogenizado resulta en la reducción (en la sub-muestra 2) o casi la eliminación (en la sub-muestra 3) de la formación de TS-hGH en el homogeneizado microfiltrado.

Ejemplo 2

Desorción de H₂S en un fermentador

5 Una muestra comprendiendo microorganismos recombinantes de caldo de fermentación [*E. Coli* conteniendo un cassette de expresión comprendiendo el gen codificante para la hormona del crecimiento humana recombinante (rhGH)] se tomó de un lote de producción de hGH y se homogeneizó. Se tomaron 5 sub-muestras idénticas a partir de la muestra del volumen homogenizado. Una de estas sub-muestras (sub-muestra 1) no se sometió a desorción; las 4 sub-muestras restantes se sometieron a desorción por nitrógeno [en un vaso fermentador aireado de nitrógeno (burbujeado) agitado (B. Braun Biostat CT; volumen de trabajo normal 1 litro) con control de pH y temperatura] usando las condiciones detalladas en la Tabla 2, abajo. Los experimentos 2 y 3 se realizaron sin control de pH, siendo el valor de pH dado en la Tabla 2 el valor inicial.

TABLA 2

Experimento (sub-muestra)	Nivel de aeración (vvm)#	Temperatura (°C)	Duración (min)	pH	Velocidad de desorción (rpm)
1 (control)	-	-	-	8	-
2	1	20	95	8,5	1.200
3	0,25	20	30	7,6	600
4	0,25	20	60	7	600
5	0,25	20	1170	7	600
#volumen de gas/volumen de líquido/minuto					

Las muestras se sometieron entonces a microfiltración como se describe en el Ejemplo 1. El análisis del contenido de hGH y TS-hGH se realizó asimismo como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3, abajo.

TABLA 3

	Sub-muestra									
	1		2		3		4		5	
Tiempo de filtración (min)	hGH (g/l)	TS-hGH (%)	hGH (g/l)	TS-hGH (%)	hGH (g/l)	TS-hGH (%)	hGH (g/l)	TS-hGH (%)	hGH (g/l)	TS-hGH (%)
0§	0,660	0,3	0,500	0	0,710	0,9	0,413	0,6	0,120	0
10§§	0,105	13,0	0,290	0	0,113	3,1	0,062	0	0,004	0
20§§	0,106	11,8	0,190	0	0,106	2,0	0,069	0	0,005	0
§No filtrado										
§§Mediciones hechas sobre permeado de microfiltración										

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9424157 A [0011]
- WO 0431213 A [0015]
- WO 9602570 A [0013]
- WO 9724445 A [0021]
- WO 0002900 A [0014]
- WO 03044056 A [0021]

Bibliografía fuera de la patente citada en la descripción

- **Bewley et al.** *Adv. Enzymol.*, 1975, vol. 42, 73-166 [0004]
- **Frankenne et al.** *J. Clin. Endocrin. and Metabol.*, 1988, vol. 66, 1171-1180 [0004]
- **Andersson et al.** Isolation and characterization of a trisulfide variant of recombinant human growth hormone formed during expression in *Escherichia coli* *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1996, vol. 47, 311-321 [0012]
- **Jespersen et al.** Characterisation of a trisulfide derivative of biosynthetic human growth hormone produced in *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 219, 365-373 [0012]
- **Briggs et al.** *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, vol. 537, 100-109 [0012]
- **J. Bretón et al.** *J. Chromatogr. A*, 1995, vol. 709, no. 1. 135-46 [0012]

REIVINDICACIONES

5 1. Método para reducir o prevenir sustancialmente la formación de un derivado de trisulfuro de un polipéptido en un medio líquido conteniendo dicho polipéptido, comprendiendo el método de desorción dicho medio líquido con un gas seleccionado del grupo que consiste en dióxido de carbono, nitrógeno (N₂), o los gases nobles, en particular helio (He), (Ar) argón y combinaciones de los mismos.

2. Método según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido contiene uno o más enlaces de disulfuro.

10 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho polipéptido es un polipéptido producido recombinantemente.

4. Método según la reivindicación 3, donde dicho polipéptido se selecciona de: hGH producida recombinantemente (rhGH); formas truncadas de la misma; sus análogos; y derivados de la misma.

15 5. Método según la reivindicación 3 ó 4, donde dicha desorción se realiza durante el tratamiento de producción o post-producción de dicho polipéptido.

20 6. Método según la reivindicación 3 ó 4, donde dicha desorción se realiza durante el tratamiento de post-producción de dicho polipéptido.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho gas se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, nitrógeno (N₂), helio (He), argón (Ar) y combinaciones de los mismos y neón (Ne), kriptón (Kr) y xenón (Xe).

25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho gas se selecciona del grupo que consiste en nitrógeno (N₂), helio (He) y argón (Ar).

30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido se somete a una o más etapas de purificación después del procedimiento de desorción.

10. Método según la reivindicación 9 comprendiendo al menos una etapa de filtración.

35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde un sulfito o compuesto de mercapto se añade al medio líquido después de la producción de dicho polipéptido.

