



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 523**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02027952 .7**
96 Fecha de presentación : **13.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1428878**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

54 Título: **Procedimiento para la producción y purificación de eritropoyetina.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Biocentrals Arzneimittel AG.**
Stadastrasse 2-18
61118 Bad Vilbel, DE

72 Inventor/es: **Bavand, Michael y**
Blasey, Horst

74 Agente: **Mir Plaza, Mireia**

ES 2 312 523 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción y purificación de eritropoyetina.

5 La presente invención se refiere a la producción de glicoproteínas recombinantes, particularmente eritropoyetina humana recombinante, en células de mamífero, así como a los procedimientos para purificar las glicoproteínas producidas a partir del cultivo celular.

10 Con pocas excepciones, las proteínas secretadas y asociadas a membrana de todas las células eucariotas están glicosiladas. Es bien conocido que las fracciones carbohidrato de tales glicoproteínas son importantes para ejercer sus funciones y actividades biológicas, tales como secreción, semivida biológica, antigenicidad y estabilidad. La mayoría de los terapéuticos recombinantes actuales y potenciales para aplicaciones en humanos son glicoproteínas. La modificación de la glicosilación de una proteína humana recombinante puede llevar a un producto con características farmacodinámicas y farmacocinéticas mejoradas, tales como mayor semivida en la circulación, orientación al sitio de acción (especificidad y bioactividad incrementadas) así como mayor estabilidad *in vivo* e *in vitro*, menor heterogeneidad y menor antigenicidad/inmunogenicidad. Se han demostrado relaciones estructura-función para las glicosilaciones para un número de glicoproteínas humanas recombinantes terapéuticas, tales como eritropoyetina, Factor VIII y β -glucocerebrosidasa.

20 En general, no se observa una función biológica específica que pueda asociarse a una única estructura carbohidrato definida. Por el contrario, las relaciones estructura-función deben buscarse en el contexto de los patrones analíticos de glicosilación y la abundancia relativa de cadenas de carbohidratos. Estas a su vez están caracterizadas por propiedades físico-químicas tales como el número y tipo de estructura de ramificación (antenaridad), estructuras repetidas y contenido de ácido siálico. Como resultado de extensivas evaluaciones estructura-función de unas pocas proteínas modelo, han emergido unas pocas reglas para clasificar la calidad de una glicoproteína recombinante en base a las características de su glicosilación.

30 La eritropoyetina es una hormona glicoproteína bien estudiada implicada en la maduración de las células progenitoras eritroides en eritrocitos. Es esencial en la regulación de los niveles de células rojas sanguíneas en la circulación. La eritropoyetina natural es producida por el hígado durante la vida fetal y por el riñón de los adultos y circula en la sangre y estimula la producción de células rojas sanguíneas en la médula ósea. La anemia es casi invariablemente una consecuencia de un fallo renal debido a una menor producción de eritropoyetina desde el riñón.

35 La eritropoyetina recombinante producida mediante técnicas de ingeniería genética que implican la transferencia y expresión de un gen que codifica la eritropoyetina en una célula huésped de mamífero ha demostrado ser eficaz cuando es usada en el tratamiento de anemia resultante de un fallo renal crónico. La eritropoyetina es una glicoproteína con un peso molecular comprendido entre 34 y 38 kDa, del cual aproximadamente entre el 40% y el 50% es debido a las fracciones de carbohidrato. La mayor parte de las cadenas de carbohidrato están N-ligadas a 3 asparaginas y los carbohidratos menores están O-ligados a una serina. La glicosilación de tipo complejo con glicoestructuras antenarias 40 altas puede observarse con la eritropoyetina y la galactosa terminal está altamente sialilada. La glicosilación o sialilación no parece ser un prerrequisito para la unión a receptor y la actividad de la eritropoyetina *in vitro*, sin embargo la eritropoyetina desglicosilada o desialilada ejerce un semivida corta *in vivo*. De esta manera, las características de la glicosilación y sialilación de la eritropoyetina son necesarias para la mejora de la semivida *in vivo* e influyen también en la ruta de depuración y la orientación a órgano de la molécula.

45 La provisión de glicoestructuras adecuadas fijadas a la proteína eritropoyetina debe ser el foco de los esfuerzos de desarrollo para obtener una preparación de eritropoyetina terapéuticamente viable. Además de la semivida, la ruta de depuración y la orientación órgano, los estudios físico-químicos han mostrado que la glicosilación incrementa también la estabilidad de la eritropoyetina contra la degradación química y biológica. La glicosilación y sialilación de la eritropoyetina natural (eritropoyetina urinaria) y la eritropoyetina recombinante han sido estudiadas extensivamente 50 a nivel analítico descriptivo, sin embargo sólo hay pocos datos disponibles para correlacionar los datos analíticos con los resultados terapéuticos. A partir de los datos disponibles parece que las características siguientes parecen ser deseables para obtener un buen producto que sea terapéuticamente eficaz.

