

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2010.08.02	(73) Titular(es): RATIOPHARM GMBH	
(30) Prioridade(s):	GRAF-ARCO-STRASSE 3 89079 ULM	DE
(43) Data de publicação do pedido: 2012.02.08	(72) Inventor(es): CHRISTIAN SCHECKERMANN	DE
(45) Data e BPI da concessão: 2015.01.21	AXEL ANGERMANN	DE
092/2015	KARSTEN SCHMIDT	DE
	(74) Mandatário: ELSA MARIA BRUNO GUILHERME	
	RUA VICTOR CORDON, Nº 14 - 3º 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA SIALILTRANSFERASE SOLÚVEL ACTIVA**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM POLIPÉPTIDO SIALILTRANS-FERASE, EM PARTICULAR UM POLIPÉPTIDO N-ACETILGALACTOSAMINA (GAL NAC)--2,6-SIALILTRANSFERASE I (ST6GALNACI). O PROCESSO COMPREENDE OS PASSOS DE PRODUÇÃO DO POLIPÉPTIDO SIALILTRANSFERASE NUMA CÉLULA DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO) E DE PURIFICAÇÃO DO POLIPÉPTIDO COM UMA COMBINAÇÃO DE PASSOS DE CROMATOGRAFIA. O PROCESSO RESULTA EM RENDIMENTO ELEVADO DE POLIPÉPTIDO SIALILTRANSFERASE QUE É ALTAMENTE PURO E ACTIVO. A SIALILTRANSFERASE OBTIDA, ESPECIALMENTE ST6GALNACI, PODE SER UTILIZADA PARA A GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS COMO G-CSF.

RESUMO**"PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA
SIALILTRANSFERASE SOLÚVEL ACTIVA"**

A presente invenção refere-se a um processo para a produção e purificação de um polipéptido sialiltransferase, em particular um polipéptido N-acetilgalactosamina (Gal NAc)- α -2,6-sialiltransferase I (ST6GalNAcI). O processo compreende os passos de produção do polipéptido sialiltransferase numa célula de ovário de hamster chinês (CHO) e de purificação do polipéptido com uma combinação de passos de cromatografia. O processo resulta em rendimento elevado de polipéptido sialiltransferase que é altamente puro e activo. A sialiltransferase obtida, especialmente ST6GalNAcI, pode ser utilizada para a glicosilação de proteínas terapêuticas como G-CSF.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA SIALILTRANSFERASE SOLÚVEL ACTIVA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a produção e purificação de um polipéptido N-acetilgalactosamino (GalNAc)-alfa-2,6-sialiltransferase I (ST6GalNAcI). O processo compreende os passos de produção do polipéptido sialiltransferase em células de ovário de hamster chinês (CHO) e de purificação do polipéptido com uma combinação de passos de cromatografia. O processo resulta em alto rendimento de polipéptido sialiltransferase que é altamente puro e enzimaticamente activo. O ST6GalNAcI obtido pode ser utilizado para a glicosilação de proteínas terapêuticas como G-CSF.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma grande diversidade de estruturas de oligossacáridos e muitos tipos de glicopéptidos são encontrados na natureza, e estes são sintetizados, em parte, por um grande número de glicosiltransferases. As glicosiltransferases catalisam a síntese de glicolípidos, glicopéptidos e polissacáridos por transferência de um resíduo

de mono- ou oligossacárido activado de um dador para uma molécula aceitadora existente para iniciar ou alongar uma cadeia de hidrato de carbono. Crê-se que uma reacção catalítica envolve o reconhecimento de ambos o dador e o aceitador por domínios adequados da glicosiltransferase, bem como o sítio catalítico da enzima.

Mais de 30% de todas as proteínas terapêuticas e muitos potenciais péptidos terapêuticos são péptidos glicosilados. É bem conhecido na arte que a ligação da estrutura de glicano correcta pode desempenhar um papel chave na dobragem, actividade biológica, biodistribuição e eficácia farmacológica de péptidos terapêuticos. Além disso, a glicosilação é um factor criticamente importante que influencia a semi-vida e imunogenicidade *in vivo* de péptidos terapêuticos. De facto, os seres humanos vão tipicamente tolerar só os bioterapêuticos que têm tipos específicos de ligações a hidratos de carbono e vão frequentemente rejeitar glicoproteínas que incluem ligações de oligossacáridos não mamíferos. Por exemplo, os péptidos pouco glicosilados são reconhecido pelo fígado como sendo "velhos" e portanto são mais rapidamente eliminados do organismo do que são os péptidos adequadamente glicosilados. Em contraste, os péptidos hiperglicosilados ou os péptidos incorrectamente glicosilados podem ser imunogénicos.

A produção de um glicopéptido recombinante, em contraste com um peptídeo não glicosilado recombinante,

requer que um péptido produzido recombinantemente seja submetido a passos de processamento adicionais, quer *in vivo* no interior da célula quer *in vitro* depois de o péptido ter sido produzido pela célula. O péptido pode ser tratado enzimaticamente, utilizando uma glicosiltransferase para introduzir um ou mais grupos glicosilo no péptido por ligação covalentemente do grupo ou grupos glicosilo ao péptido.

A produção de um glicopéptido por passos *in vitro* externos de processamento de péptidos pode ser demorada e dispendiosa. Isto é devido, em parte, à sobrecarga e custo de produzir glicosiltransferases recombinantes para a glicosilação *in vitro* de péptidos e glicopéptidos para produzir glicopéptidos terapêuticos. Como a procura e utilização de agentes glicoterapêuticos recombinantes aumenta, são necessários novos processos para preparar os glicopéptidos mais eficientemente.

Além disso, à medida que se constata que mais e mais glicopéptidos são úteis para o tratamento de uma variedade de doenças, há necessidade de processos que reduzam o custo da sua produção. Acresce que também há necessidade na arte de desenvolver processos de produção mais eficiente de glicopéptidos recombinantes para utilização no desenvolvimento e aperfeiçoamento de terapêuticas glicopeptídicas.

As glicosiltransferases e a sua utilização para a

glicosilação de proteínas estão descritos no WO2003/031464A2.

As sialiltransferases constituem uma família de glicosiltransferases que catalisam a transferência pós-translacional de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) para substratos de oligossacáridos aceitadores em posições terminais em glicoproteínas e glicolípidos (Paulson *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 17615-17618). Estima-se que o genoma humano codifica mais do que 20 sialiltransferases diferentes necessárias para sintetizar todas as estruturas de sialo-oligossacáridos conhecidos presentes em células de mamíferos, mas só 16 cDNAs de sialiltransferases humanas distintas foram clonados (Tsuji S. *et al.*, 1996, *Glycobiology* 6: 5-7; Tsuji S., 1996, *J. Biochem.* 120: 1-13; Weinstein J. *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 13835-13844). Originalmente, as sialiltransferases foram purificadas bioquimicamente e os seus cDNAs foram clonados utilizando sequências N-terminais. A comparação das sequências de cDNA obtidas revelou duas regiões altamente conservadas, denominadas ps motivos *L*- e *S*-sialilo, que participam na ligação do substrato. Subsequentemente, várias sialiltransferases foram clonadas por PCR utilizando iniciadores degenerados concebidos dentro dos motivos sialilo ou por clonagem de expressão (Nara K. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7952-7956; Nakayama J. *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 3684-3691; Nakayama J. *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7031-7035). A clonagem de genes por expressão diferencial acrescenta uma

abordagem completamente diferente à identificação de novas sialiltransferases com significado funcional putativo em processos relacionados com doenças.

A U.S. 6280989 descreve a clonagem de diferentes sialiltransferases humanas e de murganho e diferentes processos para a purificação destas sialiltransferases. Sticher *et al.* (1991) *Glycoconjugate Journal* 8(1):45-54 descrevem a purificação de uma sialiltransferase de fígado humano.

As sialiltransferases diferem na sua especificidade para o substrato e distribuição nos tecidos, e são classificadas em quatro famílias de acordo com as ligações de hidratos de carbono que sintetizam: as famílias de ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc e ST8Sia. Os membros de cada família apresentam uma actividade forte em relação a certos grupos aceptadores, embora as especificidades para os substratos destas enzimas se sobreponham; uma ligação pode ser sintetizada por múltiplas enzimas.

Uma dessas sialiltransferases específica que tem utilidade no desenvolvimento e produção de glicopéptidos terapêuticos é a *N*-acetilgalactosamina- α 2,6-sialiltransferase (ST6GalNAcI) que catalisa a transferência de ácido siálico de um dador de ácido siálico para um aceptador de ácido siálico. A enzima ST6GalNAcI de frango de comprimento total, por exemplo, está descrita por Kurosawa *et al.* (1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 1402-1409).

No passado, foram desenvolvidos esforços para aumentar a disponibilidade de sialiltransferases recombinantes para a produção *in vitro* de glicopéptidos.

O EP 0 737 745 A1 e a US 5032519 do Institute of Physical & Chemical Research referem-se à utilização de *E. coli* para a produção de uma versão segregada de uma proteína que compreende uma porção, i.e., domínio activo, que é derivada de ST6GalNAcI e é responsável pela sua actividade.

O WO 2007/056524 A2 de Neose Technologies Inc. descreve processos de produção de um polipéptido ST6GalNAcI modificado, compreendendo o processo a cultura de uma célula hospedeira procariótica recombinante em condições adequadas para expressão do polipéptido ST6GalNAcI modificado em células hospedeiras procarióticas. Estes polipéptidos ST6GalNAcI modificados são polipéptidos quiméricos que compreendem uma primeira porção de um polipéptido Gal- β 1,3GalNAc- α 2,3-sialiltransferase (ST3GalI) e uma segunda porção de um polipéptido GalNAc- α -2,6-sialiltransferase I (ST6GalNAcI). Os polipéptidos ST6GalNAcI modificados podem ainda ser polipéptidos truncados sem a totalidade ou uma porção do domínio de sinal de ST6GalNAcI, a totalidade ou uma porção do domínio transmembranar ST6GalNAcI e/ou a totalidade ou uma porção do domínio germinativo ST6GalNAcI em células hospedeiras eucarióticas ou procarióticas.

O US 2006/0234345 A1 de Neose Technologies Inc.

descreve um processo de produção de uma glicosiltransferase eucariótica solúvel num microrganismo procariótico que tem um ambiente oxidante, por a) expressão de um ácido nucleico que codifica a glicosiltransferase eucariótica no microrganismo procariótico; e depois b) crescimento do microrganismo procariótico em condições que permitem a expressão da glicosiltransferase eucariótica activa solúvel dentro de um compartimento celular do microrganismo procariótico.

Skretas *et al.* (2009, *Microbial Cell Factories*, 8:50)) referem-se a um processo para a expressão da sialiltransferase humana ST6GalNAcI em estirpes de *E. coli* modificadas por engenharia genética que têm certos tipos de citoplasma oxidativo ou que co-expressam o factor de activação de chaperones/co-chaperones moleculares, DnaK /DnaJ, GroEL/GroES e Skp, e pode produzir quantidades muito aumentadas de ST6GalNAcI solúvel.

No entanto, a capacidade de *E. coli* para a dobragem de proteínas e formação de ligações dissulfureto não é suficiente, embora haja um certo número de instrumentos desenvolvidos para superar estas limitações. Além disso, o elevado rendimento de expressão de proteínas recombinantes em sistemas de expressão de *E. coli* pode frequentemente conduzir à acumulação de proteínas agregadas, insolúveis que formam corpos de inclusão que pode ser um obstáculo significativo para a obtenção de proteínas solúveis, activas (Brondyk W. H., 2009, *Methods in Enzymology*, Vol. 463, Ch.11).

Para superar os problemas associados à produção de sialiltransferase recombinante em culturas de *E. coli*, foram desenvolvidos sistemas de cultura de células de insectos.

O US 2006/0246544 A1 e o US 2008/0207487 A1 descrevem um processo para produzir uma composição que inclui um polipéptido recombinante, e.g. sialiltransferases, em que o polipéptido é expresso numa célula de insecto (e.g., utilizando um sistema de expressão de baculovírus) e em que a composição está essencialmente isenta de actividade de endoglicanase. O processo inclui submeter uma mistura incluindo o polipéptido a uma cromatografia em modo misto incluindo os passos de: (i) fazer contactar a mistura e um meio de cromatografia em modo misto; e (ii) eluir o polipéptido do meio de cromatografia em modo misto gerando uma fracção não retida compreendendo o polipéptido.

No entanto, a complexidade do sistema de expressão baculovírus-células de insecto, a estabilidade limitada na armazenagem das reservas de sementes virais necessárias e o requisito de títulos de vírus muito altos para uma infecção eficiente podem limitar a sua utilização para a bioprodução em grande escala. Além disso, demonstrou-se que os vectores virais como baculovírus são capazes de infectar células de mamífero, particularmente células humanas (Boyce F. M. e Buchner N. L., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2348-2352 ; Lundstrom et al., 2001, *Cyto-technology*, 35: 213-221). Assim, estes vectores constituem

uma ameaça relativamente a questões de segurança, especialmente quando aplicados na produção de proteínas recombinantes em grande escala, em que são manuseados grandes volumes de células infectadas.

