



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 312 219**

⑤① Int. Cl.:
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **99958811 .4**
⑨⑥ Fecha de presentación : **08.11.1999**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1127063**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

⑤④ Título: **Métodos para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular.**

③⑩ Prioridad: **06.11.1998 AR P980105610**
23.02.1999 AR P990100680

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

⑦③ Titular/es:
Sterrenbeld Biotechnology North America, Inc.
1209 Orange Street
Wilmington, Delaware 19801, US

⑦② Inventor/es: **Carcagno, Carlos Miguel;**
Criscuolo, Marcelo;
Melo, Carlos y
Vidal, Juan Alejandro

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 219 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular.

5 **Campo de la invención**

Métodos para obtener eritropoyetina (EPO) humana recombinante caracterizados por una secuencia de etapas de separación en tándem que incluye cromatografías líquidas de precipitación diferencial, interacción hidrófoba, intercambio aniónico, intercambio catiónico y de exclusión molecular.

10 **Información de los antecedentes**

La EPO es una glicoproteína que estimula la diferenciación de eritroblastos en la médula ósea, incrementando así el número de eritrocitos sanguíneos en circulación. La vida media de los eritrocitos en seres humanos es de 120 días y, por lo tanto, un ser humano pierde 1/120 eritrocitos cada día. Esta pérdida debe restaurarse continuamente para mantener un nivel estable de glóbulos rojos.

La existencia de la EPO se postuló en primer lugar alrededor del cambio de siglo y fue probada definitivamente por Reissman y Erslev en los primeros 50. Véanse Carnot y otros, *C.R. Acad. Sci.* (Francia), 143, 384-6 (1906); Carnot y otros, *C.R. Acad. Sci.* (Francia), 143, 432-5 (1906); Carnot y otros, *C.R. Soc. Biol.*, 111, 344-6 (1906); Carnot y otros, *C.R. Soc. Biol.*, 111, 463-5 (1906); Reissman, *Blood*, 1950, 5, 372-80 (1950) y Erslev, *Blood*, 8, 349-57 (1953). Los experimentos de Reissman y Erslev fueron confirmados con prontitud por otros investigadores. Véanse Hodgson y otros, *Blood*, 9, 299-309 (1954); Gordon y otros, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 255-8 (1954) y Borsook y otros, *Blood*, 9, 734-42 (1954).

La identificación del sitio de producción de EPO en el organismo fue un asunto de debate. Experimentos sucesivos condujeron a identificar al riñón como el órgano principal y a las células intersticiales peritubulares como el sitio de síntesis. Véanse Jacobson y otros, *Nature*, 179, 633-4 (1957); Kuratowska y otros, *Blood*, 18, 527-34 (1961); Fisher, *Acta Haematol.*, 26, 224-32 (1961); Fisher y otros, *Nature*, 205, 611-2 (1965); Frenkel y otros, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 149, 1, 292-3 (1968); Busuttill y otros, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1, 327-30 (1971); Busuttill, *Acta Haematol.* (Suiza), 47, 4, 238-42 (1972); Erslev, *Blood*, 44, 1, 77-85 (1974); Kazal, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 5, 2, 98-109 (1975); Sherwood y otros, *Endocrinology*, 99, 2, 504-10 (1976); Fisher, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28, 101-22 (1988); Jelkmann y otros., *Exp. Hematol.*, 11, 7, 581-8 (1983); Kurtz y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 13, 4008-11 (1983); Caro y otros, *J. Lab. Clin. Med.*, 103, 6, 922-31 (1984); Caro y otros, *Exp. Hematol.*, 12, 357 (1984); Schuster y otros, *Blood*, 70, 1, 316-8 (1986); Bondurant y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Bondurant y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 7, 2731-3 (1986); Schuster y otros, *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Koury y otros, *Blood*, 71, 2, 524-7 (1988); Lacombe y otros, *J. Clin. Invest.*, 81, 2, 620-3 (1988); Koury y otros, *Blood*, 74, 2, 645-S1 (1989).

Una proporción menor, que varía de 10% a 15%, de EPO total, es producida por el hígado en adultos. Véase Naughton y otros, *J. Surg. Oncol.*, 12, 3, 227-42 (1979); Liu y otros, *J. Surg. Oncol.*, 15, 2, 121-32 (1980); Dornfest y otros, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 11, 1, 37-46 (1981); Dinkelaar y otros, *Exp. Hematol.*, 9, 7, 796-803 (1981); Caro y otros, *Am. J. Physiol.*, 244, 5 (1983); Dornfest y otros, *J. Lab. Clin. Med.*, 102, 2, 274-85 (1983); Naughton y otros, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 13, 5, 432-8 (1983); Jacobs y otros, *Nature*, 313, 6005, 806-10 (1985); Erslev y otros, *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.*, 3, 3-4, 159-64 (1986). La EPO producida es directamente proporcional a la extensión de la hipoxia tisular y su expresión asciende al incrementar el número de las células productoras de EPO.

La EPO ha mostrado una gran eficacia en el tratamiento de la anemia, especialmente anemia derivada de fallo renal. Véanse Eschbach y otros, *N. England J. of Med.*, 316, 2, 73-78 (1987); Krane, *Henry Ford Hosp. Med. J.*, 31, 3, 177-181 (1983). Sin embargo, su utilidad terapéutica se ha limitado debido a la falta de disponibilidad de un método de producción masiva. La cantidad y la calidad de la EPO obtenida mediante los sistemas extractivos conocidos eran insuficientes. Recientemente, el uso de la tecnología del DNA recombinante ha hecho posible obtener grandes cantidades de proteínas. La aplicación de estas técnicas a células eucarióticas ha permitido una producción a gran escala de EPO. Véanse las patentes US 5.688.679 (de Powell), US 5.547.933 (de Lin), US 5.756.349 (de Lin), US 4.703.008 (de Lin) y US 4.677.195 (de Hewick y otros).

Están disponibles actualmente varias técnicas para la separación de glicoproteínas tales como EPO. Ultrafiltración, electroenfoque en columna, electroenfoque de lecho plano, filtración en gel, electroforesis e isotacoforesis y algunos otros métodos cromatográficos se han utilizado para la purificación de glicoproteínas. Las técnicas cromatográficas más ampliamente usadas han sido la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de adsorción.