55 Primero, la calidad del producto eritropoyetina parece estar influida por el tipo y el grado de sialilación de la galactosa terminal. Imai *et al.* (1990, Eur. J. Biochem. 194:457-462) mostraron que las isoformas de eritropoyetina con alto contenido de ácido siálico ejercían una actividad específica más alta que las que tenían un menor contenido de ácido siálico. Rush *et al.* (1995, Anal. Chem. 67:1442-1452) describieron la O-acetilación de residuos de ácido siálico de eritropoyetina y su efecto sobre el tiempo de circulación incrementado. Los estudios de depuración realizados por Fukuda *et al.* (1989, Blood 73:84-89) en ratas mostraron que la eritropoyetina derivada de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) fue depurada de la sangre con una semivida de aproximadamente 2 horas, después de un mecanismo de depuración bifásico. La asialo eritropoyetina fue aclarada en un intervalo de diez minutos, sugiriendo un mecanismo de unión a galactosa de las células hepáticas como el responsable de la depuración de la asialo eritropoyetina. Spivak and Hogans (1989, Blood 73:90-99) mostraron que con la eritropoyetina comercial, la depuración en plasma de la eritropoyetina era multiexponencial con una fase de distribución rápida inicial ($T_{1/2}$ =53 min.) y una fase de eliminación 65 más lenta ($T_{1/2}$ =180 min.). La acumulación orgánica en los riñones, médula ósea y bazo empezó 30 minutos después de la inyección de la eritropoyetina comercial. La asialo eritropoyetina fue depurada rápidamente vía la ruta hepática.

ES 2 312 523 T3

Por lo tanto, la evidencia publicada sobre la sialilación de la eritropoyetina mostró tres efectos principales en la sialilación de la eritropoyetina en la actividad *in vivo*:

- La depuración de la eritropoyetina en la circulación decrece cuando la eritropoyetina está sialilada. La extensión de la sialilación depende de la extensión de las estructuras antenarias presentes que proporcionan el sustrato para la sialilación de las galactosas terminales.

- Las isoformas de eritropoyetina con el mayor número de ácidos siálicos parecen ejercer la actividad específica más alta.

- La asialo eritropoyetina es depurada rápidamente vía la ruta hepática, la eritropoyetina poco sialilada (estructuras biantenarias) está dirigida a los riñones y al bazo. Las estructuras sialiladas más antenarias (triantenarias y tetraantenarias) están dirigidas principalmente a las células de la médula ósea.

- Un alto grado de O-acetilación de los residuos de ácido siálico incrementa el tiempo de circulación reduciendo la depuración hepática.

Por lo tanto, es deseable usar condiciones, durante el cultivo de células de mamífero, que permitan consistentemente la máxima sialilación de la mayoría de las estructuras de carbohidrato N-ligadas. Las condiciones para la máxima sialilación serían una ventaja considerable para la fabricación de glicoproteínas terapéuticas. Dados los efectos beneficiosos de las glicoproteínas altamente sialiladas, particularmente la eritropoyetina, es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos para incrementar el nivel de sialilación de las glicoproteínas, particularmente la eritropoyetina, mediante la modificación de las condiciones de cultivo celular durante la producción de las glicoproteínas.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el grado de sialilación de las glicoproteínas, particularmente la eritropoyetina, puede ser optimizada mediante el cultivo de las células de mamífero productoras de glicoproteína a un pH que mantiene la producción de proteínas altamente sialiladas.

Tradicionalmente, el pH de un medio de cultivo es manipulado con el objetivo de alcanzar una producción y/o crecimiento celular máximo. Los medios para el cultivo celular son preparados típicamente con un pH ajustado a 7,4, similar al pH de la sangre humana. Sin embargo, el pH óptimo depende de la línea celular y puede variar entre los valores de pH de 6,9 a 7,6 (revisado en Eagle (1973) J. Cell Physiol. 82:1-89).

De esta manera, el efecto del pH sobre la producción y/o el crecimiento celular, y no su efecto sobre la naturaleza de un producto celular ha sido el factor determinante en la selección de los valores de pH en el cultivo celular tradicional. Por ejemplo, la técnica anterior ha descrito la modificación del pH, producción de lactato y glucosa en las fases de crecimiento y producción del procedimiento de cultivo celular con el fin de optimizar el crecimiento y la producción, respectivamente (ver por ejemplo WO 88/01643, cuya referencia no detalla la naturaleza de los productos celulares producidos). La patente US 5.096.816 describe el efecto del amoníaco sobre la glicosilación de los productos celulares mediante el control del pH. El procedimiento preferente describe una estrategia multi-pH para el crecimiento celular óptimo a un pH superior y a continuación el uso de un pH bajo para minimizar la inhibición de la sialilación terminal de los productos celulares debido a altos niveles de amoníaco.

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto en la actualidad un efecto opuesto al descrito en la patente US 5.096.816. La producción del producto celular deseado que contiene un grado máximo de sialilación es mejor en el intervalo de pH superior.