Uma alternativa para superar as limitações descritas da utilização de sistemas de cultura de células de insectos é a utilização de sistemas de células de mamíferos para a produção de sialiltransferases recombinantes.

O WO 2005/121332 A2 de Neose Technologies Inc. descreve métodos de produção de polipéptido ST6GaINAcI truncado isolado que carece da totalidade ou uma porção do domínio de sinal de ST6GaINAcI, da totalidade ou de uma porção do domínio transmembranar ST6GaINAcI e/ou a totalidade ou uma porção do domínio germinativo ST6GaINAcI em células hospedeiras procarióticas e de insectos e genericamente menciona que o polipéptido também pode ser produzido em células de mamífero.

A US 5032519 da Universidade da Califórnia descreve métodos de transfectar uma célula hospedeira, e.g. uma célula CHO, com um vector portador de um gene que expressa uma glicosiltransferase que tem a âncora de membrana e a maior parte da região germinativa substituída com um segmento de sinal de secreção clivável. A glicosiltransferase solúvel resultante, quando expressa na célula, é secretada pela célula. A glicosiltransferase solúvel secretada é então separada do meio de cultura de células

para utilização em aplicações industriais ou investigação da síntese de hidratos de carbono. Além disso, a US 5032519 descreve um processo de purificação de uma glicosiltransferase solúvel por utilização de uma cromatografia de afinidade.

No entanto, nenhum dos documentos mencionados relacionados com a produção de sialiltransferases recombinantes em células de mamíferos descreve um processo para proporcionar uma sialiltransferase recombinante que é altamente activa, purificada até uma qualidade farmacêutica e passível de produção em grande escala.

Portanto, existe ainda necessidade de processos eficazes de produção de sialiltransferases recombinantes tendo actividade e pureza que sejam adequadas para os processos e reacções "em escala farmacêutica", especialmente para a produção de agentes terapêuticos glicopéptidos. Assim, o problema subjacente à presente invenção é proporcionar esses processos para a produção de sialiltransferases recombinantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Este problema é resolvido de acordo com a presente invenção proporcionando, num aspecto, um processo de produção de um polipéptido sialiltransferase, que compreende os passos de:

a) expressar um polipéptido sialiltransferase numa célula CHO;

b) colher o meio de cultura de células contendo o polipéptido sialiltransferase expesso; e purificar o polipéptido sialiltransferase a partir do meio de cultura de células submetendo o meio de cultura de células a (i) dois passos de cromatografia de afinidade ou um passo de cromatografia de afinidade e um passo de cromatografia de modo misto, (ii) um passo de cromatografia de permuta aniónica e (iii) um passo de cromatografia de permuta catiónica, em que a sialiltransferase é ST6GalNAcI.

Numa forma de realização, o polipéptido sialiltransferase é um polipéptido sialiltransferase truncada sem a totalidade ou parte do domínio de sinal de sialiltransferase, a totalidade ou parte do domínio transmembranar de sialiltransferase e/ou a totalidade ou parte do domínio germinativo de sialiltransferase. Preferencialmente, o polipéptido sialiltransferase só compreende o domínio activo da sialiltransferase.

Tipicamente, a ST6GalNAcI é seleccionada do grupo que consiste em: ST6GalNAcI de ser humano, chimpanzé, orangotango, porco, vaca, cão, rato, murganho e frango. Numa forma de realização preferida, a ST6GalNAcI é uma ST6GalNAcI de frango. Mais preferencialmente, o polipéptido ST6GalNAcI compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO:4 ou a SEQ ID NO:6. De acordo com

uma forma de realização da presente invenção, uma cassette de expressão codificadora de uma sequência de sinal de EPO e uma sequência de polipéptido sialiltransferase é utilizada para expressar o polipéptido sialiltransferase em células CHO.

Preferencialmente, o passo a) do processo de produção é realizado por utilização de uma cultura de alimentação descontínua isenta de soro e/ou por realização de uma variação da temperatura de incubação de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ depois de ter atingido uma densidade celular pré-definida.

Numa forma de realização mais preferida, o passo c) é realizado pela ordem seguinte:

- i. uma cromatografia de permuta aniónica;
- ii. uma primeira cromatografia de afinidade;
- iii. uma segunda cromatografia de afinidade ou cromatografia em modo misto;
- iv. uma cromatografia de permuta catiónica.

Tipicamente, a cromatografia de permuta aniónica é realizada com resinas de permuta aniónica ou membranas que contêm grupos dietilaminoetilo (DEAE), grupos aminoetilo quaternários (QAE), grupos amónio quaternários (Q), grupos dimetilaminoetilo (DMAE) e/ou grupos trimetilaminoetilo (TMAE) como grupos funcionais. Preferencialmente, é realizada com uma resina Q-Sepharose Fast Flow disponível

comercialmente, utilizando um tampão de NaCl/Tris-HCl como eluente a um pH na gama entre 7,0 e 8,0.

Geralmente, a cromatografia de afinidade é realizada com resinas de Ni-NTA, resinas Talon, resinas de cromatografia de afinidade com corante, resinas de afinidade para anticorpos, resinas de afinidade para lectina e/ou resinas de afinidade para péptido-ligando. Numa forma de realização preferida, a (primeira) cromatografia de afinidade é realizada com uma resina Blue Sepharose FF disponível comercialmente, utilizando preferencialmente um tampão de cloridrato de L-arginina/fosfato de potássio a um pH na gama entre 7,0 e 8,0 como eluente e a cromatografia em modo misto é realizada com uma resina de hidroxiapatite disponível comercialmente, utilizando preferencialmente um tampão de NaCl/fosfato de potássio a um pH na gama entre 7,0 e 8,0 como eluente.

Tipicamente, a cromatografia de permuta catiónica é realizada com uma resina que contém material de permuta catiónica sulfopropilo ou uma resina com características semelhantes. Preferencialmente, é realizada com uma resina de alto desempenho SP-Sepharose disponível comercialmente, mais preferencialmente utilizando um tampão de NaCl/fosfato de potássio a um pH na gama entre 6,0 e 7,0 como eluente.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método para a

produção e purificação de uma sialiltransferase ST6GalNAcI melhorada que é altamente activa e pura. Este objectivo é conseguido através da expressão de um polipéptido sialiltransferase numa célula CHO, recolha do meio de cultura de células contendo o polipéptido sialiltransferase expresso e purificação do polipéptido sialiltransferase a partir do meio de cultura submetendo o meio de cultura a (i) dois passos de cromatografia de afinidade ou um passo de cromatografia de afinidade e um processo de cromatografia em modo misto e (ii) um passo de cromatografia de permuta aniónica e um passo de cromatografia de permuta catiónica.

Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um processo em que a purificação do polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI é realizada pela seguinte ordem:

- i. uma cromatografia de permuta aniónica;
- ii. uma primeira cromatografia de afinidade;
- iii. uma segunda cromatografia de afinidade ou uma cromatografia em modo misto;
- iv. uma cromatografia de permuta catiónica.

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que o normalmente entendido por uma pessoa com conhecimentos correntes na arte à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer processos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os processos e materiais preferidos são aqui descritos.

A. Polipéptido sialiltransferase e cassette de expressão

Numa forma de realização, o polipéptido sialiltransferase é um polipéptido sialiltransferase truncado sem a totalidade ou parte do domínio de sinal de sialiltransferase, a totalidade ou parte do domínio transmembranar de sialiltransferase e/ou a totalidade ou parte do domínio germinativo de sialiltransferase. Preferencialmente, o polipéptido sialiltransferase só compreende o domínio activo de sialiltransferase. O polipéptido sialiltransferase pode ainda compreender um péptido de sinais.

Numa forma de realização preferida, uma cassette de expressão codificadora de uma sequência de sinal de EPO e uma sequência de polipéptido sialiltransferase é utilizada para expressar um polipéptido sialiltransferase em células CHO.

"Polipéptido", alternativamente referido como uma "proteína", refere-se a um polímero em que os monómeros são aminoácidos e estão unidos entre si através de ligações amida. Adicionalmente, os aminoácidos não naturais, por exemplo, P-alanina, fenilglicina e homoarginina também estão incluídos. Os aminoácidos que não são codificados por genes também podem ser utilizados na presente invenção. Além disso, os aminoácidos que foram modificados para incluir grupos reactivos, sítios de glicosilação, polímeros, unidades terapêuticas, biomoléculas e outros

semelhantes também podem ser utilizados na invenção. Todos os aminoácidos utilizados na presente invenção podem ser o isómero D ou L. O isómero L é geralmente preferido. Além disso, outros peptidomiméticos também são úteis na presente invenção. Tal como aqui utilizado, "péptido" refere-se tanto a péptidos glicosilados como não glicosilados. Também estão incluídos péptidos que são incompletamente glicosilados por um sistema que expressa o péptido. Para um artigo de revisão geral, ver Spatola, A. F., em "Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins", B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, página 26 (1983). O termo polipéptido inclui moléculas que são comumente referidas como proteínas ou péptidos.

O polipéptido sialiltransferase é α -N-acetilgalactosamida α -2,6-sialiltransferase I (ST6GalNAcI) (Kurosawa *et al.*, 1994, J. Biol.Chem. 269:1402-1409).

Um "polipéptido sialiltransferase truncado" refere-se a uma sialiltransferase que tem menos resíduos de aminoácidos do que uma sialiltransferase de ocorrência natural, mas que retém actividade enzimática. Qualquer número de resíduos de aminoácidos pode ser suprimido, desde que a enzima retenha a actividade. Em algumas formas de realização, podem ser suprimidos domínios ou partes de domínios. Numa forma de realização preferida da presente invenção, o polipéptido sialiltransferase só compreende o domínio activo da sialiltransferase.

Um "domínio activo" ou "domínio catalítico" refere-se a um domínio de proteína, ou a uma sua subsequência, que catalisa uma reacção enzimática realizada pela enzima. Por exemplo, um domínio catalítico de uma sialiltransferase vai incluir uma subsequência da sialiltransferase suficiente para transferir um resíduo de ácido siálico de um dador para um sacárido aceitador. Um domínio catalítico pode incluir uma enzima toda, uma sua subsequência, ou pode incluir sequências de aminoácidos adicionais que não estão ligadas à enzima de ocorrência natural, ou uma sua subsequência. Uma região catalítica exemplificativa é, mas não está limitada ao domínio catalítico de ST6GalNacI de frango, que compreende resíduos de aminoácidos de 232 a 566 da sequência de comprimento total de acordo com a SEQ ID NO:2. O domínio catalítico de ST6GalNacI de frango está descrito na SEQ ID N° 4. A sialiltransferase é ST6GalNacI. Tipicamente, a ST6GalNacI é seleccionado do grupo que consiste em: ST6GalNacI de ser humano, chimpanzé, orangotango, porco, vaca, cão, rato, murganho e frango (Kurosawa *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 1402-1409; Skretas *et al.*, 2009, *Microbial cell factories*, 8:50; WO 2005/121332). Numa forma de realização mais preferida, a ST6GalNacI é uma ST6GalNacLI de frango, que é codificada pela sequência de nucleotidos da SEQ ID NO: 1. Preferencialmente, o polipéptido ST6GalNacI é codificada pela sequência de nucleotidos de acordo com SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 5 e tem uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 6, respectivamente.

B. Sistema de expressão

De acordo com a presente invenção, o polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI é expresso numa célula CHO. O procedimento específico utilizado para introduzir o material genético respectivo na célula hospedeira para a expressão da sialiltransferase solúvel não é particularmente crítico. Como será entendido pelo perito na arte, a escolha do promotor, bem como métodos e estratégias para a introdução de material genético na célula hospedeira utilizada para expressar um polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI são bem conhecidos na arte.

Estes incluem a utilização de vectores plasmídicos, vectores virais e qualquer dos outros métodos bem conhecidos para introdução de ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético ou outro material genético estranho numa célula hospedeira. É somente necessário que o procedimento de engenharia genética específico utilizado seja capaz de introduzir com sucesso pelo menos um gene na célula hospedeira que é capaz de expressar a sialiltransferase de comprimento total ou geneticamente modificada ou truncada.

Um "vector" é uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser utilizada para administrar o ácido nucleico isolado ao interior de uma célula. Vários tipos de vectores são conhecidos na arte incluindo, mas não limitados a ácidos nucleicos lineares, ácidos nucleicos associados a compostos iónicos ou anfi-

fílicos, plasmídeos e vírus. Assim, o termo "vector" inclui um plasmídeo de replicação autónoma ou um vírus geneticamente modificado. O termo também deve ser interpretado de forma a incluir compostos não plasmídeos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico para as células, como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomas e outros semelhantes.