El método de intercambio iónico es una técnica de separación por la que los componentes sólidos de una solución se distinguen de acuerdo con sus diferentes cargas netas y se aíslan mediante elución, bien en fases o bien a través de la aplicación de un gradiente continuo, con eluyentes de diferente fuerza iónica o pH. Este método emplea una matriz de gel o resina, de carga bien positiva o bien negativa, para inducir la unión o la adsorción electrostática de componentes con cargas opuestas. Durante la desorción o elución, componentes de la muestra son intercambiados por iones presentes en la solución o el tampón usados para eluir, o por un cambio en el pH que altera la carga neta de la molécula de interés.

ES 2 312 219 T3

La cromatografía de adsorción en fase inversa implica separar los componentes de la muestra de acuerdo con sus diferentes polaridades. Los componentes de la muestra son adsorbidos a través de una resina compuesta por una matriz de sílice cubierta con un polímero orgánico mediante unión no covalente. La desorción selectiva de los componentes se produce posteriormente mediante la elución con un disolvente no polar que contiene el eluyente.

Las técnicas de separación descritas anteriormente se utilizaron inicialmente para separar moléculas hidrófobas o hidrófilas relativamente pequeñas. Su aplicación a la purificación de moléculas más grandes, tales como proteínas y especialmente proteínas complejas tales como lipoproteínas, nucleoproteínas y glicoproteínas, es más reciente. Numerosas publicaciones ilustran el estado de la técnica alcanzado hasta ahora en la separación de proteínas.

Véanse Soferet y otros, "Handbook of Process Chromatography" (Academic Press Inc., San Diego, California, 1997); Olson, Ed. "Separation Technology" (Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, Illinois, 1995); Franks, Ed., "Protein Biotechnology" (Human Press, Totowa, Nueva Jersey, 1993); Deutscher, Ed., "Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology", Vol. 182, (Academic Press Inc., San Diego, California, 1991); Seetharam y otros, Eds., "Purification and Analysis of Recombinant Proteins" (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1991); Harria y otros, Eds., "Protein Purification Applications" (Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1990); Brown y otros, *Analytical Biochemistry*, 99, 1-21, 1979; Harrison y otros, "VDYAC TM Comprehensive Guide to Reverse Phase Materials for HPLC", pp. 1-12 (The Sep/A/Ra/Tions Groups, Hesperia, California, 1984). El uso de anticuerpos monoclonales producidos contra la proteína de interés es otro método conocido de recuperación de proteínas.

Se han presentado recientemente varios métodos específicos para la separación de EPO recombinante. Uno de estos métodos consiste en la purificación de proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico con eliminación selectiva de proteasas, seguido por cromatografía en fase inversa y filtración. Véase la patente de EE.UU. 4.667.016 (de Lai y otros). Esta técnica reivindica un rendimiento de 16% de EPO de actividad específica y pureza desconocidas.

Otro método propuesto para la separación de EPO recombinante consiste en la aplicación de cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RP-HPLC) a una solución que contiene proteína parcialmente purificada. Véase la patente de EE.UU. 4.667.195 (de Hewick y otros). Se ha encontrado que este método es irreproducible en la práctica. Por otra parte, los disolventes no polares comúnmente empleados o recomendados para la separación de proteínas y polipéptidos por medio de RP-HPLC incluyen reactivos tales como acetonitrilo, difíciles de retirar de la proteína de interés y potencialmente tóxicos para seres humanos. Véase Parsons y otros, *Endocrinology*, 114, 6, 2223-7 (1984). Sin embargo, debe apreciarse que también se han usado soluciones acuosas de etanol y ácido fórmico para la elución de proteínas. Véase Takagaki y otros, *Journal of Biological Chemistry*, 5, 4, 1536-41 (1980).

Un método de purificación de proteínas adecuado debe dar EPO por encima de 99% de pureza y libre de contaminantes tales como: material agregado, b) material degradado, c) proteína espurias y d) proteasas. Una pureza de proteína por debajo de 99% o la presencia de cualquiera de los contaminantes mencionados anteriormente podrían ser tóxicas para los seres humanos.

Por otra parte, muchos de los métodos propuestos para la purificación de EPO no son eficaces cuando se aplican a la producción de proteína a escala industrial. El método de RP-HPLC emplea disolventes orgánicos costosos, lo que incrementa los costes de purificación. Además, los disolventes orgánicos son más difíciles de manejar y son contaminantes para el medio ambiente. Otros métodos de purificación propuestos son irreproducibles en la práctica o tienen un rendimiento bajo.

J. Chromatography; 1997. Vol. 791, páginas 109-118, describe la separación cromatográfica de isoformas de eritropoyetina humana recombinante.

Se Pu; (1998) Mayo, 16(3): 263-4, describe la purificación de eritropoyetina recombinante mediante HPLC en fase inversa.

El documento WO 86/07594 describe técnicas de purificación de proteínas, ilustradas mediante el aislamiento de EPO de fluidos de cultivo mediante cromatografía en fase inversa.

La presente invención proporciona un método para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular que comprende las siguientes etapas en orden:

- (a) precipitación salina diferencial;
- (b) cromatografía de interacción hidrófoba;
- (c) concentración y diafiltración;
- (d) cromatografía de intercambio aniónico;
- (e) cromatografía de intercambio catiónico;
- (f) concentración y diafiltración; y

(g) cromatografía de exclusión molecular.

La presente invención también proporciona un método para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular, que comprende las siguientes etapas en orden:

(a) precipitación salina diferencial;

(b) concentración y diafiltración;

(c) cromatografía de intercambio aniónico;

(d) cromatografía de intercambio catiónico;

(e) cromatografía de interacción hidrófoba;

(f) concentración y diafiltración; y

(g) cromatografía de exclusión molecular.

El nuevo método de la presente invención describe así, con detalle, un sistema para la purificación de EPO con el que se alcanza una alta recuperación de un producto de alta pureza y calidad. Este producto puede usarse sin purificación adicional para formular compuestos farmacéuticos como productos inyectables para uso en medicina humana.