Tal como se muestra en la Figura 1, el cultivo celular que emplea el control de pH entre los valores de pH 7,2-7,5 resulta en la formación de producto con un mayor grado de sialilación. Las Figuras 1A y 1B muestran los resultados de los perfiles de distribución de las isoformas del producto de la eritropoyetina humana recombinante obtenida tras el cultivo bajo diferentes condiciones de pH controlado. El producto producido bajo las diferentes condiciones de pH del cultivo fue aislado mediante un procedimiento de purificación de 2 etapas (captura de producto con una Q-Sefarosa XL (Amersham Lifesciences, Alemania) y elución escalonada con sal seguida por una etapa de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) con Butil Sefarosa FF (Amersham Lifesciences, Alemania) y fue analizado mediante electroforesis capilar (CE). La CE separa las isoformas de eritropoyetina por carga y por lo tanto es una herramienta analítica adecuada para analizar el estado de sialilación de un producto celular.

Tal como puede observarse en la Figura 1A, hay un desplazamiento de la distribución de isoformas hacia las isoformas más cargadas (números de pico mayores) en las condiciones de cultivo que emplean un pH de 7,2-7,5. Una preparación purificada de una preparación de referencia altamente glicosilada y sialilada, el estándar de eritropoyetina BRP de la European Pharmacopoeia (Ph. Eur. (2002) 4a edición) fue incluido en el análisis, para la comparación. Particularmente, las formas más altas del producto eritropoyetina sialilada, representadas por las isoformas en los picos 7 y 8 están presentes en una proporción considerablemente inferior en los productos derivados del cultivo celular a un pH de 6,9. De esta manera, el cultivo celular que emplea un control de pH con un pH entre 7,2 y 7,5 resulta en la formación de un producto con un mayor grado de sialilación de productos. El valor preferente de pH es 7,2, que proporcionó una buena productividad de producto y un alto grado de sialilación. A pesar de que la densidad celular

global a este pH es inferior a por ejemplo a un pH de 6,9, la calidad de la glicoproteína (en este caso eritropoyetina) con respecto al contenido de sialil- es mejor a un pH de entre 7,2 y 7,5.

Además, el descubrimiento inesperado de que el cultivo celular a valores de pH comparablemente altos, tales como un pH entre 7,2 y 7,5, lleva a una eritropoyetina con un mayor contenido de grupos glicosil- y sialil- aunque la masa celular es reducida puede extenderse a la producción de otras glicoproteínas tales como t-PA, Factor XIII, Factor VIII, Interferon- β , IL-2.

El valor óptimo de pH puede ser específico del tipo de célula y línea celular y puede ser determinado mediante experimentos tal como se expone en la Figura 2. En el caso de las células CHO será un pH de 7,2 tal como se ejemplifica mediante las células CHO productoras de EPO.

El término “isoforma”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una preparación/fracción de eritropoyetina que contiene glicoproteínas que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o muy similares y un punto isoelectrico común pero que pueden diferir con respecto a la extensión, la complejidad, la naturaleza, la antenaridad y con el orden de los grupos glicosil- y sialil- unidos. Las isoformas según la invención pueden comprender también múltiples formas de eritropoyetina con la misma secuencia de aminoácidos o muy similar y un punto isoelectrico que difiere además en otras modificaciones transportadoras de carga tales como la acetilación o sulfatación. La expresión “secuencia de aminoácidos muy similar” indica que la secuencia de aminoácidos de una proteína comprende también las secuencias que son funcionalmente equivalentes a la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje.

De esta manera, las isoformas de glicoproteína según la invención están definidas por su punto isoelectrico y la secuencia de aminoácidos y cada isoforma puede comprender realmente, por lo tanto, múltiples isoformas en el sentido químico estricto.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la purificación de glicoproteínas altamente glicosiladas y particularmente sialiladas, particularmente eritropoyetina humana recombinante, a partir de un cultivo celular.

La eritropoyetina humana recombinante, cuando es analizada a partir del sobrenadante de un cultivo celular mediante enfoque isoelectrico (IEF), muestra un perfil de isoformas de punto isoelectrico (pI) amplio con más de 14 isoformas diferentes sobre un rango de pH de 3-9 (Gokana *et al.* (1997) J. Chromatogr., 791 (1-2):109-18). Las isoformas de eritropoyetina surgen principalmente debido a su variable contenido de glicosil con un número variable de residuos de ácido siálico terminal cargados negativamente. Las formas de eritropoyetina con más residuos de ácido siálico y por lo tanto un perfil pI más ácido se cree que son de mayor valor terapéutico debido a que los residuos de ácido siálico terminal en las glicoestructuras previenen la depuración rápida *in vivo* vía la ruta del receptor asialo.

La solicitud de patente internacional WO-A 1-86/07594 describe un procedimiento para purificar eritropoyetina a partir de un fluido que comprende las etapas de someter dicho fluido a una separación mediante cromatografía líquida en fase inversa que implica una resina C₄ o C₆ inmovilizada, para unir selectivamente de esta manera la eritropoyetina en dicho fluido a dicha resina, seguido de una elución selectiva de la eritropoyetina unida de dicha resina con una solución acuosa de etanol de entre 50 a 80 por ciento a un pH de entre aproximadamente 4,5 y 8,0 y aislando las fracciones que contienen eritropoyetina del eluyente.