Os vectores adequados incluem o vector pSV40, pEF-1- α , pSV2, pT-Rex, pSecTag2, pBudCE4.1 ou pCDNA/His Max, juntamente com, por exemplo, um promotor de CMV. Numa forma de realização preferida da presente invenção, o vector pMOZ-G8, que está concebido para expressão de alto nível de um gene heterólogo, é utilizado para a expressão do polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI. Marcadores de selecção adequados são, entre outros, neomicina, puromicina, higromicina e di-hidrofolato redutase (DHFR).

C. Cultura de células CHO

De acordo com uma forma de realização da presente invenção, o passo a) do processo de produção é realizado por utilização de uma cultura de alimentação descontínua isenta de soro por utilização de uma variação da temperatura de incubação de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ depois de ter atingido uma densidade celular pré-definida de $\geq 5 \times 10^5$ células viáveis/mL, preferencialmente $\geq 5 \times 10^6$ células viáveis/mL

O polipéptido sialiltransferase é produzido numa cultura de alimentação descontínua isenta de soro utilizando uma linha celular derivada de CHO manipulada por engenharia genética para sobre-expressar ST6GalNAc1. O inóculo para o processo de fermentação é cultivado a partir de um frasco do banco de células principal (MCB) utilizando frascos em T ou frascos rotativos, seguido por uma cultura num biorreactor de sementeira. O inóculo é depois transferido para o biorreactor de produção onde ocorre mais expansão de células até a densidade celular ter atingido um nível adequado para produção.

É iniciada uma variação de temperatura a uma densidade celular definido e o nível de glucose é mantido dentro de uma gama definida por alimentação de uma solução de glucose. No final do cultivo a cultura é colhida. As células e os detritos da cultura são removidos da colheita por filtração de profundidade. A colheita é armazenada a 2-8°C até o início da purificação das proteínas.

A Figura 1 ilustra os diferentes passos de cultura e colheita de células de uma forma de realização preferida da presente invenção.

D. Purificação de sialiltransferase

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, a purificação de polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI do meio de cultura é realizada submetendo o meio

de cultura a dois passos de cromatografia de afinidade ou um passo de cromatografia de afinidade e um passo de cromatografia de modo misto e um passo de cromatografia de permuta aniónica e um de catiónica.

Numa forma de realização preferida, a purificação é conseguida pela ordem seguinte:

i. uma cromatografia de permuta aniónica, que concentra a solução contendo enzima e proporciona uma primeira redução de contaminantes como ADN, proteínas da célula hospedeira (HCP) e compostos do meio de fermentação;

ii. uma primeira cromatografia de afinidade, que é utilizada como passo de purificação intermediário para enriquecer a enzima sialiltransferase e reduzir as proteínas da célula hospedeira;

iii. uma segunda cromatografia de afinidade ou cromatografia em modo misto, que é utilizada para reduzir eficazmente o nível de proteínas da célula hospedeira; e

iv. uma cromatografia de permuta catiónica, que é utilizada para remover quaisquer proteínas residuais da célula hospedeira e outros contaminantes.

A Figura 2 ilustra os diferentes passos de purificação de uma forma de realização preferida da presente invenção.

I. Passo de cromatografia de permuta aniónica

De acordo com a presente invenção, o processo de purificação do polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI inclui um passo de cromatografia de permuta aniónica (AEC).

A AEC baseia-se em interacções carga-carga entre as proteínas da amostra e as cargas imobilizados na resina. Na cromatografia de permuta aniónica, os iões de ligação das proteínas são negativos, e o grupo funcional imobilizada na resina é positivo. Resinas de permuta aniónica vulgarmente utilizadas são resina Q, uma amina quaternária, e resina de DEAE (DiEtilAminoEtano). No entanto, em geral o passo de cromatografia de permuta aniónica pode ser realizado com todas as resinas ou membranas de permuta aniónica correntes disponíveis comercialmente. As resinas de permuta aniónica podem ser utilizadas na forma de colunas pré-empacotadas. Alternativamente, as colunas podem ser auto-preparadas. Não há limitações específicas quanto à capacidade e à geometria das colunas a não ser as habituais. O perito na arte sabe que a quantidade de resina de permuta aniónica a ser utilizada depende do teor total de proteínas do fluido de cultura de células ou qualquer outro fluido, e.g., o eluído do passo de cromatografia anterior, aplicado na coluna no passo de captura.

Resinas de permuta aniónica fortes típicas que podem ser utilizadas para os fins da invenção compreendem

grupos funcionais como: aminoetilo quaternário (QAE), unidades de amónio quaternário (Q) e grupos trimetilamónio-etilo (TMAE).

Resinas incluindo unidades aminoetilo quaternário (QAE) incluem, e.g., Toyopearl QAE (disponível de Tosoh Bioscience, Alemanha), Selectacel QAE (um derivado amino-etilo quaternário de celulose, disponível de Polysciences Inc., Pensilvânia, EUA) e outras. Resinas incluindo unidades amónio quaternário (Q) incluem, e.g., Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP, Resource Q (disponível de GE Healthcare, Alemanha), Macro Prep High Q (Bio-Rad, Califórnia, EUA), Toyopearl Super Q (disponível de Tosoh Bioscience, Alemanha) e UNOsphere Q (disponível de Bio-Rad, Califórnia, EUA). Resinas incluindo grupos trimetilamónio-etilo (TMAE) incluem, e.g., Fractogel EMD TMAE (disponível de Merck, Alemanha).

A cromatografia de permuta aniónica é preferencialmente uma cromatografia de permuta aniónica forte, que é realizada utilizando uma resina de permuta aniónica forte tendo grupos funcionais $-N^+(CH_3)_3$, ou uma resina tendo características semelhantes. Exemplos preferidos de resinas de permuta aniónica forte que podem ser utilizadas para os fins da invenção são resinas permutadoras aniónicas fortes de amónio quaternário conhecidas na arte como UNOsphere Q, Q Sepharose HP, Q-Sepharose FF e outras resinas tendo unidades de amónio quaternário (Q). Numa forma de realização mais preferida da presente invenção, a cromatografia

de permuta aniónica é realizada com uma resina Q-Sepharose Fast Flow disponível comercialmente.

O passo de cromatografia de permuta aniónica é realizado preferencialmente utilizando tampões que têm um pH ligeiramente alcalino. Os tampões adequados incluem, por exemplo, tampão borato, trietanolamina/ácido iminodiacético, Tris, acetato de amónio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. É preferida a utilização de um tampão Tris. A eluição da resina de permuta aniónica é normalmente conseguida por aumento da condutividade da fase móvel através da adição de sal, preferencialmente cloreto de sódio. Preferencialmente, a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando um tampão de NaCl/Tris-HCl como eluente a um pH na gama entre 7,0 e 8,0.

II. Primeiro passo de cromatografia de afinidade

De acordo com a presente invenção, o processo de purificação de polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI inclui um passo de cromatografia de afinidade que preferencialmente é uma cromatografia de afinidade com corante.

A cromatografia de afinidade com corante baseia-se na afinidade elevada de corantes imobilizados para sítios de ligação nas proteínas da amostra. O passo de cromatografia de afinidade com corante é realizado utilizando uma resina tendo como um ligando imobilizado um composto corante que é bem conhecido por um perito na arte,

i.e., Azul Cibacron F3G-A. O termo "imobilizado" é bem compreendido por um perito na arte e significa que o ligando é derivatizado no sentido em que está quimicamente ligado à resina. Uma resina particularmente preferida é Blue Sepharose FF (que pode ser obtida de Amersham Biosciences Inc.).

Entende-se que o processo pode ser realizado com resinas alternativas, tendo características semelhantes. Exemplos de resinas alternativas incluem: Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Bioscience), Toyopearl SuperButyl 550, Toyopearl Phenyl 650, Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarose 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (BioRad), cartuchos Econo-Pac blue (Bio-Rad), Blue sepharose HP (Amersham), Cibacron Blue 3GA (Sigma), Blue Sepharose 6FF (GE Healthcare), ProSep PB (Millipore), Methyl Sepharose e CDP Sepharose (Calbiochem).

O passo de cromatografia de afinidade com corante é preferencialmente realizado utilizando tampões tendo um pH ligeiramente alcalino. Os tampões adequados incluem, por exemplo, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES. Numa forma de realização mais preferida, a cromatografia de afinidade com corante é realizada utilizando um tampão de cloridrato de L-arginina/fosfato de potássio a um pH na gama entre 7,0 e 8,0 como eluente.

III. Segundo passo de cromatografia de afinidade ou cromatografia em modo misto

De acordo com uma forma de realização da presente invenção, o processo de purificação do polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI inclui um passo de cromatografia de afinidade como descrito no capítulo II anterior, ou uma cromatografia em modo misto, preferencialmente uma cromatografia em hidroxiapatite.

A cromatografia em hidroxiapatite é uma cromatografia em modo misto que utiliza um fosfato de cálcio hidroxilado insolúvel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que forma tanto a matriz como o ligando. Os grupos funcionais consistem em pares de iões de cálcio carregados positivamente (sítios C) e aglomerados de grupos fosfato carregados negativamente (sítios P). As interacções entre hidroxiapatite e proteínas são complexas e multi-modos. Num método de interacção, grupos amino carregado positivamente em proteínas associam-se aos sítios P carregados negativamente e grupos carboxilo carregados negativamente na proteína interactuam por complexação de coordenação a sítios C (Shepard (2000) *J. of Chromatography* 891:93-98).

A hidroxiapatite cristalina foi o primeiro tipo de hidroxiapatite utilizado em cromatografia. A cromatografia em hidroxiapatite cerâmica é um desenvolvimento adicional em cromatografia de hidroxiapatite. Hidroxiapatite cerâmica refere-se a uma forma de hidroxiapatite em que nanocristais são aglomerados em partículas e fundidos a alta temperatura para criar microesferas cerâmicas estáveis

adequadas para aplicações de cromatografia. Exemplos comerciais de hidroxiapatite cerâmica incluem, mas não estão limitados a CHT Tipo I e CHT Tipo II.

A hidroxiapatite cerâmica tem uma elevada durabilidade, boa capacidade para ligação de proteínas e pode ser utilizada a caudais e pressões mais elevados do que a hidroxiapatite cristalina. (Voia et al. (1993) *Bio-Techniques* 14:650-655). A hidroxiapatite foi utilizada na separação cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, bem como de anticorpos. Na cromatografia em hidroxiapatite, a coluna é normalmente equilibrada, e a amostra aplicada, numa concentração baixa de tampão fosfato e as proteínas adsorvidas são então eluídas num gradiente de concentração de tampão fosfato (Giovannini, (2000) *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529).

Qualquer resina de hidroxiapatite pode ser utilizada para realizar o segundo passo de cromatografia de afinidade do processo de acordo com a invenção. Numa forma de realização preferida, é realizada numa resina de hidroxiapatite cerâmica, como uma resina de hidroxiapatite tipo I ou tipo II. A resina de hidroxiapatite pode ter partículas de qualquer tamanho, como 20, 40 ou 80 μm . Numa forma de realização altamente preferida, a resina de hidroxiapatite cerâmica compreende partículas tendo um tamanho de 40 μm . Uma resina de hidroxiapatite que é particularmente adequada é uma coluna disponível comercialmente com o nome hidroxiapatite cerâmica CHT de tipo I, 40 μm .

Numa forma de realização mais preferida da presente invenção, a cromatografia de afinidade em hidroxapatite é realizada utilizando um tampão de NaCl/fosfato de potássio a um pH na gama entre 6,3 e 7,3 como eluente.

IV. Passo de cromatografia de permuta catiónica

De acordo com a presente invenção, o processo de purificação do polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI inclui um passo de cromatografia de permuta catiónica (CEC).

A CEC se baseia em interações carga-carga entre as proteínas presentes na amostra e as cargas imobilizadas na resina. Na cromatografia de permuta catiónica, os iões de ligação das proteínas são positivos e o grupo funcional imobilizado é negativo. Resinas de permuta catiónica vulgarmente utilizadas são resina S, derivados sulfato, e resinas CM (carboximetilo), iões derivados carboxilados.

No entanto, em geral o passo de cromatografia de permuta catiónica pode ser realizado com todas as resinas ou membranas de permuta catiónica correntes disponíveis comercialmente. As resinas de permuta catiónica podem ser utilizadas na forma de colunas ou membranas pré-vertidas em que está fixo o grupo funcional, e.g., ácido sulfónico. Alternativamente, as colunas podem ser auto-preparadas. Não há limitações específicas quanto à capacidade e à geometria das colunas que não as habituais. O perito na arte sabe que

a quantidade de resina de permuta catiónica a ser utilizada depende do teor total de proteínas do fluido de cultura de células ou qualquer outro fluido, e.g., o eluído do passo de cromatografia anterior.