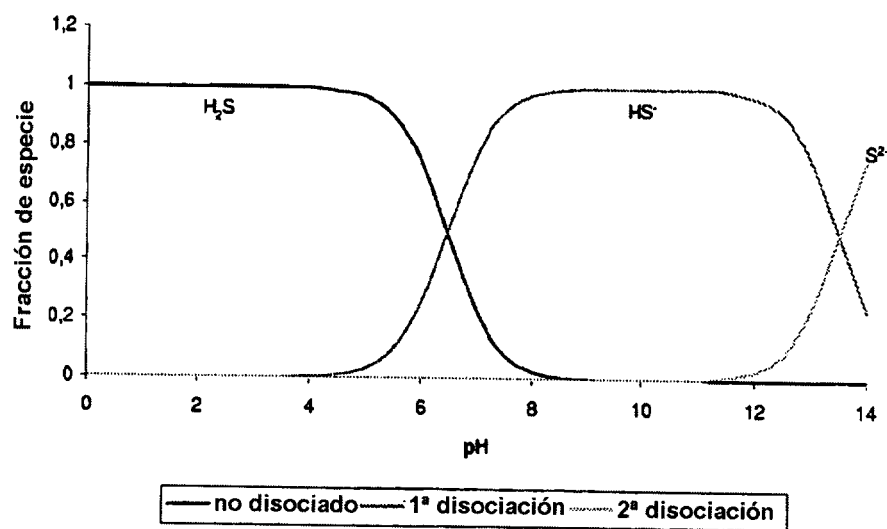


Fig. 1

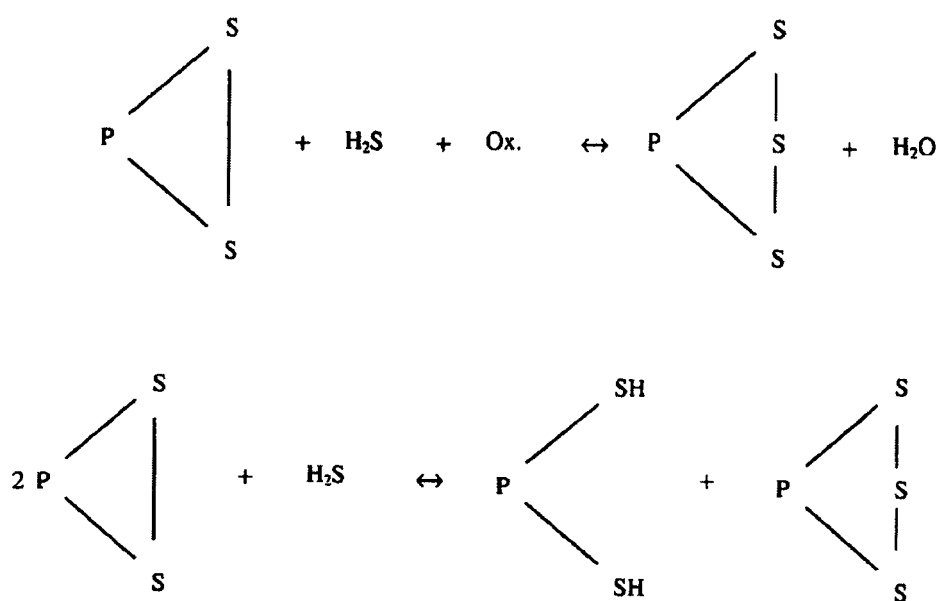


Fig. 2

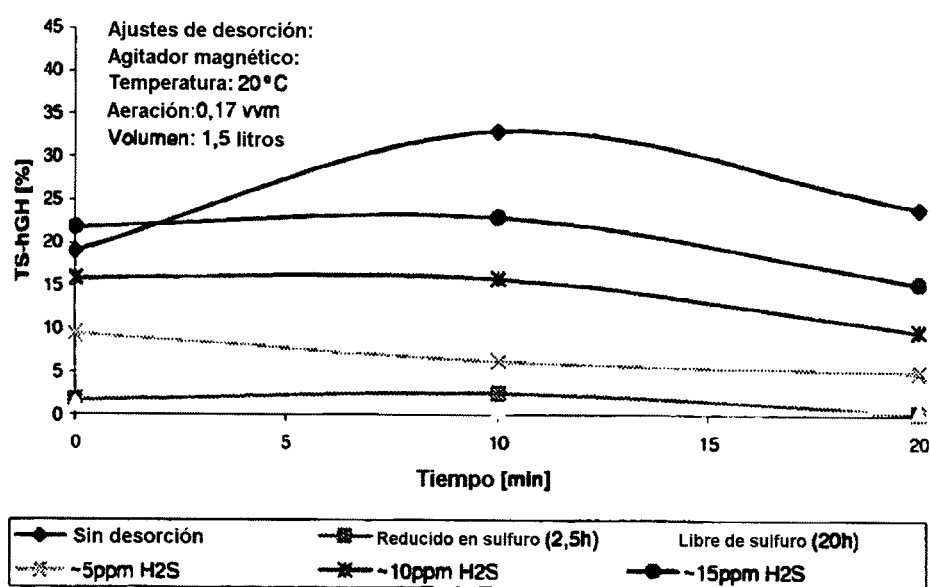


Fig. 3