La solicitud de patente internacional WO-A1-96/35718 describe una preparación de proteína que tiene actividad eritropoyetina que es obtenida de un medio de cultivo celular libre de suero usando un proceso de purificación que implica una cromatografía de tinta, cromatografía hidrofóbica sobre un portador alquilado o arilado, cromatografía en hidroxipatita, cromatografía hidrofóbica y cromatografía de intercambio de aniones.

Inoue N. *et al.* (1994, Biol. & Pharm. Bulletin 17(2):180-184) describe un procedimiento para la purificación de eritropoyetina humana con alta actividad *in vivo* de la orina que implica el intercambio de iones, permeación de gel, cromatografía de afinidad y cromatografía en fase inversa pero no procedimientos estabilizadores.

Por lo tanto, es un objeto de la invención desarrollar un procedimiento de purificación aguas abajo (DSP) en el que las isoformas ácidas de las glicoproteínas en general, las isoformas ácidas de eritropoyetina en particular, son enriquecidas.

Según la invención, las “isoformas ácidas” de eritropoyetina comprenden las isoformas que tienen un alto grado o contenido de grupos glicosil- y preferentemente de grupos sialil-.

Un mayor grado de sialilación de una glicoproteína puede conseguirse generalmente si un número creciente de cadenas de azúcar es terminada por grupos sialil-. De esta manera, si el contenido global de glicosil- de una glicoproteína es incrementado, puede conseguirse un mayor grado de silalilación ya que puede haber más cadenas de azúcar disponibles para la sialilación.

Según la invención, la eritropoyetina tiene un alto grado o contenido de grupos glicosil- y preferentemente grupos sialil- si muestran un perfil de isoformas comparable a los estándares respectivos de la Eur. Ph., tales como el estándar de eritropoyetina BRP de la Eur. Ph. tal como se determina mediante IEF.

ES 2 312 523 T3

Según la invención, la expresión “mezcla de proteína compleja” se refiere a una mezcla que comprende una multitud de diferentes proteínas e isoformas de las mismas, tales como por ejemplo extractos celulares.

Los productos de proteína son generalmente aislados de los fluidos del cultivo biológico empleando una secuencia de etapas de purificación. Cada etapa de purificación contiene una o varias etapas de lavado. Las condiciones de lavado generalmente no proporcionan una alta selectividad para la separación cuantitativa de las impurezas relacionadas (por ejemplo, impurezas de isoformas de proteína) de las moléculas del producto deseado. Los procedimientos de purificación con mayor selectividad, tales como el cromatografía de intercambio de aniones, sin embargo generalmente no son adecuados para la fabricación a gran escala debido a sus altos costos y escalabilidad limitada. Las etapas con un único lavado de sal proporcionan una selectividad limitada para el enriquecimiento de las moléculas deseadas. Las etapas de lavado fuerte producirán un enriquecimiento para las moléculas deseadas, sin embargo con el costo de una pérdida de producción global.

Se ha descubierto ahora, de manera sorprendente, que las isoformas de la eritropoyetina con un punto isoelectrico bajo o ácido, es decir, con un alto contenido de fracciones sialil-, pueden ser enriquecidas selectivamente mediante un procedimiento DSP si la cromatografía de intercambio de aniones es combinada con al menos una etapa de lavado ácido durante el procedimiento de purificación.

De esta manera, según la presente invención, una manera de superar la selectividad limitada de las etapas de lavado de sal es usar al menos una etapa de lavado ácido, proporcionando de esta manera una mayor selectividad global del procedimiento de purificación.

El procedimiento de purificación según la invención emplea múltiples etapas de cromatografía de aniones con al menos una etapa de lavado ácido en el procedimiento DSP, proporcionando una alta selectividad hacia la selección de las isoformas ácidas de proteína de un conjunto de isoformas de proteína.

En otra forma de realización preferente de la invención la etapa de captura mediante cromatografía de aniones es seguida por una etapa de lavado ácido y otras etapas de cromatografía de diferentes principios, tales como HIC o cromatografía de afinidad. Esto puede permitir la reducción de impurezas y proteínas que se copurifican con la etapa de captura mediante cromatografía. El experto en la materia entiende que la secuencia y la naturaleza de las etapas de cromatografía después de la etapa de captura de cromatografía de aniones dependen de la glicoproteína a purificar y pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la materia.

En una forma de realización todavía más preferente de la invención, una etapa de captura mediante cromatografía de aniones y una etapa de lavado ácido opcional son seguidas por etapas de cromatografía de diferentes principios. En una última etapa, otra cromatografía de intercambio de aniones y una etapa de lavado ácido obligatoria son aplicadas a continuación para enriquecer selectivamente la preparación para glicoproteínas con alto contenido glicosil- y sialil-.