Diferentes tipos de materiais de permuta catiónica estão disponíveis com diferentes nomes e de uma infinidade de fornecedores como a Bio-Rex.RTM. (e.g., tipo 70), Chelex.RTM. (e.g., tipo 100), Macro-Prep.RTM. (e.g., tipo CM, High S, 25 S), AG.RTM. (e.g., tipo 50W, MP) (todos disponíveis de BioRad Laboratories); WCX 2 (disponível de CIPHERGEN), Dowex.RTM. MAC-3 (disponível de Dow Chemical Company), Mustang C e Mustang S (disponíveis de Pall Corporation), Cellulose CM (e.g., tipo 23, 52), hyper-D, partisphere (disponível de Whatman plc.), Amberlite.RTM. IRC (e.g., tipo 76, 747, 748), Amberlite.RTM. GT 73, Toyopearl.RTM. (e.g., tipo SP, CM, 650M) (todos disponíveis de Tosoh Bioscience GmbH), CM 1500 e CM 3000 (disponíveis de BioChrom Labs), SP-Sepharose.TM, CM-Sepharose.TM (disponível de GE Healthcare), resinas porosas (disponíveis de PerSeptive Biosystems), Asahipak ES (e.g., tipo 502C), CXpak P, IEC CM (e.g., tipo 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (e.g., tipo 420N, 825), IEC QA (e.g., tipo LG, 825) (disponível de Shoko America Inc.), resina de permuta catiónica 50W (disponível de Eichrom Technologies Inc.). Preferencialmente, o material de permuta catiónica é um material de permuta catiónica forte como Macro-Prep.RTM. High S or 25S, MacroCap SP, Toyopearl.RTM.SP 650M, Source S, SP Sepharose ou POLYCAT A.

Numa forma de realização preferida da presente invenção, o passo de permuta catiónica é realizado com uma resina que contém material de permuta catiónica sulfopropilo ou uma resina que tenha características semelhantes. Numa forma de realização mais preferida da presente invenção, a cromatografia de permuta catiónica é realizada com uma resina SP-Sepharose de alto desempenho disponível comercialmente.

O passo de cromatografia de permuta catiónica é preferencialmente realizado utilizando um tampão com um pH ligeiramente ácido. Os tampões adequados incluem, por exemplo, ácido maleico, ácido malónico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido butanoandiólico, ácido acético, fosfato, HEPES e BICINA. É preferida a utilização de um tampão fosfato. A eluição da resina de permuta catiónica é normalmente conseguida por aumento da condutividade da fase móvel através da adição de sal, preferencialmente cloreto de sódio. Preferencialmente, a cromatografia de permuta catiónica é realizada utilizando um tampão de NaCl/fosfato de potássio a um pH na gama entre 6,0 e 7,0 como eluente.

V. Passos de purificação adicionais

Além disso, o processo pode compreender passos de filtração. Os processos de filtração são bem conhecidos pelo perito na arte e todos os métodos comuns podem ser utilizados. O processo pode compreender um ou mais

processos de ultrafiltração em diversos passos do processo. O processo pode compreender nanofiltração, por exemplo, para eliminação viral final.

A ultrafiltração é uma forma de filtração por membrana em que a pressão hidrostática força um líquido contra uma membrana semipermeável. Sólidos em suspensão e solutos de alto peso molecular são retidos, enquanto a água e os solutos de baixo peso molecular passam através da membrana. A ultrafiltração é um método vulgarmente utilizado para a separação para purificação e concentração de soluções macromoleculares, especialmente soluções de proteínas. A ultrafiltração é semelhante à nanofiltração, diferindo contudo em termos do tamanho das moléculas que retém. No quadro da presente invenção, é preferido um corte de peso molecular de 10 kDa (10 kDa UF). Membranas de UF também podem ser utilizadas para diafiltração para remover sais e outras microespécies da solução através de diluição e reconcentração repetida ou contínua.

Preferencialmente, o processo de purificação compreende um ou mais passos de ultrafiltração/ diafiltração. Estes passos de filtração podem ser realizados antes, durante e/ou depois dos passos de cromatografia. Preferencialmente, um passo de diafiltração é realizado entre os passos de cromatografia, por exemplo entre o passo de cromatografia em modo misto e o passo de cromatografia de permuta catiónica, e um passo de ultrafiltração/diafiltração é realizado depois dos passos de cromatografia.

Estes passos de filtração podem ser realizados utilizando dispositivos de filtração disponíveis comercialmente, e.g., disponíveis de GE Healthcare ou Sartorius. A ultrafiltração é preferencialmente realizada utilizando as cassetes Sartocoon e as cassetes Sartocoon Slice fornecidas por Sartorius.

E. Polipéptido sialiltransferase produzido

Noutro aspecto, a presente descrição proporciona polipéptidos sialiltransferases produzidos por qualquer dos processos de acordo com a invenção.

Numa forma de realização, o polipéptido sialiltransferase é um polipéptido sialiltransferase truncada sem a totalidade ou parte do domínio de sinal de sialiltransferase, a totalidade ou parte do domínio transmembranar de sialiltransferase e/ou a totalidade ou parte do domínio germinativo de sialiltransferase. Numa forma de realização preferida da presente invenção, o polipéptido sialiltransferase só compreende o domínio activo de sialiltransferase, sendo o referido polipéptido solúvel. A sialiltransferase é ST6GalNAcI, preferencialmente de frango, mais preferencialmente a sialiltransferase é a proteína de acordo com a SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 6.

Os polipéptidos sialiltransferase ST6GalNAcI produzidos de acordo com os processos da presente invenção têm

várias vantagens em relação aos polipéptidos sialiltransferases do estado da técnica.

Os processos de produção novos e melhorados da presente invenção proporcionam polipéptidos sialiltransferases ST6GalNAcI que são altamente activos, purificados para uma qualidade farmacêutica e passíveis de produção em grande escala.

O termo "puro" refere-se a um polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI que está substancialmente ou essencialmente isento de componentes que normalmente acompanham o material na mistura utilizada para preparar o polipéptido, e.g. ADN ou proteínas da célula hospedeira. Tipicamente, o polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI produzido pelo processo da presente invenção está pelo menos 98% puro, preferencialmente pelo menos 99% puro. A pureza é determinada por qualquer método de análise reconhecido na arte (e.g., intensidade de bandas num gel corado com prata, electroforese em gel de poliacrilamida, HPLC, RP-HPLC, ELISA ou um meio semelhante).

O termo "activo" refere-se à actividade específica de um polipéptido sialiltransferase ST6GalNAcI produzido pelo processo da presente invenção, que significa a actividade catalítica da sialiltransferase, que é a transferência de uma unidade de ácido siálico de uma molécula dadora para uma molécula aceitadora.

A actividade catalítica de ST6GalNAcI refere-se à transferência de uma unidade de ácido siálico de CMP-ácido siálico por uma ligação α 2,6 para um resíduo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ligado por O ao aminoácido treonina/serina de uma glicoproteína. A actividade específica pode ser expressa em unidades de actividade. Tal como aqui utilizada, uma unidade de actividade catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto a um determinado aceitador-substrato, temperatura e valor do pH. Na presente invenção, a actividade específica de ST6GalNAcI está numa gama entre 5 U/mg e 10 U/mg, preferencialmente 6 U/mg a 9 U/mg, mais preferencialmente 7 U/mg a 8 U/mg.

A actividade de sialiltransferase pode ser determinada por métodos conhecidos. Esses métodos incluem o doseamento por fluorescência, doseamentos por RP-HPLC e abordagens radioactivas (Spiegel *et al.*, 1992, *J. Chromatogr.*, 573(1):23-7; Gross *et al.*, 1990, *Anal. Biochem.*, 186(1):127-34; Skretas *et al.*, 2009, *Microbial cell factories*, 8:50).

F. Utilização de sialiltransferases

Noutro aspecto, a presente invenção inclui a utilização da ST6GalNAcI produzida pelo processo de acordo com a invenção para a glicosilação de proteínas terapêuticas, em particular para a glico-PEGilação de G-CSF humano, eritropoietina, IFN, hGH, FSH, insulina ou anticorpos.

A glicosiltransferase ST6GalNAcI é um reagente essencial para a glicosilação de proteínas terapêuticas. Adicionalmente, a ST6GalNAcI é um reagente importante para a investigação e desenvolvimento de glicopéptidos terapêuticamente importantes e agentes terapêuticos oligossacáridos.

As enzimas sialiltransferases ST6GalNAcI modificadas são úteis para preparação *in vivo* e *in vitro* de péptidos glicosilados, bem como para a produção de oligossacáridos contendo os resíduos glicosilo específicos que podem ser transferidos pelas enzimas glicosiltransferases modificadas. As formas modificadas dos polipéptidos ST6GalNAcI podem ter actividades biológicas comparáveis a, e em alguns casos, para além dos seus homólogos polipeptídicos de comprimento total.

O termo "glicosilação", tal como aqui utilizado, refere-se à conjugação mediada enzimaticamente de uma espécie de açúcar modificado a um aminoácido ou resíduo glicosilo de um polipéptido, e.g., um péptido eritropoietina, pela sialiltransferase preparada pelo processo da presente invenção. Subgéneros de glicosilação são "glico-conjugação" e "glico-PEGuilação", em que o grupo modificador do açúcar modificado é poli(etileno glicol), um derivado alquilo (e.g., m-PEG) ou um seu derivado reactivo (e.g., H₂N-PEG, HOOC-PEG).

Uma "proteína terapêutica", tal como aqui uti-

lizado, refere-se a uma proteína, péptido, glicoproteína ou glicopéptido que é administrado a um indivíduo para tratar uma doença ou disfunção ou para melhorar a saúde do indivíduo. Numa forma de realização preferida, o indivíduo é um ser humano. Noutra forma de realização preferida, a proteína terapêutica é uma proteína humana. Numa forma de realização adicional, a proteína terapêutica é glicosilada ou de outra forma modificada por uma ou mais glicosiltransferases produzidas em células CHO.

O G-CSF (factor de estimulação de colónias de granulócitos) é um factor de crescimento hematopoiético que estimula a proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas e a activação de neutrófilos maduros. O G-CSF é capaz de suportar a proliferação de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. A forma humana de G-CSF foi clonada por grupos do Japão e dos EUA em 1986 (ver e.g. Nagata *et al.*, 1986, *Nature* 319: 415-418). A glicoproteína humana natural existe em duas formas, uma tendo 174 e a outra tendo 177 aminoácidos. A forma com 174 aminoácidos mais abundante e mais activa foi utilizada no desenvolvimento de produtos farmacêuticos por tecnologia de ADN recombinante.

Os exemplos seguintes referem-se à produção e purificação de um polipéptido ST6GalNAcI truncado de frango e são proporcionados meramente para ilustrar melhor o processo da invenção. O âmbito da invenção não deverá ser interpretado como consistindo meramente nos exemplos seguintes.

EXEMPLOS

1. Construção da cassette de expressão

Foi gerada uma cassette de expressão para expressão de um polipéptido ST6GalNAcI que consiste em glicosiltransferase de frango (α -N-acetil-neuraminil-2,3- β -galactosil-1,3-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferase I) N-terminalmente truncada no aminoácido K232 ao qual 8 aminoácidos de uma sequência interveniente foram ligados ao N-terminal. A sequência de aminoácidos completa utilizada para expressão (SEQ ID NO: 6) está ilustrada na Figura 3.

Para adicionar um sinal de iniciação da tradução e para aumentar a velocidade de expressão, o ácido nucleico que codifica o polipéptido ST6GalNAcI truncado foi introduzido numa cassette de expressão de eritropoietina (EPO) humana genómica para substituir as sequências de codificação da EPO. Globalmente a unidade de transcrição de ST6GalNAcI foi concebida para conter os seguintes elementos:

- Sequência de sinal de EPO (consistindo no exão 1 de eritropoietina humana [que codifica para 4 aminoácidos], intrão 1 e uma porção do exão 2 [que codifica para 27 aminoácidos: MGVHECPAWLWLLLSL LSL PLGLPVLG]);

- ST6GaINAcI e sequência de nucleotidos da sequência interveniente (SEQ ID NO: 5);

- 3'-UTR de eritropoietina humana de 285 pb;
- ligante de 45 pb com sítio 5'-Not I; o sítio 3'-MunI é uma parte integrante da sequência SV40.

Com base na sequência de aminoácidos como apresentada na Figura 3, a sequência de nucleótidos de ST6GalNAcI madura foi otimizada para a utilização de codões em CHO; os nucleotídeos derivados da sequência de EPO genómico não foram adaptados e correspondem à sequência da eritropoietina humana natural. A cassette de expressão resultante é EcST6 abreviada. A sequência de nucleotídeos de EcST6 foi confirmada por sequenciação (SEQ ID NO: 7). A congruência da sequência era de 100%.