Una ventaja de la invención reivindicada es la obtención de EPO libre de proteasa sin variantes moleculares no deseables tales como agregados, material degradado o moléculas de valores inesperados del punto isoeléctrico. La EPO obtenida mediante el procedimiento reivindicado tiene una pureza de más de 99% y podría utilizarse para preparar formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos sin ninguna etapa de purificación adicional. La EPO obtenida mediante el procedimiento reivindicado es una proteína microheterogénea que comprende de cinco a ocho isoformas con puntos isoeléctricos que varían entre 3,0 y 4,5 y una actividad biológica específica *in vivo* por encima de 100.000 UI/mg de proteína, medida mediante un ensayo de incorporación de ⁵⁹Fe en ratones policitémicos exhipóxicos y un ensayo espectrofotométrico de masas total de EPO a 280 nm.

Una ventaja adicional de la invención reivindicada es su bajo impacto medioambiental. El método reivindicado es un procedimiento simple que no emplea etapas de separación basadas en la tecnología de RP-HPLC, evitando así el uso de disolventes orgánicos que pueden ser nocivos para el medio ambiente.

Otra ventaja más de la invención reivindicada es la falta de exposición de la EPO a condiciones de temperatura rigurosas, disolventes orgánicos nocivos u otras soluciones que puedan afectar a su actividad biológica o dar como resultado un compuesto tóxico inadecuado para el uso en seres humanos.

La descripción detallada y los ejemplos siguientes ilustran las etapas de separación realizadas en el método reivindicado.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de una muestra de EPO obtenida siguiendo el método descrito después de la purificación. En los carriles 1, 4 y 7, se cargaron marcadores del peso molecular. En los carriles 2, 3, 5 y 6 se hicieron pasar diferentes cantidades de EPO pura obtenida de acuerdo con el procedimiento reivindicado. La pureza del producto obtenido y el peso molecular aparente, que superaba 34 kDa, están de acuerdo con los presentados para EPO humana como podría observarse claramente.

La Figura 2 ilustra un análisis de transferencia Western de una muestra de EPO obtenida de acuerdo con el método descrito. Se determina la identidad de la EPO producida, ya que es reconocida por un anticuerpo monoclonal contra EPO humana. En los carriles 1 y 2, se cargaron un patrón de EPO humana y marcadores del peso molecular, respectivamente. Las muestras de EPO obtenidas de acuerdo con el método reivindicado se cargaron en los carriles 1 a 5.

La Figura 3 muestra un análisis de SDS-PAGE de una muestra de EPO pura obtenida de acuerdo con el método descrito, tratada con glucanasas. Se cargaron marcadores del peso molecular en los carriles 1, 4 y 8. Los carriles 2 y 7 corresponden a EPO no tratada. En el carril 3, se cargó EPO tratada con O-glucanasa; se verifica la presencia de un sitio de O-glicosilación. En el carril 5, se cargó EPO parcialmente digerida con N-glucanasa. Puede verificarse la presencia de 3 moléculas N-glicosiladas con pesos moleculares como los esperados para la EPO. El carril 6 se cargó con EPO digerida con N-glucanasa, y se obtuvo el peso molecular esperado para la proteína totalmente desglucosilada.

La Figura 4 ilustra un examen de los puntos isoeléctricos en muestras de EPO pura producidas de acuerdo con el método descrito. Muestras de EPO se hicieron pasar en los carriles 2, 3 y 4, marcadores del punto isoeléctrico en los carriles 1 y 5. Se verifica la presencia de isoformas correspondientes a EPO, mostrando un intervalo del punto isoeléctrico de 3,0 a 4,5.

La Figura 5 muestra la pureza de una muestra de EPO producida de acuerdo con el método descrito en la presente memoria usando una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

La Figura 6 ilustra la pureza de una muestra de EPO producida de acuerdo con el método descrito en la presente memoria usando una cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular.

Descripción detallada de la invención

Las células recombinantes que producen EPO pueden comprender un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de EPO que consiste en la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC: 1, un promotor viral y un terminador viral. Las células pueden contener vectores que confieren resistencia tanto a metotrexato como a antibióticos derivados de neomicina. La molécula de ácido nucleico de EPO puede comprender la molécula de ácido nucleico descrita en Lin, "DNA Sequences Encoding Erythropoietin", Patente de EE.UU. N° 4.703.008. El promotor viral puede ser un promotor temprano de SV40.

Un método para obtener EPO a partir de células recombinantes es cultivar en medios que comprenden insulina. Específicamente, tal cultivo comprende separar el sobrenadante que comprende EPO e insulina de las células huésped de la invención, concentrar el sobrenadante y congelar el producto concentrado. El medio de cultivo puede comprender entre 0,5 mg y 20 mg de insulina por litro de medio de cultivo.

La invención se refiere así a un método para purificar EPO recombinante, que comprende tratar sobrenadantes de cultivo celular que comprenden EPO mediante las siguientes etapas en orden: (a) precipitación salina diferencial; (b) cromatografía de interacción hidrófoba; (c) concentración y diafiltración; (d) cromatografía de intercambio aniónico; (e) cromatografía de intercambio catiónico; (f) concentración y diafiltración; y (g) cromatografía de exclusión molecular.

La presente invención se refiere además a un método para purificar EPO humana recombinante, que comprende tratar sobrenadantes de cultivo celular que comprenden EPO mediante las siguientes etapas en orden: (a) precipitación salina diferencial; (b) concentración y diafiltración; (c) cromatografía de intercambio aniónico; (d) cromatografía de intercambio catiónico; (e) cromatografía de interacción hidrófoba; (f) concentración y diafiltración; y (g) cromatografía de exclusión molecular.

En una realización, la etapa de precipitación diferencial de los métodos descritos anteriormente y posteriormente comprende añadir sulfato amónico a dicho sobrenadante, seguido por centrifugación.

En una realización, la etapa de cromatografía de interacción hidrófoba de los métodos descritos anteriormente y posteriormente comprende usar una matriz de interacción hidrófoba. Preferiblemente, dicha matriz de interacción hidrófoba es Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

En una realización, la etapa de intercambio aniónico de los métodos descritos anteriormente y posteriormente comprende usar una matriz de intercambio aniónico. Preferiblemente, dicha matriz de intercambio aniónico comprende Q-Sepharose Fast Flow.

En una realización, la etapa de intercambio catiónico de los métodos y las composiciones descritos anteriormente y posteriormente comprende usar una matriz de intercambio catiónico. Preferiblemente, dicha matriz de intercambio catiónico comprende SP-Sepharose Fast Flow.