Por lo tanto, el procedimiento DSP de la invención para la purificación de isoformas de eritropoyetina humana recombinante con alto contenido de glicosil- y sialil-, a partir de fluidos de cultivo celular, comprende el procedimiento de purificación siguiente:

a) una etapa de cromatografía de intercambio de aniones como una etapa de captura y una etapa de lavado ácido.

Preferentemente, el procedimiento para la purificación de isoformas de eritropoyetina humana recombinante con un alto contenido de sialil-, a partir de los fluidos de cultivo celular comprende las etapas siguientes:

a) una primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones como una etapa de captura y una etapa de lavado ácido,

b) etapas de cromatografía basadas en un principio diferente a la cromatografía de intercambio de aniones, tal como una cromatografía HIC y de afinidad.

Otro procedimiento preferente para la purificación de isoformas de eritropoyetina humana recombinante con un alto contenido de glicosil- y sialil-, a partir de los fluidos de cultivo celular, comprende las etapas siguientes:

a) una primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones como una etapa de captura,

b) etapas de cromatografía basadas en un principio diferente a la cromatografía de intercambio de aniones, tal como una purificación por cromatografía HIC y de afinidad,

c) una segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

en el que al menos una etapa de lavado ácido es combinada con la subetapa a) y/o la subetapa c).

ES 2 312 523 T3

Un procedimiento todavía más preferente para la purificación de isoformas de eritropoyetina humana recombinante con un alto contenido de glicosil- y sialil-, a partir de los fluidos de cultivo celular, comprende las etapas siguientes:

- a) una primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones como una etapa de captura y una etapa de lavado ácido opcional,
- b) HIC,
- c) cromatografía de afinidad,
- d) una segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones y una etapa de lavado ácido.

La cromatografía de interacción hidrofóbica de la etapa b) usa preferentemente una resina de cromatografía butil sefarosa. La cromatografía de afinidad de la etapa c) usa preferentemente una resina de cromatografía en hidroxipatita. El orden de las subetapas b) y c) puede ser también invertido. La elución en las subetapas a) a d) puede realizarse como elución escalonada o de gradiente, dependiendo de las circunstancias específicas.

En adelante, se describirán en detalle las diferentes etapas del procedimiento DSP.

Preparación de la muestra

Los fluidos del cultivo celular eran generalmente de fermentaciones, realizadas al valor preferente de pH de 7,2, proporcionando glicoproteína altamente sialilada, cualificadas así para el enriquecimiento adicional de la isoforma pl ácida mediante la secuencia especificada anteriormente. Una forma de realización preferente de la preparación del fluido del cultivo celular se proporciona en la sección de ejemplo.

Generalmente los fluidos del cultivo celular o generalmente las mezclas de proteínas complejas fueron concentrados mediante ultrafiltración y dialisados contra un tampón que permite la unión de la glicoproteína a la resina de intercambio de aniones.

Etapas a)

Cromatografía de intercambio de aniones como etapa de captura

Resinas

La cromatografía de intercambio de aniones como etapa de captura puede realizarse con todas las membranas o resinas de intercambio de aniones comunes disponibles comercialmente. Las resinas de intercambio de aniones pueden ser usadas en forma de columnas pre-vertidas. Alternativamente, las columnas pueden ser auto-preparadas.

No hay limitaciones específicas en relación a la capacidad y la geometría de las columnas aparte de las normales. El experto en la materia conoce que la cantidad de resina de intercambio de aniones a usar depende del contenido global de proteína del fluido del cultivo celular aplicado a la columna en la etapa de captura.

Las resinas de intercambio de aniones típicas que pueden ser usadas para el propósito de la invención comprenden grupos funcionales tales como:

- Fracciones dietilaminoetil (DEAE), las resinas incluyen por ejemplo DEAE-Sefarosa (Amersham Biosciences, Alemania), soporte Macrorep DEAE (Bio-Rad, Alemania), Fractogel EMD DEAE (Merck, Alemania) y otros
- Fracciones aminoetil cuaternario (QAE), las resinas incluyen por ejemplo Toyopearl QAE (Toyo Biosep, Alemania) y otros
- Fracciones de amoníaco cuaternario (Q), las resinas incluyen por ejemplo Q-Sefarosa XL (Amersham Biosciences, Alemania), Q-Sefarosa FF (Amersham Biosciences, Alemania), Resource Q (Amersham Biosciences, Alemania), Macro Prep. High Q (Biorad, Alemania), Toyopearl Super Q (Toyo Biosep, Alemania)
- Fracciones dimetilaminoetil (DMAE), las resinas incluyen por ejemplo Fractogel EMD DMAE (Merck AG, Alemania)
- Fracciones trimetilaminoetil (TMAE), las resinas incluyen por ejemplo Fractogel EMD TMAE (Merck AG, Alemania)
- Absorbador de membrana Sartobind (MA) Q100 (Sartorius, Alemania)

Temperatura

La captura puede realizarse normalmente entre 2°C y temperatura ambiente. Preferentemente se realiza entre 2-8°C.