2. Construção do vector de expressão

O fragmento de EcST6 sintético foi clonado como um fragmento de *NotI/MnuI* no vector de expressão pMOZ-G8.

Este vector baseia-se num esqueleto pSV2 que contém a unidade de expressão de β -lactamase que confere resistência a ampicilina e a origem de replicação de pBR322 como os elementos procarióticos e o marcador de selecção eucariótico di-hidrofolato redutase (DHFR) conduzido por um promotor génico precoce SV40 e o correspondente 3'-UTR de SV40. O marcador de selecção da DHFR de murganho original foi modificado por fusão parcial com um gene de DHFR de CHO para se obter um DHFR híbrido recombinante (DHFRec), que

mostra uma afinidade 10 vezes mais baixa para o agente selectivo metotrexato (MTX). As células transfectadas com o marcador de selecção de DHFR podem ser seleccionadas com quantidades maiores de MTX para bloquear a DHFR endógena que está presente na primeira linha celular CHOSI CHO DHFR progenitora, e para enriquecer em células geneticamente alteradas que albergam só DHFR derivado de plasmídeo. A expressão génica está sob o controlo de um promotor mCMV forte. A jusante do promotor mCMV está o sítio de clonagem múltipla (MCS) e um intrão β -globina de coelho, bem como um 3'-UTR que permite a expressão eficiente das transcrições de ADNc.

A inserção da cassette no vector pMOZ-G8 foi verificada por PCR.

Células de *E. coli* foram transformadas com o plasmídeo de expressão pM07-GBEcST6. O rastreio de colónias diferentes transformantes foi realizado e o ADN de plasmídeo foi preparado a partir de um clone seleccionado. Para confirmar a identidade de pM07-G8 EcST6, toda a sequência nucleotídica foi verificada por sequenciação de ADN.

3. Linha celular CHO

Para a expressão da forma secretada de ST6Gal-NaAcI de frango, utilizou-se uma linha celular de ovário de hamster chinês. A linha celular parental utilizada para a

produção de ST6GalNAcI é um derivado de uma CHOSI 4, uma linha celular de ovário de hamster chinês (CHO dhfr-) deficiente em actividade de di-hidrofolato redutase (dhfr) que foi adaptada para crescimento em meio isento de soro e proteína.

Resumo da linha celular hospedeira CHOSI 4:

- A linha celular hospedeira CHOSI 4 foi derivada de CHO dhfr (ATCC número CRL-9096; ACC126 de DSMZ, Braunschweig, Alemanha).

- A linha celular hospedeira CHOSI 4 foi adaptada para crescimento em meioquimicamente definido, isento de soro e proteína por cultivo a longo prazo em meio MAM-PF2.

- A morfologia do CHOSI 4 é redonda quanto à forma. A cultura cresce como uma suspensão de célula única.

- CHOSI 4 está adaptada para crescimento em meio MAM-PF quimicamente definido, isento de componentes animais, que não contém soro, proteínas, péptidos ou hidrolisados. No entanto, a linha celular pode ser cultivada noutros meios isentos de soro disponíveis comercialmente.

- CHOSI 4 é subcultivada por uma razão de divisão total de 1:50 por semana. As células são primeiro divididas 1:20 num novo balão e após 4 dias obtém-se 3/2 do volume inicial de meio fresco. CHOSI 4 mostra uma velocidade de

crescimento específico superior a um por dia ($D > 1 \times d^{-1}$) e densidades de células em sistemas de cultura agitados de 2×10^6 células/mL em modo descontínuo e 1×10^7 células/mL em modo de alimentação em descontínuo.

- A adição de factores de fixação ou de soro fetal de vitelo ao meio de cultura de células conduz a uma alteração da morfologia das células, e as células CHOSI 4 revertem para uma camada epitelial.

4. Cultura e colheita de células

Descongelamento das células e expansão do inóculo em frascos T e frascos de agitação

Um único frasco do MCB foi tirado da armazenagem na fase de vapor de azoto líquido e aquecido num banho de água a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As células foram recolhidas por centrifugação num frasco T contendo meio de cultura fresco, pré-aquecido. A expansão adicional do inóculo foi conseguida por diluição e passos de subcultivo em frascos de agitação com volumes crescentes de meio de cultura até um volume final que é adequado para utilização como semente no biorreactor.

Expansão de células no biorreactor de sementeira

Após a expansão das células em frascos de agitação o inóculo foi transferido para o biorreactor de

sementeira e o volume foi expandido com meio fresco até um volume final de trabalho de 10 L. As células foram cultivadas no biorreactor de sementeira durante 3 dias até ter sido atingido o número de células adequado para inoculação do biorreactor de produção.

Cultivo no biorreactor de produção

Após o crescimento no biorreactor de sementeira, o conteúdo do biorreactor de sementeira foi assepticamente transferido para o biorreactor de produção e a cultura transferida foi expandida para o volume de trabalho final com meio de cultura fresco. Depois de atingir uma densidade de células pré-definida de $\geq 1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL, a temperatura de incubação foi baixada de $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ para $32^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. O nível de glucose foi mantido dentro de uma gama definida por alimentação de uma solução de glucose numa concentração entre 4 g/L e 8 g/L. O processo de fermentação foi terminado 14-17 dias após o início do cultivo no biorreactor de produção.

Colheita e armazenagem

A suspensão de células do biorreactor de produção foi limpa de células e detritos por filtração de profundidade da colheita em sacos estéreis descartáveis após a terminação da fermentação. Utilizou-se um filtro de profundidade descartável para a filtração da colheita. A colheita foi armazenada a $2-8^\circ\text{C}$ até processamento a jusante adicional.

5. Purificação

➤ Purificação - Exemplo 1

O processo de purificação de ST6GalNAcI começou com um passo de cromatografia de captura utilizando uma coluna de permuta aniônica. Os passos de purificação subsequentes incluíram cromatografia de afinidade, cromatografia de modo misto, ultra-/diafiltração, cromatografia de permuta catiónica e uma nano-filtração final através de uma membrana Planova® de 15 nm. Os passos cromatográficos foram realizados utilizando sistemas de cromatografia de gradiente e decorreram automaticamente. Adsorção UV, condutividade, pH, caudal e contra-pressão foram registrados em cada passo cromatográfico por um software adequado. Os tipos de colunas e resinas utilizadas estão apresentados na Tabela 1:

Passo	Tipo de coluna	Tipo de resina	Dimensões do gel (DxA) [mm]
Cromatografia de permuta aniônica	Coluna BPG de vidro de borossilicato	Q-Sepharose Fast Flow	200 x 205
Cromatografia de afinidade	Coluna BPG de vidro de borossilicato	Blue Sepharose 6-Fast Flow	140 x 110
Cromatografia de modo misto	Coluna BPG de vidro de borossilicato	Hidroxiapatite Tipo I 40 µm	100 x 250
Cromatografia de permuta catiónica	Coluna BPG de vidro de borossilicato	SP-Sepharose de alto desempenho	100 x 150

1ª Coluna: Cromatografia de permuta aniónica (Q-Sepharose FF)

A cromatografia de permuta aniónica com resina Q-Sepharose Fast Flow foi utilizada como o primeiro passo cromatográfico para capturar ST6GalNAcI na colheita e para redução de volume. ST6GalNAcI foi eluída pela aplicação de um passo de sal de NaCl 800 mM em Tris HCl 20 mM, pH 7,6. O eluído foi recolhido com base no perfil de absorção no UV. As condições cromatográficas são sumariadas na Tabela 2:

Parâmetro	Condições
Resina	Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biociences/GE-Healthcare)
Diâmetro da coluna	200 mm
Altura do leito	205 ± 15 mm
Pratos teóricos	> 2200 N/m
Factor de assimetria	0,8-1,5
Tampão de equilíbrio	Tris 20 mM, pH 7,6
Tampão de eluição	NaCl 800 mM em Tris HCl 20 mM, pH 7,6
Critérios de mistura	Início: OD280 > 0,04 AU Paragem: 0,6 VC após início

2ª Coluna: Cromatografia de afinidade (Blue-Sepharose 6 FF)

Blue Sepharose 6FF é uma resina de agarose ligada covalentemente ao corante Azul de Cibacron® e foi utilizada para ligar preferencialmente ST6GalNAcI na presença de contaminantes contidos no eluído de Q-Sepharose. A ST6GalNAcI

foi eluída com cloridrato de L-arginina 500 mM em tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,5. O eluído foi recolhido com base no perfil de absorção no UV. As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 3:

Parâmetro	Condições
Resina	Blue Sepharose FF (Amersham Biociences/GE-Healthcare)
Diâmetro da coluna	140 mm
Altura do leito	110 ± 20 mm
Pratos teóricos	> 2778 N/m
Factor de assimetria	0,8-1,5
Tampão de equilibração	Tampão fosfato de potássio 25 mM pH 7,5, NaCl 50 mM
Tampão de eluição	Cloridrato de L-arginina 500 mM fosfato de potássio 25 mM pH 7,5
Critérios de mistura	Início: OD > 0,010 AU Paragem: OD < 0,05 AU

3ª Coluna: Cromatografia de modo misto (hidroxiapatite)

Utilizou-se cromatografia de modo misto numa resina de hidroxiapatite como um passo intermediário para reduzir ainda mais os níveis de HCP e ADN. A ST6GalNAcI foi eluída com NaCl 1,0 M em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 6,8. O eluído foi recolhido com base no perfil de absorção no UV.

As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 4:

Parâmetro	Condições
Resina	Hidroxiapatite CHT Tipo I 40 µm (Bio Rad)
Diâmetro da coluna	100 mm
Altura do leito	250 mm ± 20 mm
Pratos teóricos	> 4760 N/m
Factor de assimetria	0,8-2,3
Tampão de equilibração	Tampão fosfato de potássio 5 mM pH 6,8
Tampão de eluição	Tampão fosfato de potássio 5 mM pH 6,8, NaCl 1 M
Critérios de mistura	Início: OD > 0,050 AU Paragem: 1,34 VC

Ultrafiltração / Diafiltração

O eluído de hidroxiapatite foi diafiltrado utilizando um módulo de corte Sartocoon com um corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa. A filtração de fluxo tangencial foi realizada para dessalinizar e concentrar o produto e finalmente trocar o tampão para tampão fosfato de potássio 25 mM a pH 6,0.

4ª Coluna: Cromatografia de permuta catiónica (SP Sepharose)

Utilizou-se cromatografia de permuta catiónica como o passo final de polimento para remover qualquer HCP residual remanescente possível. Nas condições específicas aplicadas a ST6GalNAcI foi eluída com NaCl 250 mM em tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,8. As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 5:

Parâmetro	Condições
Resina	SP-Sepharose de alto desempenho
Diâmetro da coluna	100 mm
Altura do leito	150 ± 20 mm
Pratos teóricos	> 7353 N/m
Factor de assimetria	0,8-1,5
Tampão de equilibrção	Tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,0
Tampão de eluição	Cloreto de sódio 250 mM, fosfato de potássio 25 mM pH 6,0
Critérios de mistura	Início: OD > 0,050 AU Paragem: OD < 0,200 AU + 0,6 VC

Ultrafiltração/diafiltração e formulação

O eluído de SP-Sepharose foi diafiltrado num módulo de corte Sartoclon com um MWCO de 30 kDa. Foi realizada filtração de fluxo tangencial para dessalinizar e concentrar o produto e trocar o tampão para BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 100 mM, 5% de sorbitol. Depois de completada a diafiltração, adicionou-se Tween 80 numa concentração final de 0,003%.

➤ Purificação - Exemplo 2

1ª Coluna: Cromatografia de permuta aniónica (Q Sepharose FF)

Este passo do processo é utilizado para a captura de cST6 por cromatografia de permuta aniónica a partir da colheita do biorreactor filtrada estéril, clarificada. 1000

mL de sobrenadante do biorreactor foram diluídos 1:3 em tampão A (Tris 20 mM, pH 7,6) e carregados numa coluna omni 25/150 Q Sepharose FF. O cST6 foi eluído por um gradiente linear de NaCl (0-1 M, 20 VC).

2ª Coluna: Cromatografia de afinidade (matriz de afinidade CDP)

Este passo do processo de cromatografia de afinidade é um passo intermediário que é importante para aumentar a pureza do cST6. O conjunto das fracções 9-11 do passo de captura de Q Sepharose foi diluído 1:3 em tampão A (MES 10 mM pH 6,8, 25% de glicerol) e carregado numa coluna de afinidade XK 10/55 CDP. Para evitar a sobrecarga da coluna CDP a carga foi aplicada em dois ensaios de CDP idênticos. O cST6 foi eluído por um gradiente linear de NaCl (0-1 M, 10 VC).