En una realización, la etapa de exclusión molecular de los métodos descritos anteriormente y posteriormente comprende usar una matriz de exclusión molecular. Preferiblemente, dicha matriz de exclusión molecular es Sephacryl S-200 HP.

EPO sustancialmente pura puede producirse mediante una combinación de las siguientes etapas: precipitación diferencial, cromatografía de interacción hidrófoba; diafiltración; cromatografía de intercambio aniónico; cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular. Más preferiblemente, dicha EPO tiene una pureza de más de 99% según se determina mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE.

Un método para usar la EPO purificada comprende la liofilización en una forma adecuada para inyección en seres humanos para el tratamiento de una enfermedad. Específicamente, el procedimiento de liofilización comprende poner la EPO en una composición farmacéutica, cargar la primera composición de EPO en un recipiente, en donde dicho recipiente está a una temperatura igual a o menor de -30°C; incubar dicha composición de EPO a una temperatura igual a o menor de -30°C bajo presión atmosférica durante un tiempo igual a o mayor de 4 horas; incubar dicha composición a una presión igual a o menor de 30 micras absolutas durante un tiempo igual a o mayor de una hora; y elevar la temperatura hasta igual a o más de 3°C por hora hasta que se alcancen al menos 25°C, mientras se mantienen los valores de presión iguales o menores de 5 micras absolutas.

Una composición farmacéutica para liofilización puede comprender EPO, azúcares, sales y albúmina humana. Una composición para liofilización puede comprender EPO, manitol, NaCl, NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄·12H₂O.

ES 2 312 219 T3

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

5 Ejemplo I

Recuperación

10 7.920 g de sulfato amónico se disolvieron en 30 litros de solución concentrada estéril obtenida de cultivar células CHO (ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés) que producen EPO. Después de la adición de sulfato amónico, la solución se almacenó a 4°C durante 24 horas. Muchas proteínas contaminantes precipitaban mientras la EPO permanecía en solución. El producto se centrifugó a 5.000 RPM durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall, usando un rotor HG4L.

15 Ejemplo 2

Cromatografía de Interacción Hidrófoba

20 El material obtenido de la etapa previa se cromatografía usando una matriz de interacción hidrófoba (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow low sub.-Pharmacia) de acuerdo con los siguientes parámetros:

1. Equipo

25 A. Precolumna

- 1) Diámetro: 14 cm
- 2) Altura del lecho: 19 cm
- 30 3) Matriz:
 - a) Q-Sepharose Big Bead (Pharmacia)
 - 35 b) Volumen: 3.000 ml

B. Columna:

- 40 1) Diámetro: 20 cm
- 2) Altura del lecho: 19 cm
- 3) Matriz:
 - 45 a) Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow low sub. (Pharmacia)
 - b) Volumen: 6.000 ml

2. Soluciones y tampones

- A. Tampón A: NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,2
- B. Tampón F: NaH_2PO_4 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 M, pH 7,2
- 55 C. Tampón G: NaH_2PO_4 150 mM, pH 7,2
- D. alcohol isopropílico al 20%
- 60 E. NaOH 0,5 N

3. Material que va a cromatografiarse

- 65 A. Sobrenadante de sulfato amónico resultante del ejemplo previo

ES 2 312 219 T3

B. Condiciones de la muestra:

- 1) Volumen: 30.000 ml
- 2) Conductividad: 190-210 mSi/cm
- 3) pH: 7,2

Para equilibrar y esterilizar la precolumna, las soluciones o los tampones siguientes en las cantidades detalladas posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar secuencialmente a su través: 1,0 volúmenes de la columna ("vc") (3 l) de H₂O; 1,0 vc (3 l) de NaOH 0,5N; 1,0 vc (3 l) de Tampón G y finalmente 1,5 vc (4,5 l) de Tampón F.

Para equilibrar la columna, las soluciones o los tampones siguientes en las cantidades detalladas posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar secuencialmente a su través: 1,0 vc (6 l) of H₂O; 1,0 vc (6 l) de alcohol isopropílico al 20%; 1,0 vc (6 l) de H₂O; 1,0 vc (6 l) de NaOH 0,5 N; 1,0 vc (5 l) de H₂O; 1,0 vc (6 l) de Tampón G y finalmente 1,5 vc (4 l) de Tampón F.

Una vez que la precolumna y la columna se equilibraban, la columna se conectó después de la precolumna y se cargó el material que iba a cromatografiarse. Dicha carga se realizó a 4°C, con un flujo de 19 cm/hora. Posteriormente, la elución se realizó con el mismo caudal pero a temperatura ambiente y las soluciones y los tampones detallados posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar a través de las columnas en las cantidades y el orden siguientes: 2,5 vc (15 l) de Tampón F (una vez que este tampón había pasado a su través, la precolumna se retiraba). Una vez que la precolumna se retiraba, la cromatografía se realizaba en la columna de Phenyl Sepharose sobre la que se aplicaba un gradiente de Tampón F-Tampón A partiendo de una relación de 85:15 de dichos tampones hasta que se alcanzaba una relación de 50:50 de dichos tampones en un volumen total de 10 vc (60 l).

Cuando se finalizaba el gradiente, 1,5 vc (9 l) de Tampón F-Tampón A en una relación de 30:70 se hicieron pasar a través de la columna y finalmente 1,5 vc de H₂O. Las fracciones que contenían EPO seleccionadas se filtraron bajo condiciones estériles a través de una membrana con poros de 0,22 µm y se almacenaron a 4°C.

Ejemplo 3

Concentración y Diafiltración

Las fracciones resultantes del ejemplo previo se concentraron y se diafiltraron de acuerdo con las condiciones descritas posteriormente:

1. *Equipo*

- A. Bomba peristáltica: Watson Marlow - N° Cat. 302S
- B. Tubería: Masterflex - N° Cat. 06402-18
- C. Concentrador: Prep Scale Millipore CDU F006LC

2. *Soluciones y tampones*

- A. Dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) 10 mM
- B. Triton X-100 1 mM
- C. NaOH 0,1 N
- D. H₂O
- E. Tampón A: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,2

3. *Material que va a procesarse*

- A. Fracciones seleccionadas resultantes del ejemplo previo.
- B. Condiciones de la muestra:

- 1) Volumen: 15.000-30.000 ml

ES 2 312 219 T3

2) Conductividad: 130-170 mSi/cm

3) pH: 7,2

5 En primer lugar el equipo se limpió, se esterilizó y se equilibró, y la siguiente secuencia de soluciones y tampones se hizo fluir a través del equipo: 10 l de SDS 10 mM; 40 l de H₂O; 10 l de Triton X-100 1 mM, 40 l de H₂O; 10 l de NaOH 0,1 N; 40 l de H₂O y finalmente 5 l de Tampón A. El equipo estaba entonces listo para ser usado para concentración y diafiltración frente a Tampón A sobre las fracciones seleccionadas, siguiendo la metodología habitual.