Composición del tampón

Los tampones de equilibrado, lavado y elución pueden comprender todos los tipos de tampones usados normalmente para la cromatografía de intercambio de aniones (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NY). De esta manera, los agentes tamponadores comprenden fosfato de Na, acetato de Na Tris/HCl, HEPES u otros agentes tamponadores adecuados. Además los tampones pueden contener entre 5 mM y 1 M de NaCl, KCl u otras sales adecuadas, dependiendo de si el tampón es usado para el equilibrado, lavado o elución. Los tampones de equilibrado y lavado contienen concentraciones más bajas de las sales indicadas anteriormente que los tampones de elución. Los tampones pueden contener también entre 1 y 10 mM de MgCl₂ o CaCl₂. Además los tampones pueden contener entre 0,5 y 10 mM EDTA y otros inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PSMF). El pH de los tampones se ajustará normalmente a un pH entre 6,8 y 7,8, preferentemente entre 7,0 y 7,6 y más preferentemente entre 7,2 y 7,5 e incluso más preferentemente a un pH de 7,5. Para la composición de tampón de los tampones usados para las etapas de lavado ácido ver más adelante.

Preferentemente los tampones de equilibrado y lavado contienen entre 5-50 mM fosfato de Na pH 7,5 y más preferentemente 20 mM fosfato de Na pH 7,5. Los tampones de elución contienen entre 150-500 mM NaCl y 5- 50 mM fosfato de Na pH 7,5 y preferentemente 300 mM NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,5.

Procesamiento

El equilibrado de columnas es realizado normalmente con 5 a 20 volúmenes de columna (CV) del tampón de equilibrado. El lavado de las columnas tras la carga es realizado normalmente con 2 a 5 CV de tampón de lavado. La elución se realiza normalmente mediante una etapa de elución con 2 a 5 CV del tampón de elución.

El índice de fluencia de las diversas etapas depende de la geometría de las columnas y de la resina usada. Puede ser calculado según las instrucciones del fabricante o según principios generales. El índice de fluencia durante la elución es generalmente menor que el índice de fluencia durante el equilibrado, carga y lavado.

*Etapas b)**Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)*

El material eluido a partir de la etapa de captura contiene normalmente altas concentraciones de sal (entre 100 y 500 mM NaCl o KCl). Por lo tanto, una continuación útil como etapa siguiente es una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) como la primera etapa de pulido. El eluato de la etapa de captura es cargado después de que ha sido diluido, normalmente con tampón fosfato e isopropanol.

La HIC puede realizarse con todas las resinas HIC normales disponibles comercialmente. La HIC puede usarse en forma de columnas pre-vertidas. Alternativamente, las columnas pueden ser auto-preparadas.

No hay limitaciones específicas en relación a la capacidad y la geometría de las columnas aparte de las normales. El experto en la materia conoce que la cantidad de resina HIC a usar depende del contenido global de proteína de la preparación de proteína aplicada a la columna.

Resinas

Las resinas HIC que pueden ser usadas para el propósito de la invención comprenden matrices tales como butil-, fenil-, propil- u octil- sefarosa (Amersham Bioscience, Alemania), Macro-Prep metil o t-butil HIC soporte (Biorad, Alemania) o Fractogel EMD con ligandos propil o fenil (Merck AG, Alemania). El material preferente para la cromatografía de interacción hidrofóbica es butil-sefarosa.

Temperatura

La HIC puede realizarse normalmente entre 2 y 35°C. Preferentemente se realiza a 15-25°C. En el caso de la eritropoyetina la temperatura no debería ser inferior a 18°C, ya que la eritropoyetina no se une cuantitativamente a la resina HIC a temperaturas menores.

Composición del tampón

Los tampones de equilibrado, lavado y elución pueden comprender todos los tipos de tampones usados normalmente para HIC (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NY). De esta manera, los agentes tamponadores comprenden fosfato de Na, acetato de Na, Tris/HCl, HEPES u otros agentes tamponadores. Además, los tampones pueden contener entre 0,5 mM y 3 M NaCl, KCl u otras sales dependiendo de si el tampón es usado para el equilibrado, lavado o elución. Los tampones de equilibrado y lavado contienen concentraciones mayores de la sales indicadas anteriormente que los tampones de elución.

El tampón de equilibrado y el tampón de lavado contienen hasta el 30%, preferentemente hasta el 10% de un alcohol, tal como isopropanol. El tampón de elución contiene hasta el 50%, preferentemente hasta el 19% de un alcohol, tal como isopropanol.

Los tampones pueden contener también entre 1 y 10 mM de $MgCl_2$ o $CaCl_2$. Además los tampones pueden contener entre 0,5 y 10mM EDTA y otros inhibidores de proteasa, tales como fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF).

El pH de los tampones de dilución, equilibrado y lavado se ajustará normalmente a un valor de pH entre 6,8 y 7,8, preferentemente entre 7,0 y 7,7, más preferentemente entre 7,2 y 7,6 e incluso más preferentemente a un pH de 7,5. El pH del tampón de elución se ajustará normalmente a un valor de pH entre 6,5 y 7,5, preferentemente entre 6,7 y 7,2 e incluso más preferentemente a un pH de 6,9.