3ª Coluna: Cromatografia de permuta aniónica (Mono Q Sepharose)

Esta cromatografia de permuta aniónica foi utilizada como o passo final de polimento. A combinação das fracções de cST6 do passo intermediário CDP foi diluída 1:10 em tampão A (Tris 20 mM, pH 7,6) e carregada numa coluna Mono Q HR 10/10. O cST6 foi eluído por um gradiente linear de NaCl (0-0,6 M, 5 VC).

➤ Purificação - Exemplo 3

1ª Coluna: Cromatografia permuta aniónica (Q Sepharose FF)

Utilizou-se cromatografia de permuta aniónica com resina Q-Sepharose Fast Flow como o primeiro passo cromatográfico para capturar ST6GalNAcI na colheita e para redução do volume. Purificou-se 300 mL de sobrenadante clarificado e filtrado estéril do biorreactor de cultura com alimentação em descontínuo. As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 6:

Coluna	Omnifit 25, altura do leito = 15 cm, VC = 73,6 mL
Tampão de equilíbrio A	Tris 20 mM, pH 7,6
Tampão de eluição B	Tris 20 mM, pH 7,6, NaCl 1 M
Factor de diluição para a carga	Diluição da amostra 1:3 em tampão de equilíbrio A
Gradiente	Passos: 4%(4C V), 20%(4 VC) e 100% (2 VC) de tampão de eluição B

2ª Coluna: Cromatografia de afinidade intermédia (Blue-Sepharose FF)

Este passo do processo de cromatografia de afinidade é um passo intermediário que é importante para aumentar a pureza do cST6. O eluído do passo de cromatografia de captura (29 mL) foi diluído e purificado por um passo de cromatografia em Blue Sepharose. As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 7:

Coluna	Omnifit 10, altura do leito = 7,0 cm, VC = 5,5 mL
Tampão de equilíbrio A	Fosfato de potássio 25 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM
Tampão de eluição B	Fosfato de potássio 25 mM, pH 7,5, Arginina-HCl 1 M
Factor de diluição para a carga	Diluição da amostra 1:3 em tampão de equilíbrio A
Gradiente	Passos: 10% de B, 75% de B, 100% de B (cada passo 5 VC)

3ª Coluna: cromatografia de afinidade de polimento (Prosep PB)

O meio ProSep-PB é composto por um ligando m-aminofenilo sintético imobilizado em pérolas de vidro de tamanho de poros controlado. Esta cromatografia de afinidade foi utilizada como o passo de polimento final. 15 mL de eluído intermediário foram purificados para este passo de cromatografia. As condições cromatográficas estão sumariadas na Tabela 8:

Coluna	Omnifit 10, altura do leito = 5,8 cm, VC = 4,55 mL
Tampão de equilíbrio A12	Fosfato de potássio 25 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M
Tampão de equilíbrio A11	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M
Tampão de eluição B	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M, Sorbitol 1,37 M
Factor de diluição para a carga	Diluição 1:5 em tampão de equilíbrio A12
Gradiente	Passos: 100% de B em 5 VC
Tampão de diluição	BisTris 50 mM, pH 6,5, 0,015% de Tween 80
Tampão de formulação	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,1 M, 5% de sorbitol, 0,003% de Tween 80

6. Pureza, actividade específica e rendimento de produção de ST6GalNAcI

➤ Exemplo 1

A pureza da ST6GalNAcI purificada de acordo com o exemplo 1 foi determinada por SDS-PAGE corada com Coomassie (ver Figura 3), RP-HPLC, ELISA e doseamento do limiar em três lotes. A actividade específica da ST6GalNAcI foi determinada por RP-HPLC.

A pureza e actividades específicas foram como indicado na Tabela 9:

Ensaio	Método	Lote #1	Lote #2	Lote #3
Identidade	SDS-PAGE	Banda principal a aproxim. 66 kDa.	Banda principal a aproxim. 66 kDa.	Banda principal a aproxim. 66 kDa.
Pureza	RP-HPLC	100,0%	100,0%	99,5%
Proteína residual das células hospedeiras CHO	ELISA	35 ng/mg (ppm)	35 ng/mg (ppm)	37 ng/mg (ppm)
ADN residual de células hospedeiras	Ensaio do limiar	≤ 784 pg/mg	≤ 833 pg/mg	≤ 755 pg/mg
Actividade específica	RP-HPLC	5,6 U/mg	7,8 U/mg	7,7 U/mg

O rendimento de produção da ST6GalNAcI purificada estava numa gama de 65 mg/L a 75 mg/L.

Foi feito um estudo de comparabilidade para comparar a expressão de ST6GalNAcI em células CHO com a expressão de ST6GalNAcI em células de insecto. A ST6GalNAcI derivada de células de insecto mostrou uma actividade específica de 2,5 U/mg e a ST6GaNAcI derivada de CHO mostrou uma maior actividade específica de 7,8 U/mg.

➤ Exemplo 2

As fracções de cST6 purificada de acordo com o exemplo 2 foram combinadas e analisadas quanto à pureza por meio de SDS-PAGE corada com Coomassie (ver Figura 4). As amostras reunidas de cST6 provenientes de três clones diferentes C1, C2 e C3 foram carregadas não diluídas, diluídas 1: 5 e diluídas 1:10.

A Tabela 10 mostra a preparação e carregamento da amostra:

Poço	<i>Amostra</i>	Volume de amostra [μL]	Tampão da amostra [μL]	Volume de carga [μL]	Condições
1	Combinação C1 após 3 ^a coluna (Mono Q)	10	10	20	ebulição/ reduzido
2	Combinação C2 após 3 ^a coluna (Mono Q)	10			
3	Combinação C3 após 3 ^a coluna (Mono Q)	10			
4	–	–	10	10	
5	Combinação C1 após 3 ^a coluna (Mono Q)	2+8H2O	10	20	
6	Combinação C2 após 3 ^a coluna (Mono Q)	2+8H2O			
7	Combinação C3 após 3 ^a coluna (Mono Q)	2+8H2O			
8	–		10	10	
9	Combinação C1 após 3 ^a coluna (Mono Q)	1+9H2O	10	20	
10	Combinação C2 após 3 ^a coluna (Mono Q)	1+9H2O			
11	Combinação C3 após 3 ^a coluna (Mono Q)	1+9H2O			
12	Marcador de baixo peso molecular			10	

Como ilustrado na Fig. 4, as combinações não diluídas mostram contaminações minoritárias abaixo de 20 kDa. O sinal das combinações diluídas 1:10 era mais forte do que o sinal das impurezas nas amostras não diluídas. Assim, a pureza pode ser estimada como sendo > 90%.

➤ Exemplo 3

A pureza da ST6GalNAcI purificada de acordo com o exemplo 3 foi determinada por SDS-PAGE corada com Coomassie, RP-HPLC, ELISA e análise do limiar em três lotes. A actividade específica da ST6GalNAcI foi determinada por RP-HPLC.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1:

Processo de fabrico de sialiltransferase: cultura e colheita de células

Figura 2:

Processo de fabrico de sialiltransferase: purificação

Figura 3:

Gel de proteína (SDS-PAGE) que foi corado com azul de Coomassie após os diferentes passos de purificação do exemplo 1. A banda a cerca de 66 kDa corresponde ao polipéptido ST6GalNAcI purificado de acordo com a SEQ ID NO: 6.

Figura 4:

Gel de proteína (SDS-PAGE) corado com azul de Coomassie de misturas de cST6 de três clones diferentes C1, C2 e C3 após a terceira coluna de purificação de acordo com o exemplo 2. A banda a cerca de 66 kDa corresponde ao polipéptido ST6GalNAcI purificado de acordo com a SEQ ID NO: 6.

Lisboa, 14 de Abril de 2015

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BioGeneriX AG
<120> Processo de produção e purificação de uma salivtransferase activa solúvel
<130> B 9298/RN
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1701
<212> DNA
<213> Gallus gallus
<400> 1

```

atgggggttt taatcagaag gcttcctaaa gattccagaa tattccggtg gctccttatt    60
ttaacagctct tttccttcat cattactagt tttagcgctt tgtttgcat ggagaaaagc    120
attttcaggc agctcaagat ttaccaaagc attgcacata tgctacaagt ggacacccaa    180
gacagcaag gttcaaaacta ttctgctaata gggagaattt caaagggttg tttggagaga    240
gacattgcat ggctcgaact gaatactgct gtgagtacac caagtgggga aggggaaggaa    300
gagcagaaga aaacagtga accagttgcc aagggtggaag aagccaagga gaaagtgact    360
gtgaaaccat tccctgaggt gatggggatc acaaatacaa cagcatcaac agcctctgtg    420
gtggagagaa caaaggagaa aacaacagcg agaccagttc caggggtggg ggaagctgat    480
gggaagagaa caacgtagc acttcccagc atgaaggaa acbaagagaa ggcgactgtg    540
aaaccatcct ttgggatgaa ggtagctcat gcaaacagca catccaaaga taaaccaaag    600
gcagaagagc ctctgcatc agtgaaagcc ataagacctg tgactcaggc tgccacagtg    660
acagagaaga agaaactgag ggctgctgac ttcaagactg agccacagtg ggattttgat    720
gatgagtaca tactggatag etcatctcca gtatcgacct gctctgaatc agtgagagcc    780
aaggctgcca agtctgactg gctgcgagat cttttcctgc cgaacatcac actcttcata    840
gacaagagtt acttcaatgt cagtgaagtg gaccgccttg agcattttgc acctccctat    900
ggcttcatgg agctgaatta ctactggta gaagaagtca tgtcacggct gcttccaaat    960
ccccaccagc agctgctcct ggccaacagt agcagcaacg tgtcaacgtg catcagctgt    1020
gctgttgttg ggaatggagg gatattgaat aactctggaa tgggccagga gattgactcc    1080
catgactatg tgttccgggt gagcggggct gtaatcaaag gttacgaaa ggaatgtggga    1140
acaaaaacct cttctacgg attcacagcg tactccctgg tgtcctctct ccagaacttg    1200
ggacacaaag ggttcaagaa gatcccacag ggaagcata tcagatacat tcacttctctg    1260
gaggcagtta gagactatga gtggctgaag gctcttctgt tggacaagga tatcaggaaa    1320
ggattcctga actactatgg gcgaaggccc cgggagagat tcgatgaaga tttcacaatg    1380
aataagtacc tggtagctca ccctgatttc ctgagatact tgaaaaacag gttcttaaaa    1440
tctaaaaatc tgcaaaagcc ctactggcgg ctgtacagac ccacaacagg agcctctctg    1500

ctgctgactg ccctgcatct ctgtgaccgg gtgagtgcct atggctacat cacagaaggt    1560
caccagaagt actcgatca ctactatgac aaggagtggg aacgcctggg cttctacgtt    1620
aaccatgact tcaacttggg gaagcaggtg tggaaaaggc ttcatgatga gaacatcatg    1680
aagctctacc agagatcctg a                                     1701

```

<210> 2
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

 <400> 2

Met Gly Phe Leu Ile Arg Arg Leu Pro Lys Asp Ser Arg Ile Phe Arg
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Ile Leu Thr Val Phe Ser Phe Ile Ile Thr Ser Phe Ser
 20 25 30
 Ala Leu Phe Gly Met Glu Lys Ser Ile Phe Arg Gln Leu Lys Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Ser Ile Ala His Met Leu Gln Val Asp Thr Gln Asp Gln Gln Gly
 50 55 60
 Ser Asn Tyr Ser Ala Asn Gly Arg Ile Ser Lys Val Gly Leu Glu Arg
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Trp Leu Glu Leu Asn Thr Ala Val Ser Thr Pro Ser Gly
 85 90 95
 Glu Gly Lys Glu Glu Gln Lys Lys Thr Val Lys Pro Val Ala Lys Val
 100 105 110
 Glu Glu Ala Lys Glu Lys Val Thr Val Lys Pro Phe Pro Glu Val Met
 115 120 125
 Gly Ile Thr Asn Thr Thr Ala Ser Thr Ala Ser Val Val Glu Arg Thr
 130 135 140
 Lys Glu Lys Thr Thr Ala Arg Pro Val Pro Gly Val Gly Glu Ala Asp
 145 150 155 160
 Gly Lys Arg Thr Thr Ile Ala Leu Pro Ser Met Lys Glu Asp Lys Glu
 165 170 175
 Lys Ala Thr Val Lys Pro Ser Phe Gly Met Lys Val Ala His Ala Asn
 180 185 190
 Ser Thr Ser Lys Asp Lys Pro Lys Ala Glu Glu Pro Pro Ala Ser Val
 195 200 205
 Lys Ala Ile Arg Pro Val Thr Gln Ala Ala Thr Val Thr Glu Lys Lys

```

210                215                220
Lys Leu Arg Ala Ala Asp Phe Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe Asp
225                230                235                240
Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser Ser Ser Pro Val Ser Thr Cys Ser Glu
245                250                255
Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu Phe
260                265                270
Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn Val Ser
275                280                285
Glu Trp Asp Arg Leu Glu His Phe Ala Pro Pro Tyr Gly Phe Met Glu
290                295                300
Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu Glu Val Met Ser Arg Leu Pro Pro Asn
305                310                315                320
Pro His Gln Gln Leu Leu Leu Ala Asn Ser Ser Ser Asn Val Ser Thr
325                330                335
Cys Ile Ser Cys Ala Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Asn Ser
340                345                350
Gly Met Gly Gln Glu Ile Asp Ser His Asp Tyr Val Phe Arg Val Ser
355                360                365
Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr Ser
370                375                380
Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn Leu
385                390                395                400
Gly His Lys Gly Phe Lys Lys Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg Tyr
405                410                415
Ile His Phe Leu Glu Ala Val Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala Leu
420                425                430
Leu Leu Asp Lys Asp Ile Arg Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Arg
435                440                445
Arg Pro Arg Glu Arg Phe Asp Glu Asp Phe Thr Met Asn Lys Tyr Leu
450                455                460
Val Ala His Pro Asp Phe Leu Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu Lys
465                470                475                480
Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr Thr
485                490                495