10 El volumen final del producto concentrado estaba entre 2.000 y 3.000 ml, su conductividad era 1.100-1.550 μ mSi/cm y su pH era 7,2.

Ejemplo 4

15 *Cromatografía de Intercambio Aniónico*

El material resultante del ejemplo previo se cromatografió usando una matriz de intercambio aniónico, como sigue:

1. *Equipo*

20

A. Columna:

1) Diámetro: 14 cm

25

2) Altura del lecho: 19 cm

3) Matriz

30

a) Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)

b) Volumen: 3.000 ml

2. *Soluciones y tampones*

35

A. Tampón A: NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,2

B. Tampón G: NaH₂PO₄ 150 mM, pH 7,2

40

C. Tampón N: Ácido Acético 50 mM, NaCl 500 mM, pH 4,0

D. Tampón S: Ácido Acético 50 mM, pH 4,0

45

E. NaOH 0,5 N

3. *Material que va a cromatografiarse*

50

A. Fracciones seleccionadas de la etapa de interacción hidrófoba, debidamente concentradas y diafiltradas.

B. Condiciones de la muestra:

1) Volumen: 2.000 a 3.000 ml

55

2) Conductividad: 1.100-1.550 μ mSi/cm

3) pH: 7,2

60

Para equilibrar la columna, las soluciones o los tampones siguientes en las cantidades detalladas posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar secuencialmente a su través: 1,0 vc (3 l) de H₂O; 1,0 vc (3 l) de NaOH 0,5 N; 1,0 vc (3 l) de Tampón N; 2,0 vc (6 l) de Tampón S; 3,0 vc (9 l) de Tampón G y finalmente 2,0 vc (6 l) de Tampón A.

65

Una vez que la columna se equilibraba, se cargó el material que iba a cromatografiarse. Dicha carga se realizó a temperatura ambiente a 39 cm/hora. Posteriormente, la elución se realizó a un caudal y una temperatura iguales, y las soluciones y los tampones detallados posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar en el siguiente orden: 1,0 vc (3 l) de Tampón A y 4,0 vc (12 l) de Tampón S. Posteriormente, se realizó una etapa de Tampón S-Tampón N (50:50) en un volumen total de 1,5 vc (4,5 l).

ES 2 312 219 T3

Una vez que la etapa finalizaba, 1,5 vc (4,5 l) de Tampón N se hicieron pasar a través de la columna. Las fracciones que contenían EPO seleccionadas se filtraron bajo condiciones estériles a través de una membrana con poros de 0,22 μm y se almacenaron a 4°C.

5

Ejemplo 5

Cromatografía de Intercambio Catiónico

10 El material resultante del ejemplo previo se cromatografió usando una matriz de intercambio catiónico, como sigue:

1. *Equipo*

A. Columna:

15

- 1) Diámetro: 14 cm
- 2) Altura del lecho: 19 cm
- 20 3) Matriz
 - a) SP-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)
 - b) Volumen: 3.000 ml

25

2. *Soluciones y tampones*

A. Tampón D: NaH_2PO_4 12,5 mM, Ácido cítrico 4 mM, pH 6,0

30

B. Tampón E: NaH_2PO_4 12,5 mM, Ácido cítrico 4 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,0

C. NaOH 0,5 N

35

3. *Material que va a cromatografiarse*

A. Fracciones seleccionadas del ejemplo previo ajustadas hasta pH 6,0 con NaOH concentrado y diluidas hasta alcanzar una conductividad de 4.800 $\mu\text{Si}/\text{cm}$ (conductividad igual a Tampón D-Tampón E en una relación de 93,5:6,5).

40

B. Condiciones de la muestra:

- 1) Volumen: 5.000 ml
- 45 2) Conductividad: 4.800 $\mu\text{Si}/\text{cm}$ (igual a Tampón D-Tampón E en una relación de 93,5:6,5).
- 3) pH: 6,0

50

Para equilibrar la columna, las soluciones o los tampones siguientes en las cantidades detalladas posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar secuencialmente a su través: 1,0 vc (3 l) de H_2O ; 1,0 vc (3 l) de NaOH 0,5 N; 1,0 vc (3 l) de Tampón E y finalmente 1,5 vc (4,5 l) de Tampón D-Tampón E en una relación de 93,5:6,5.

55

Una vez que la columna se equilibraba, se cargó el material que iba a cromatografiarse. Dicha carga se realizó a temperatura ambiente a 39 cm/hora. Posteriormente, la elución se realizó a un caudal y una temperatura iguales, y las soluciones y los tampones detallados posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar a su través en el siguiente orden: 1,5 vc (4,5 l) de Tampón D-Tampón E en una relación de 93,5:6,5. Posteriormente, se aplicó un gradiente de Tampón D-Tampón E partiendo de una relación de 93,5:6,5 de dichos tampones hasta que se alcanzaba una relación de 50:50 de dichos tampones en un volumen total de 2,0 vc (6 l). Una vez que el gradiente se finalizaba, 60 1,5 vc (4,5 l) de Tampón E se hicieron pasar a través de la columna. Las fracciones que contenían EPO seleccionadas se filtraron bajo condiciones estériles a través de una membrana con poros de 0,22 μm y se almacenaron a 4°C.