El tampón de dilución contiene preferentemente entre 2 y 6 M NaCl, 5-50 mM de fosfato de Na pH 7,5 y más preferentemente 4 M NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,5. Preferentemente, los tampones de equilibrado y lavado contienen entre 1-2,5 M NaCl, 5-50 mM fosfato de Na pH 7,5, 5-15% isopropanol y más preferentemente 2 M NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,5, 10% isopropanol. El tampón de elución contiene entre 0,5-1 M NaCl, 5-50 mM Tris/HCl, pH 6,9, 10-50% de isopropanol, 5-10 mM $CaCl_2$ y preferentemente 0,75 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 6,9, 19% isopropanol, 5 mM de $CaCl_2$.

Procesamiento

El equilibrado de las columnas se realiza normalmente con 5 a 15 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado. El lavado de las columnas tras la carga se realiza normalmente con entre 3 y 7 CV de tampón de lavado. La elución se realiza normalmente mediante una elución escalonada con entre 2 y 5 CV de tampón de elución.

El índice de fluencia de las diversas etapas depende de la geometría de las columnas y de la resina usada. Puede calcularse según las instrucciones del fabricante o según principios generales.

Conductividad

El ajuste de la conductividad de la carga fue identificado como crítico con el fin de no perder eritropoyetina y otras glicoproteínas en el flujo continuo. Según la invención la conductividad de la carga durante la HIC debería ser comparable a la del tampón de equilibrado. La conductividad en la carga fue ajustada típicamente a entre 95-105 mS/cm.

Temperatura y concentración de isopropanol

La formación de precipitación fue observada inmediatamente después de la elución de la resina HIC en algunos casos, quizás debido al contenido de isopropanol. Incluso si el eluato era diluido al 10% de isopropanol o menos (ver más adelante), ocurrió la precipitación.

De esta manera, en el caso de la eritropoyetina la precipitación ocurrió después de la elución de la columna butilseferosa (ver más adelante). Además, cuando el eluato fue diluido a 6,3% de isopropanol con tampón a temperatura ambiente y fue almacenado durante la noche a 4°C, la precipitación se incrementó adicionalmente. Se asume que la precipitación fue inducida por un efecto combinado de la concentración de solvente y la temperatura. La precipitación llevó a pérdidas considerables (pérdida < 30% en eritropoyetina).

Por lo tanto, según la invención, las fracciones de eluato de la etapa HIC que contienen eritropoyetina o la glicoproteína deseada deberían ser diluidas inmediatamente con tampón frío a una concentración inferior al 10%, preferentemente inferior al 7% e incluso más preferentemente inferior al 5% de isopropanol. En el caso de una dilución de eritropoyetina a una concentración de $\leq 6,3\%$ de isopropanol previene la formación de precipitado.

Etapa c)

Cromatografía de afinidad

- 5 La purificación por afinidad puede realizarse con todas las resinas de afinidad normales disponibles comercialmente que son adecuadas para la purificación de glicoproteínas. Las resinas de afinidad pueden estar diseñadas también específicamente para determinadas glicoproteínas. Las resinas de afinidad pueden ser usadas en forma de columnas pre-vertidas. Alternativamente las columnas pueden ser auto-preparadas.
- 10 No hay limitaciones específicas en relación a la capacidad y la geometría de las columnas aparte de las normales. El experto en la materia conoce que la cantidad de resina de afinidad a usar depende del contenido global de proteína de la preparación de proteína aplicada a la columna.

15 *Resinas*

- Las resinas de afinidad que pueden usarse para el propósito de la invención comprenden matrices tales como Macro-Prep (Bio-Rad, Alemania), tinta-Sefarosa (Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 151-156, 1999), resinas de afinidad por ligando peptídico (Kaufmann D.B., Biotech. Bioeng., Vol. 77, No. 3, Feb. 5, 278-288, 2002) resinas de afinidad por anticuerpos (Ben Ghanem *et al.*, Preparative Biochemistry 24 (2): 127-142, 1994), resinas de afinidad por lectina (Amersham Biosciences, Alemania).

Temperatura

- 25 La cromatografía de afinidad puede realizarse normalmente entre 2°C y la temperatura ambiente. Preferentemente se realiza a temperatura ambiente.

30 *Composición del tampón*

- Los tampones de equilibrado, lavado y elución pueden comprender todos los tipos de tampones usados normalmente para las resinas de afinidad respectivas (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NY). De esta manera, los agentes tamponadores, por ejemplo para la cromatografía de hidroxiapatita, pueden comprender fosfato de Na, acetato de Na, Tris/HCl, HEPES y otros agentes tamponadores adecuados. Además los tampones pueden contener entre 0 y 1 M de NaCl, KCl y otras sales adecuadas, dependiendo de si el tampón es usado para el equilibrado, lavado o elución. Los tampones de elución comprenderán también entre 0 y 200 mM K₂HPO₄ para formar un gradiente. El tampón de equilibrado puede contener también entre 1 y 10 mM de MgCl₂, CaCl₂. Además los tampones pueden contener entre 0,5 y 10 mM EDTA y otros inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF).