```

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val Ser
500 505 510

Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His Tyr
515 520 525

Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp Phe
530 535 540

Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Met
545 550 555 560

Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
565

<210> 3

<211> 1008

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 3

```

aaaaccgagc ctcaatggga ttttgatgat gagtacatcc tggattccag ctccccagct      60
agcacctggt ccgaaagcgt gagagccaag gctgccaaat ctgattggct gcgcgacctg      120
tttctgccta atatcaccct gttcatcgac aagtcttact tcaatgtgtc tgagtgggac      180
aggctggaac attttgctcc accttatgga ttcattggagc tcaactacag cctggtggag      240
gaggtgatga gcaggtctcc tcccaacccc caccagcagc tgctgctggc taattcttct      300
tctaactgta gcacatgcat ctctgtgca gtggtgggca atggggggat tctgaacaat      360
agcggtatgg gtcaggagat cgactctcat gattacgtgt tcagggtgtc tggcgctgtg      420
atcaaaggct atgagaagga cgtggggaca aaaacttctt tctacggctt cactgcctat      480
agcctcgtca gctccttgca aaacctcggg cataaggggt ttaagaaaat cccacagggg      540
aagcatatca ggtacattca ctccctcgag gcagtggagg actatgagtg gctgaaagcc      600
ctgctgttgg ataaggacat caggaaggga ttctgaact attacggctc caggcccagg      660
gagaggttcg acgaggactt caccatgaac aaatacctgg tcgctcaccg cgactttctg      720
aggtacctga agaatagggt cttgaaatct aaaaacctgc agaaacctta ttggaggctg      780
tacaggccta ccaccggggc tctgctctcg ctgactgtct tgcattctgt cgacagggtg      840
tctgcttacg gatacatcac cgagggccac caaaagtaca gcgaccatta ttatgacaaa      900
gaatggaagc ggctggtgtt ttacgtgaac cactgtttta atctggagaa gcaggtgtgg      960
aaaaggctcc acgacgagaa tatcatgaag ctgtatcaac ggagctga      1008

```

<210> 4

<211> 335

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 4

Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe Asp Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Ala Ser Thr Cys Ser Glu Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala
 20 25 30
 Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe
 35 40 45
 Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn Val Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His
 50 55 60
 Phe Ala Pro Pro Tyr Gly Phe Met Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu
 65 70 75 80
 Glu Val Met Ser Arg Leu Pro Pro Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu
 85 90 95
 Ala Asn Ser Ser Ser Asn Val Ser Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val
 100 105 110
 Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Asn Ser Gly Met Gly Gln Glu Ile Asp
 115 120 125
 Ser His Asp Tyr Val Phe Arg Val Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr
 130 135 140
 Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn Leu Gly His Lys Gly Phe Lys Lys
 165 170 175
 Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg Tyr Ile His Phe Leu Glu Ala Val
 180 185 190
 Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala Leu Leu Leu Asp Lys Asp Ile Arg
 195 200 205
 Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Arg Arg Pro Arg Glu Arg Phe Asp
 210 215 220
 Glu Asp Phe Thr Met Asn Lys Tyr Leu Val Ala His Pro Asp Phe Leu
 225 230 235 240
 Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu Lys Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro
 245 250 255
 Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr Thr Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr
 260 265 270

Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu
275 280 285

Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg
290 295 300

Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp
305 310 315 320

Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Met Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
325 330 335

<210> 5

<211> 1032

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> truncated chicken ST6GalNAcT with intervening sequence

<400> 5

```

tttgtgtcta ccttgaggga cccaaaaacc gagcctcaat gggattttga tgatgagtac      60
atcctggatt ccagctcccc agctagcacc tgttccgaaa gcgtgagagc caaggctgcc      120
aaatctgatt ggctgcgcga cctgtttctg cctaatatca cctgtttcat cgacaagtct      180
tacttcaatg tgtctgagtg ggacaggetg gaacattttg ctccacctta tggattcatg      240
gagctcaact acagccttgt ggaggaggtg atgagcaggc tccctcccaa cccccaccag      300
cagctgctgc tggctaattc ttcttctaac gtgagcacat gcctctcttg tgcagtggtg      360
ggcaatgggg ggattctgaa caatagcggg atgggtcagg agatcgactc tcatgattac      420
gtgttcaggg tgtctggcgc tgtgatcaaa ggctatgaga aggacgtggg gacaaaaact      480
tccttctacg gcttcaactg ctatagcctc gtcagctcct tgcaaaacct cgggcataag      540
gggtttaaga aaatccaca ggggaagcat atcaggtaca ttcacttcct cgaggcagtg      600
agggactatg agtggctgaa agccctgtct ttggataagg acatcaggaa gggattcctg      660
aactattacg gtgcaggcc caggagaggg ttgcagagg acttcacat gaacaaatac      720
ctggtcgttc accccgactt tctgaggtac ctgaagaata ggttcttgaa atctaaaaac      780
ctgcagaaac cctattggag gctgtacagg cctaccaccg gggctctgct cctgctgact      840
gctctgcac tgtgcgacag ggtatctgct tacggataca tcaccgaggg ccaccaaaag      900
tacagcgacc attattatga caaagaatgg aagcggctgg tgttttacgt gaaccacgat      960
tttaatctgg agaagcaggt gtggaaaagg ctccacgacg agaatatcat gaagctgtat     1020
caacggagct ga                                           1032

```

<210> 6

<211> 343

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> truncated chicken ST6GalNAcT with intervening sequence

<400> 8

```

Phe Val Ser Thr Leu Glu Asp Pro Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe
 1           5           10           15
Asp Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser Ser Ser Pro Ala Ser Thr Cys Ser
          20           25           30
Glu Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu
          35           40           45
Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn Val
 50           55           60
Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His Phe Ala Pro Pro Tyr Gly Phe Met
 65           70           75           80
Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu Glu Val Met Ser Arg Leu Pro Pro
          85           90           95
Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu Ala Asn Ser Ser Ser Asn Val Ser
          100          105          110
Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Asn
 115          120          125
Ser Gly Met Gly Gln Glu Ile Asp Ser His Asp Tyr Val Phe Arg Val
 130          135          140
Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr
 145          150          155          160
Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn
          165          170          175
Leu Gly His Lys Gly Phe Lys Lys Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg
          180          185          190
Tyr Ile His Phe Leu Glu Ala Val Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala
          195          200          205
Leu Leu Leu Asp Lys Asp Ile Arg Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly
 210          215          220
Arg Arg Pro Arg Glu Arg Phe Asp Glu Asp Phe Thr Met Asn Lys Tyr
 225          230          235          240
Leu Val Ala His Pro Asp Phe Leu Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu
          245          250          255
Lys Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr
          260          265          270

```


Thr Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val
 275 280 285
 Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His
 290 295 300
 Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp
 305 310 315 320
 Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile
 325 330 335
 Met Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
 340

<210> 7

<211> 2235

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression cassette EcoST8

<400> 7

```

gcggccgctc tagaactagt ggatccccgg ggctgcagga attcgatcgc gcccaggtc      60
gctgaggggac cccggccagg cgcggagatg ggggtgcacg gtgagtactc gcgggctggg      120
cgctcccgcc cgccgggtc cctgtttgag cggggattta gcgccccggc tattggccag      180
gaggtggctg ggttcaagga ccggcgactt gtcaaggacc ccggaagggg gaggggggtg      240
gggcagcctc cactgtccag cggggacttg ggggagtcct tggggatggc aaaaacctga      300
cctgtgaagg ggacacagtt tgggggttga ggggaagaag gtttgggggt tctgctgtgc      360
cagtggagag gaagctgata agctgataac ctgggcgctg gagccaccac ttatctgccca      420
gaggggaagc ctctgtcaca ccaggattga agtttggtcg gagaagtggg tctgtgtagc      480
tgggggtggg gtgtgcacac ggcagcagga ttgaatgaag gccagggagg cagcacctga      540
gtgcttgcat ggttggggac aggaaggacg agctggggca gagacgtggg gatgaaggaa      600
gctgtccttc cacagccacc cttctccctc cccgcctgac tctcagctg gctatctgtt      660
ctagaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtegetccc tctgggcctc      720
ccagtcctgg gctttgtgtc taccctggag gacccaaaaa ccgagcctca atgggatttt      780
gatgatgagt acatcctgga ttccagctcc ccagctagca cctgttccga aagcgtgaga      840
gccaaggctg ccaaattcga ttgctgcgc gacctgttcc tgccataat caacctgttc      900
atcgacaagt cttacttcaa tgtgtctgag tgggacaggc tggaacattt tgtccacct      960
tatggattca tggagctcaa ctacagcctg gtggaggagg tgatgagcag gctccctccc      1020
aaccgccacc agcagctgct gctggctaatt tcttcttcta acgtgagcac atgcatctcc      1080
tgtgcagtgg tgggcaatgg ggggattctg aacaatagcg gtatgggtca ggagatcgac      1140

```

tctcatgatt acgtgttcag ggtgtctggc gctgtgātca aaggctatga gaaggacgtg	1200
gggacaaaaa ctcccttcta cggcttcact gccatagcc tcgtcagctc cttgcaaac	1260
ctcgggcata aggggtttaa gaaaatcca caggggaagc atatcaggta cattcacttc	1320
ctcgaggcag tgagggaacta tgagtggctg aaagccctgc tgttggataa ggacatcagg	1380
aagggaattcc tgaactatta cggtcgcagg cccagggaga ggttcgacga ggacttcacc	1440
atgaacaaat acctggctgc tcaccccgac tttctgaggt acctgaagaa taggttcttg	1500
aaatctaaaa acctgcagaa acctatttg aggctgtaca ggccaccac cggggctctg	1560
ctcctgtga ctgctctgca tctgtgcgac agggatatctg ctacggata catcaccgag	1620
ggccacaaaa agtacagcga ccattattat gacaaagaat ggaagcggct ggtgttttac	1680
gtgaaccacg attttaattt ggagaagcag gtgtggaaaa ggctccacga cgagaatata	1740
atgaagctgt atcaacggag ctgaccaggt gtgtccacct gggcatatcc accacctccc	1800
tcaccaacat tgcttgtgcc acacctccc ccgccactcc tgaacccgt cgaggggctc	1860
tcagctcagc gccagcctgt cccatggaca ctccagtgc agcaatgaca tctcaggggc	1920
cagaggaaact gtccagagag caactctgag atctttttcc ctctgcaaaa aattatgggg	1980
acatcatgaa gccccctgag catctgactt ctggctaata aaggaaattt attttcattg	2040
caatagtgtg ttggaatttt ttgtgtctct cactcggaag gacatagatc cagacatgat	2100
aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa atgctttat	2160
ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt	2220
taacaacaac aattg	2235

Lisboa, 14 de Abril de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de um polipéptido sialiltransferase, que compreende os passos de:

a) expressar um polipéptido sialiltransferase em células CHO; colher o meio de cultura de células contendo o polipéptido sialiltransferase expresso; e

b) purificar o polipéptido sialiltransferase a partir do meio de cultura de células submetendo o meio de cultura de células a (i) dois passos de cromatografia de afinidade ou um passo de cromatografia de afinidade e um passo de cromatografia de modo misto, (ii) um passo de cromatografia de permuta aniónica e (iii) um passo de cromatografia de permuta catiónica,

em que a sialiltransferase é ST6GalNAcI.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a ST6GalNAcI é seleccionada do grupo que consiste em: ST6GalNAcI de ser humano, chimpanzé, orangotango, porco, vaca, cão, rato, rato, murganho e frango.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que a ST6GalNAcI é uma ST6GalNAcI de frango.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que o polipéptido ST6GalNAcI compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO: 4 ou a SEQ ID NO: 6.

5. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o polipéptido sialiltransferase só compreende o domínio activo de sialiltransferase.

6. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, em que uma cassette de expressão codificadora de uma sequência de sinal de EPO e uma sequência de polipéptido sialiltransferase é utilizada para expressar o polipéptido sialiltransferase em células CHO.

7. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, em que o passo a) é realizado por aplicação de uma mudança de temperatura de incubação de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ depois de ter atingido uma densidade de células pré-definida.

8. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, em que o passo b) é realizado pela ordem seguinte:

- i. uma cromatografia de permuta aniónica;
- ii. uma primeira cromatografia de afinidade;
- iii. uma segunda cromatografia de afinidade ou cromatografia de modo misto;
- iv. uma cromatografia de permuta catiónica.

9. Processo de acordo com qualquer das reivin-

dicações 1 a 8, em que a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando uma resina que tem um amónio quaternário como um grupo funcional.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, em que a cromatografia de permuta aniónica é realizada utilizando um tampão de NaCl/Tris-HCl como eluente a um pH na gama entre 7,0 e 8,0.

11. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, em que a primeira cromatografia de afinidade é realizada utilizando uma cromatografia de afinidade com corante.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, em que a primeira cromatografia de afinidade é realizada utilizando uma resina Blue Sepharose Fast Flow.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que a cromatografia de afinidade em Blue Sepharose é realizada utilizando um tampão de cloridrato de L-arginina/fosfato de potássio como eluente a um pH na gama entre 7,0 e 8,0.

14. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13, em que a cromatografia de modo misto é realizada utilizando uma resina de hidroxiapatite.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que a cromatografia de afinidade em hidroxiapatite é realizada utilizando um tampão de NaCl/fosfato de potássio como eluente a um pH na gama entre 6,3 e 7,3.

16. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 15, em que a cromatografia de permuta catiónica é realizada com uma resina que contém material de permuta catiónica sulfopropilo.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que a cromatografia de permuta catiónica é realizada utilizando uma resina SP-Sepharose High Performance.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, em que a cromatografia de permuta catiónica é realizada utilizando um tampão de NaCl/fosfato de potássio como eluente a um pH na gama entre 6,0 e 7,0.

19. Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18, em que o passo b) é realizado pela ordem seguinte:

- i. uma cromatografia de permuta aniónica utilizando uma resina Q-Sepharose Fast Flow;
- ii. uma primeira cromatografia de afinidade utilizando uma resina Blue Sepharose Fast Flow;

- iii. uma cromatografia de modo misto utilizando uma resina de hidroxiapatite;
- iv. uma cromatografia de permuta catiónica utilizando uma resina SP-Sepharose High Performance.

Lisboa, 14 de Abril de 2015

Figura 1

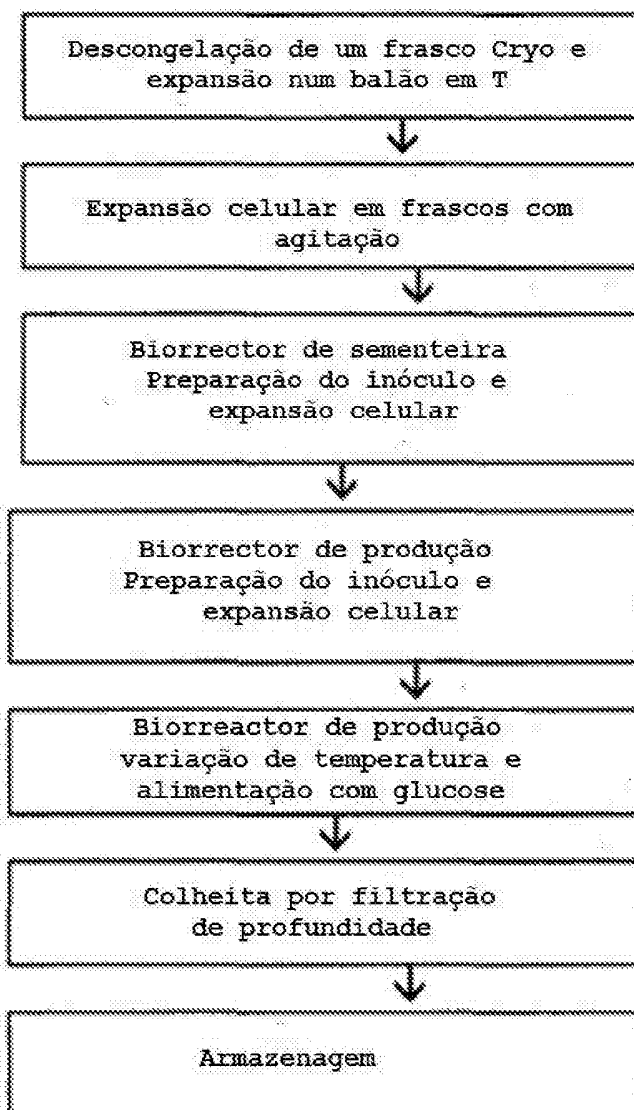


Figura 2

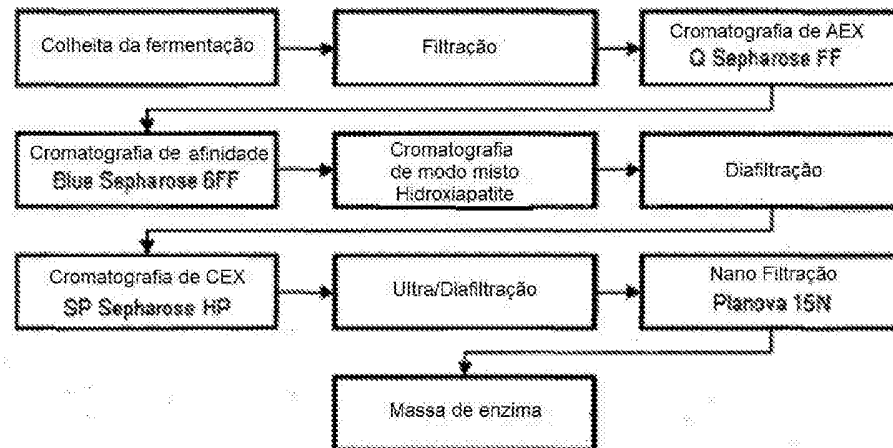


Figura 3

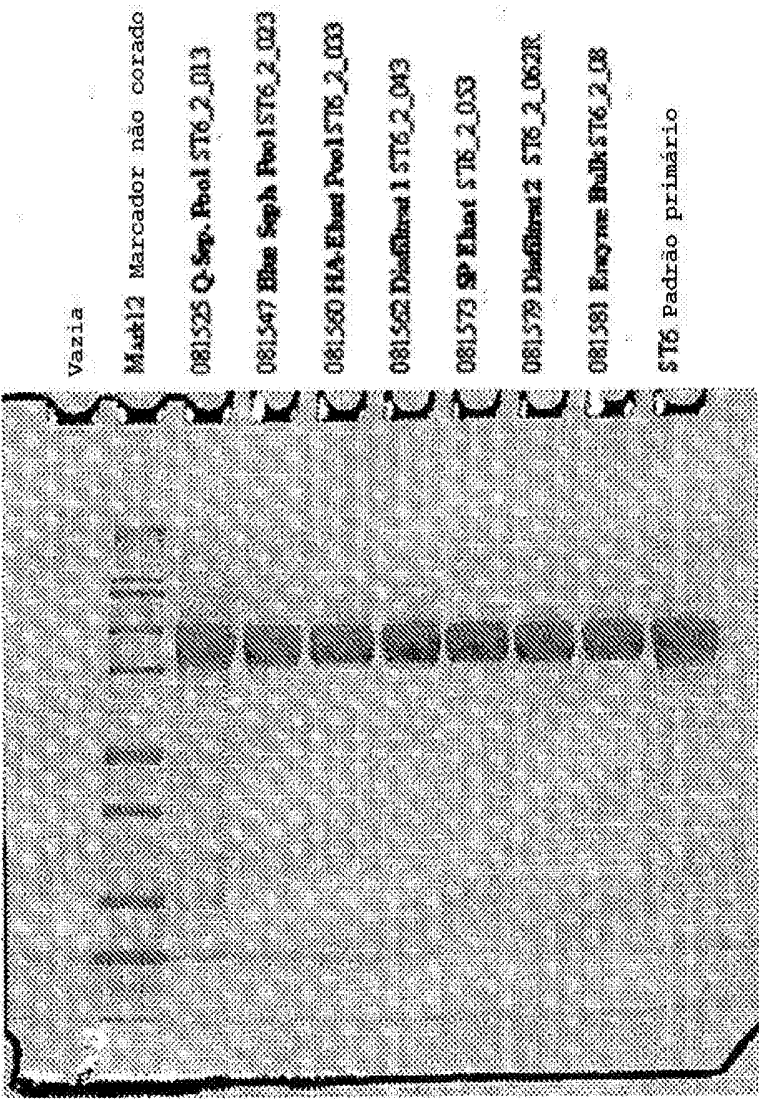
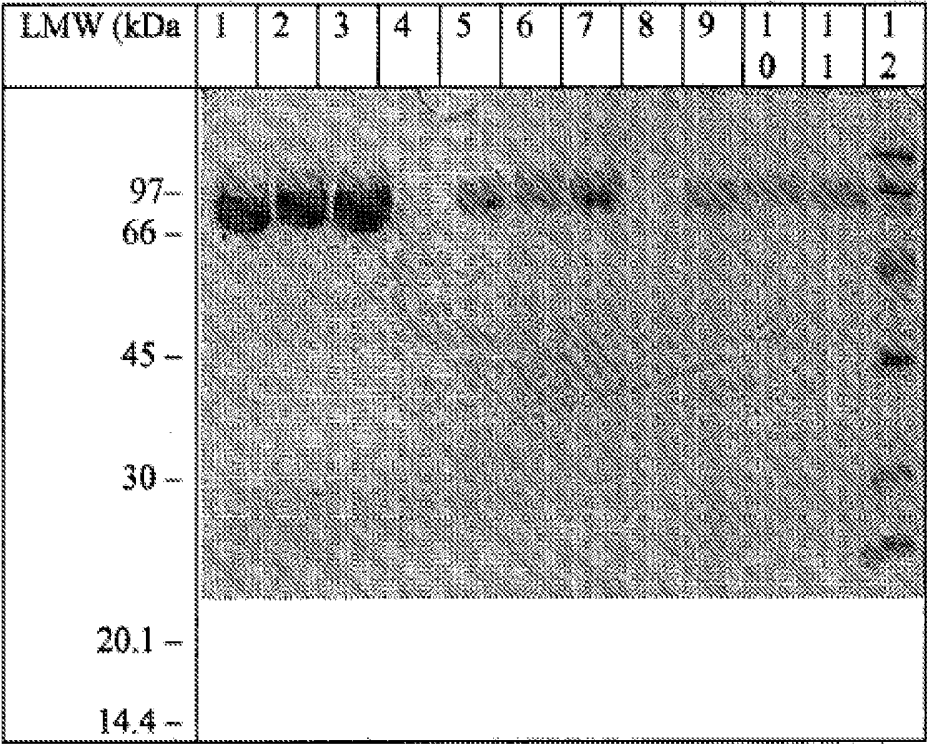


Figura 4



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2003031464 A2
- US 6280989 B
- EP 0737745 A1
- US 5032519 A
- WO 2007056524 A2
- US 20060234345 A1
- US 20060246544 A1
- US 20080207487 A1
- WO 2005121332 A2
- WO 2005121332 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- PAULSON et al. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 17615-17618
- TSUJI S et al. *Glycobiology*, 1996, vol. 6, 5-7
- TSUJI S. *J. Biochem.*, 1996, vol. 120, 1-13
- WEINSTEIN J et al. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 13835-13844
- NARAK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 7952-7956
- NAKAYAMA J et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 3684-3691
- NAKAYAMA J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 92, 7031-7035
- STICHER et al. *Glycoconjugate Journal*, 1991, vol. 8 (1), 45-54
- KUROSAWA et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 1402-1409
- SKRETAS et al. *Microbial Cell Factories*, 2009, vol. 8, 50
- BRONDYK W.H. *Methods in Enzymology*, 2009, vol. 463
- BOYCE FM ; BUCHNER NL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 2348-2352
- LUNDSTROM et al. *Cytotechnology*, 2001, vol. 35, 213-221
- SPATOLA, A. F. *Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins*. Marcel Dekker, 1983, 267
- SKRETAS et al. *Microbial cell factories*, 2009, vol. 8, 50
- SHEPARD. *J. of Chromatography*, 2000, vol. 891, 93-98
- VOIA et al. *BioTechniques*, 1993, vol. 14, 650-655
- GIOVANNINI. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, vol. 73, 522-529
- SPIEGEL et al. *J. Chromatogr.*, 1992, vol. 573 (1), 23-7
- GROSS et al. *Anal. Biochem.*, 1990, vol. 186 (1), 127-34
- NAGATA et al. *Nature*, 1986, vol. 319, 415-418