65

ES 2 312 219 T3

Ejemplo 6

Concentración y Diafiltración

5 Las fracciones resultantes del ejemplo previo se concentraron y se diafiltraron de acuerdo con los parámetros y las condiciones siguientes:

1. *Equipo*

- 10 A. Bomba peristáltica: Watson Marlow - N° Cat. 302S
B. Tubería: Masterflex - N° Cat. 06402-18
15 C. Concentrador: Prep Scale Millipore CDU F006LC

2. *Soluciones y tampones*

- 20 A. Dodecilsulfato sódico (SDS) 10 mM
B. Triton X-100 1 mM
C. NaOH 0,1 N
25 D. H₂O
E. Tampón B: NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,05 mg/ml de lactosa, pH 7,2

3. *Material que va a procesarse*

- 30 A. Fracciones seleccionadas resultantes de la etapa previa.
B. Condiciones de la muestra:
35 1) Volumen: 6.000 ml
2) Conductividad: 5.000-8.000 μ Si/cm
40 3) pH: 6,0

En primer lugar el equipo se limpió, se esterilizó y se equilibró, dejando pasar a su través la siguiente secuencia de soluciones y tampones: 10 l de SDS 10 mM; 40 l de H₂O; 10 l de Triton X-100 1 mM, 40 l de H₂O; 10 l de NaOH 0,1 N; 40 l de H₂O y finalmente 5 l de Tampón B. De este modo, el equipo estaba listo para ser usado
45 para concentración y diafiltración frente a Tampón B sobre las fracciones seleccionadas, siguiendo la metodología habitual.

El volumen final del producto concentrado era 350-600 ml, su conductividad era 15.500-19.000 mSi/cm, el pH era 7,2 y la solución se almacenó a 4°C.

50

Ejemplo 7

Cromatografía de Exclusión Molecular

55

El material resultante del ejemplo previo se cromatografió usando una matriz de exclusión molecular, como sigue:

1. *Equipo*

- 60 A. Columna:
1) Diámetro: 10 cm
2) Altura del lecho: 76 cm
65 3) Matriz

ES 2 312 219 T3

a) Sephacryl S-200 HP (Farmacia)

b) Volumen: 6.000 ml

5

2. Soluciones y tampones

A. Tampón B: NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 0,15 M, 0,05 mg/ml de lactosa, pH 7,2

10

B. NaOH 0,5 N

3. Material que va a cromatografiarse

15

A. Fracciones seleccionadas del ejemplo previo, concentradas.

B. Condiciones de la muestra:

20

1) Volumen: 350 a 600 ml

2) Conductividad: 15.500-19.000 $\mu\text{Si}/\text{cm}$

3) pH: 7,2

25

Para equilibrar la columna, las soluciones o los tampones siguientes en las cantidades detalladas posteriormente en la presente memoria se hicieron pasar secuencialmente a su través: 1,0 volúmenes de columna ("vc") (6 l) de H_2O ; 1,5 vc (9 l) de NaOH 0,5 N y finalmente 3,0 vc (18 l) de Tampón B. Una vez que la columna se equilibraba, se cargaron 100 ml del material que iba a cromatografiarse. Dicha carga se realizó a temperatura ambiente a 27 cm/hora. Posteriormente, la elución se realizó a un caudal y una temperatura iguales, y 0,75 vc (4,5 l) de Tampón B se hicieron pasar a su través. Este procedimiento se repitió entre cuatro y seis veces, esto es, hasta que el material que iba a cromatografiarse se utilizaba completamente. Las fracciones que contenían EPO seleccionadas se filtraron bajo condiciones estériles a través de una membrana con poros de 0,22 μm y se almacenaron a 4°C.

30

Con esta etapa el procedimiento de purificación se concluía. La EPO obtenida tiene un grado de pureza superior a 99% y todo el procedimiento de purificación tenía un rendimiento global de aproximadamente 30%.

35

Ejemplo 8

40

Ensayos de EPO

La EPO obtenida en el ejemplo previo se ensayó con respecto a la identidad y la actividad biológica de acuerdo con el siguiente protocolo.

45

En un gel de SDS-PAGE desnaturalizante la EPO se identificó como una banda ancha de un peso molecular como el esperado para la EPO. Véase la Figura 1. La banda era reconocida por anticuerpos monoclonales y policlonales producidos contra EPO humana en un ensayo de transferencia Western, como se esperaba para la EPO. Véase la Figura 2. El tratamiento con glucanasas probaba la existencia de las cadenas glicosídicas en la extensión y el tamaño que se esperaban para la EPO. Véase la Figura 3. Se observó que la EPO producida estaba compuesta por una serie de especies que mostraban puntos isoeléctricos de 3,0 a 4,5, según se esperaba para la EPO. Véase la Figura 4.

50

La secuencia de aminoácidos completa de la proteína aislada, purificada del sobrenadante de cultivo de líneas celulares transfectadas, mostraba una homología total con la eritropoyetina humana natural, cuya secuencia de 165 aminoácidos es como sigue (Nº ID SEC: 1):

55

60

65

ES 2 312 219 T3

5 NH₂--- Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp
 Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn
 Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 10 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val
 Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 15 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu
 Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp
 20 Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser
 Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 25 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp
 30 Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys
 35 Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 Cys Arg Thr Gly Asp---COOH

X sitios de glicosilación

40 Se verificaron la presencia de los cuatro sitios de glicosilación en la cadena de 165 aminoácidos, así como la estructura compleja del carbohidrato y, en particular, los residuos terminales de ácido siálico, que caracterizan a la EPO. Estos resultados estaban apoyados además por un ensayo de actividad biológica de la proteína producida mediante una prueba de ratones policitémicos exhipóxicos, que mostraba una concordancia completa con el patrón internacional de la EPO.

Una muestra de EPO obtenida de acuerdo con el método reivindicado se sometió a un análisis de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa y de exclusión molecular. En ambos casos, se probaba una pureza de más de 99%. Véanse las Figuras 5 y 6.

50 La siguiente tabla ilustra la recuperación de cada etapa de preparación correspondiente al procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

FASE	RECUPERACIÓN (%)
Sobrenadante de Cultivo Celular	100
Cromatografía de Interacción Hidrófoba	70
60 Concentración y Diafiltración I	97
Cromatografía de Intercambio Aniónico	82
Cromatografía de Intercambio Catiónico	71
65 Concentración y Diafiltración II	95
Cromatografía de Exclusión Molecular	79

ES 2 312 219 T3

La siguiente tabla ilustra la recuperación acumulada de la secuencia de purificación de acuerdo con la reivindicación 1.

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

FASE	RECUPERACIÓN (%)
Sobrenadante de Cultivo Celular	100
Cromatografía de Interacción Hidrófoba	70
Concentración y Diafiltración I	68
Cromatografía de Intercambio Aniónico	56
Cromatografía de Intercambio Catiónico	40
Concentración y Diafiltración II	38
Cromatografía de Exclusión Molecular	30

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular que comprende las siguientes etapas en orden:

(a) precipitación salina diferencial;

10 (b) cromatografía de interacción hidrófoba;

(c) concentración y diafiltración;

(d) cromatografía de intercambio aniónico;

15 (e) cromatografía de intercambio catiónico;

(f) concentración y diafiltración; y

20 (g) cromatografía de exclusión molecular.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende añadir sulfato amónico a dicho sobrenadante de cultivo, seguido por centrifugación.

25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende usar una matriz de interacción hidrófoba.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha matriz de interacción hidrófoba empleada es Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende usar una matriz de intercambio aniónico.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha matriz de intercambio aniónico es Q-Sepharose Fast Flow.

35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende usar una matriz de intercambio catiónico.

40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha matriz de intercambio catiónico es SP-Sepharose Fast Flow.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (g) comprende usar una matriz de exclusión molecular.

45 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha matriz de exclusión molecular empleada es Sephacryl S-200 HP.

11. Un método para purificar eritropoyetina humana recombinante de sobrenadantes de cultivo celular, que comprende las siguientes etapas en orden:

50 (a) precipitación salina diferencial;

(b) concentración y diafiltración;

55 (c) cromatografía de intercambio aniónico;

(d) cromatografía de intercambio catiónico;

(e) cromatografía de interacción hidrófoba;

60 (f) concentración y diafiltración; y

(g) cromatografía de exclusión molecular.

65 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (a) comprende añadir sulfato amónico a dicho sobrenadante de cultivo, seguido por centrifugación.

ES 2 312 219 T3

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (c) comprende usar una matriz de intercambio aniónico.

5 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha matriz de intercambio aniónico es Q-Sepharose Fast Flow.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (d) comprende usar una matriz de intercambio catiónico.

10 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicha matriz de intercambio catiónico es SP-Sepharose Fast Flow.

15 17. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (e) comprende usar una matriz de interacción hidrófoba.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha matriz de interacción hidrófoba es Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

20 19. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (g) comprende usar una matriz de exclusión molecular.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha matriz de exclusión molecular es Sephacryl S-200 HP.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

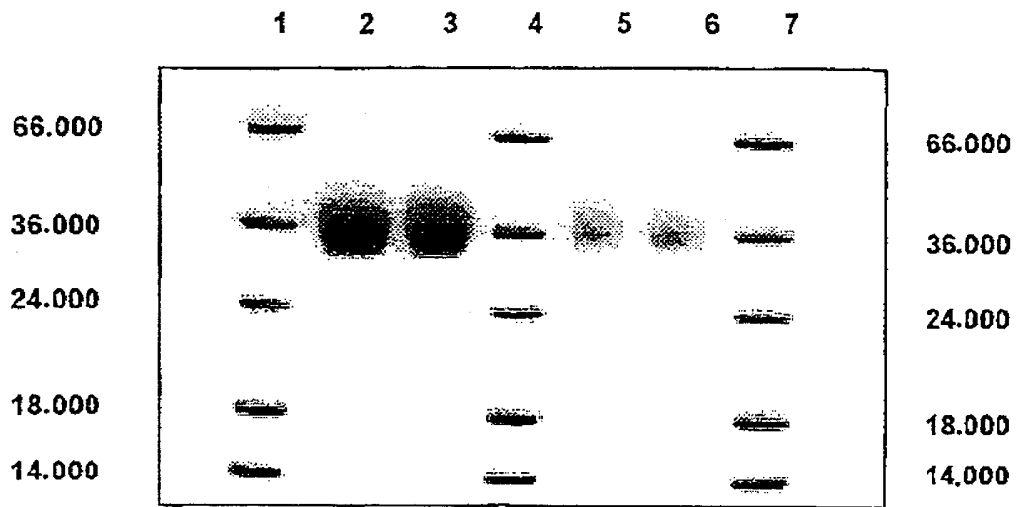


Fig. 2. Análisis de transferencia Western

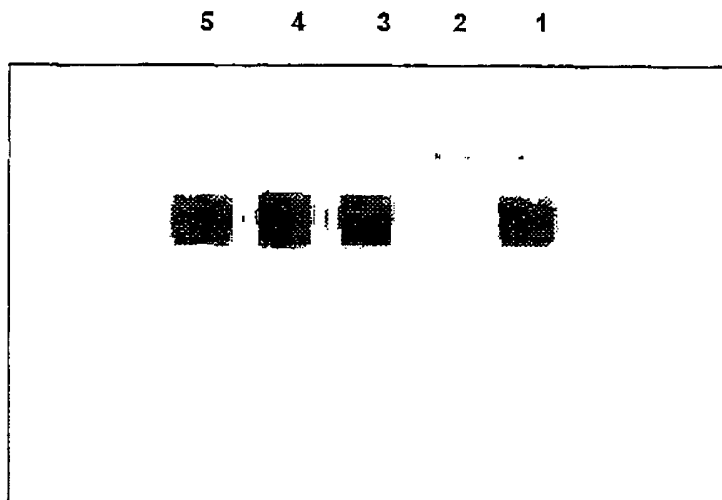


Fig. 3. Análisis de SDS-PAGE de la digestión de EPO con glucanasas

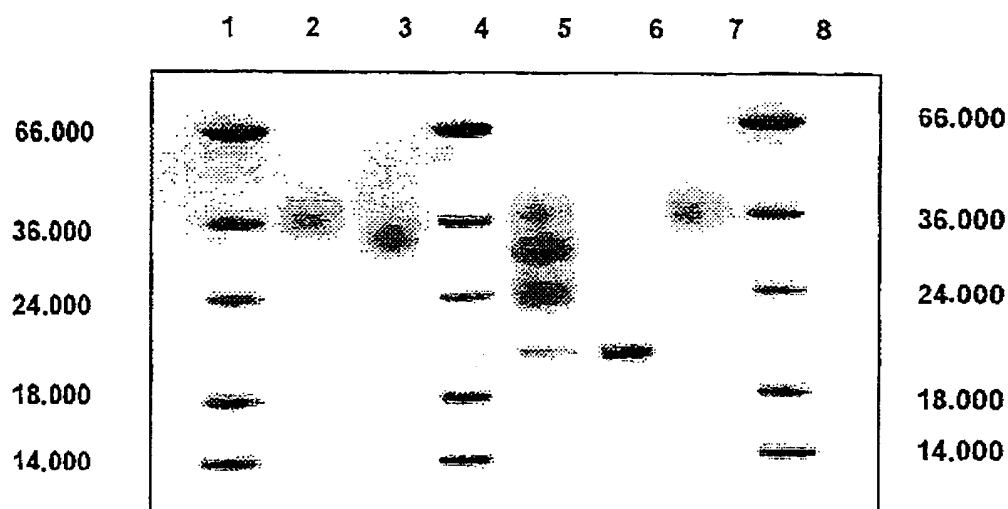


Fig. 4. Determinación del punto isoeléctrico (enfoque isoeléctrico)

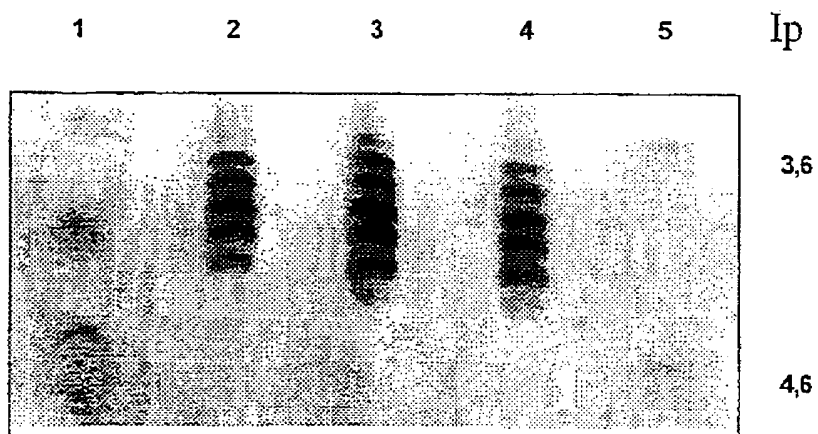


Fig. 5. Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

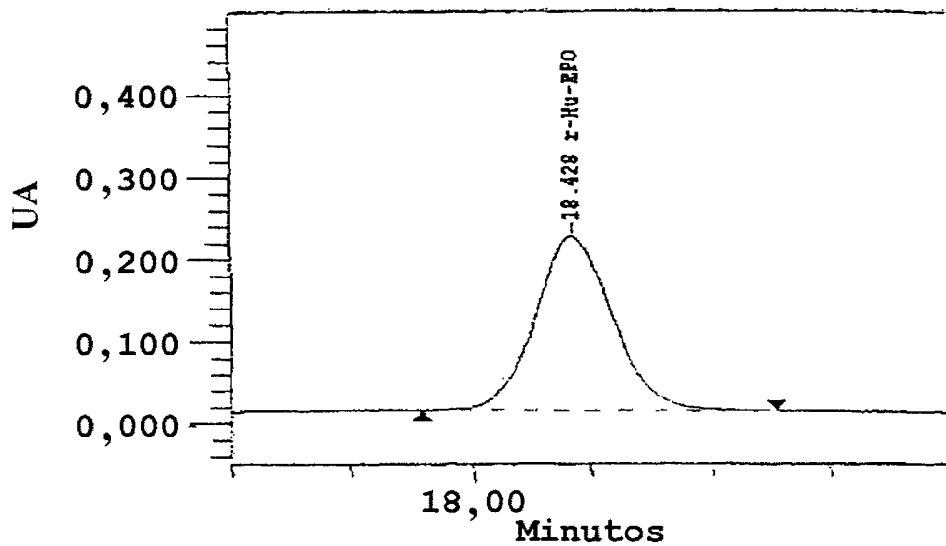
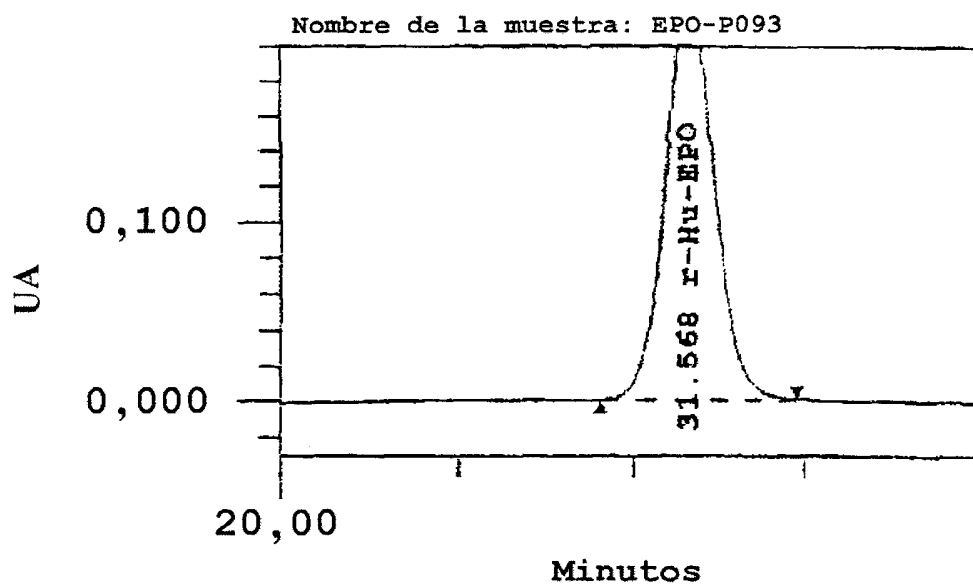


Fig. 6. Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular

0,2 mg/ml



ES 2 312 219 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sterrenbeld Biotechnologie North America, Inc.
Carcagno, Carlos Miguel
5 Criscuolo, Marcelo
Melo, Carlos
Vidal, Juan Alejandro

<120> Métodos para purificar eritropoyetina humana recombinante de Sobrenadantes de Cultivo Celular
10

<130> 1792.003PC02

<140>
15 <141>

<150> AR 99-01-00680
20 <151> 23-02-1999

<150> AR 98-01-05610
25 <151> 06-11-1998

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

30 <210> 1
<211> 165
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

40 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15

45 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30

50 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45

55

60

65

ES 2 312 219 T3

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

5

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80

10

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95

15

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

20

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125

25

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

30

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

35

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

40

45

50

55

60

65