- 40 El pH de los tampones será ajustado normalmente a un pH entre 6,7 y 7,8, preferentemente entre 6,8 y 7,5, más preferentemente entre 6,8 y 7,2 e incluso más preferentemente a un pH de 6,9. Si la HIC ha precedido a la cromatografía de afinidad, el tampón de equilibrado y el primer tampón de lavado pueden comprender hasta 250 mM NaCl y hasta el 9% de isopropanol. El segundo tampón de lavado puede no contener isopropanol, NaCl y CaCl₂.

- 45 En el caso de la cromatografía de hidroxiapatita, los tampones de equilibrado y elución contienen preferentemente entre 5-50 mM de Tris/HCl pH 6,9 y más preferentemente 10-20 mM Tris/HCl pH 6,9. El tampón de equilibrado comprende también preferentemente 250 mM NaCl y 9% de isopropanol en el caso en el que la eritropoyetina es purificada y HIC ha precedido a la purificación por afinidad. Los tampones de elución contienen entre 0-150 mM K₂HPO₄ y 5-50 mM Tris/HCl pH 6,9 y preferentemente de 0 a 40 mM K₂HPO₄ y 20 a 16 mM Tris/HCl pH 6,9 para formar un gradiente.

Procesamiento

- 55 El equilibrado de las columnas se realiza normalmente con 5 a 20 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado. El lavado de las columnas después de la carga se realiza normalmente con 2 a 6 CV de tampón de lavado. Un segundo lavado con 1 a 2 y preferentemente con 1 a 1,2 volúmenes de columna de un tampón de lavado puede seguir a éste. La elución se realiza normalmente mediante una elución por gradiente con 2 a 6 CV de tampón de elución.

- 60 El índice de fluencia de las diversas etapas depende de la geometría de las columnas y de la resina usada. Puede calcularse según las instrucciones del fabricante. El índice de fluencia, durante la elución, carga y lavado es normalmente de 80 cm/h y durante el equilibrado es normalmente de 113 cm/h.

65

Etapa d)

Cromatografía de intercambio de aniones

- 5 Tal como se ha indicado anteriormente puede realizarse una segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones al final del procedimiento DSP que define la composición de la isoformas del producto final. Esta etapa incluye una etapa de lavado ácido para retirar específicamente las isoformas de EPO de pI más básico.

10 *Resinas*

En esta etapa puede realizarse una cromatografía de intercambio de aniones con todas las membranas o resinas de intercambio de aniones normales disponibles comercialmente. Las resinas de intercambio de aniones pueden ser usadas en forma de columnas pre-vertidas. Alternativamente, las columnas pueden ser auto-preparadas.

15 No hay limitaciones específicas en relación a la capacidad y la geometría de las columnas aparte de las normales. El experto en la materia conoce que la cantidad de resina de intercambio de aniones a usar depende del contenido global de proteína del preparado de proteína aplicado a la columna.

20 Generalmente todas las resinas que pueden usarse para la etapa de captura mediante cromatografía de intercambio de aniones (tales como las expuestas en la etapa A) pueden ser usadas para esta segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Debido a que una cantidad considerable de proteínas habrán sido retiradas ya en esta etapa del procedimiento DSP, pueden aplicarse resinas de intercambio de aniones que permitan específicamente una separación de proteínas de alta resolución.

25 Por lo tanto, las resinas tales como Resource Q (Amersham Biosciences, Alemania) son usadas preferentemente en esta etapa del procedimiento DSP. Por lo tanto, los índices de fluencia serán generalmente más bajos que durante la etapa de captura mediante cromatografía de intercambio de aniones (ver los ejemplos).

30 *Temperatura*

La captura puede realizarse normalmente entre 2°C y la temperatura ambiente. Preferentemente se realiza a la temperatura ambiente.

35 *Composición del tampón*

Los tampones de equilibrado, lavado y elución pueden comprender todos los tipos de tampones usados normalmente para la cromatografía de intercambio de aniones (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NY). De esta manera, los agentes tamponadores comprenden fosfato de Na, acetato de Na, Tris/HCl, HEPES o cualquier agente tamponador adecuado. Además los tampones pueden contener entre 0 y 1 M NaCl, KCl o cualquier sal adecuada, dependiendo de si el tampón es usado para el equilibrado, lavado o elución. Los tampones de equilibrado y lavado contienen concentraciones más bajas de las sales indicadas anteriormente que los tampones de elución. Los tampones 45 pueden contener también entre 1 y 10 mM MgCl₂ o CaCl₂. Además, los tampones pueden contener entre 0,5 y 10 mM EDTA y otros inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF). El pH de los tampones se ajustará normalmente a un valor de pH de entre 6,8 y 7,8, preferentemente entre 7,0 y 7,6, más preferentemente entre pH 7,2 y 7,5 e incluso más preferentemente a un valor de pH de 7,5. Para la composición de tampón de los tampones usados para las etapas de lavado ácido ver más adelante.

50 Preferentemente los tampones de equilibrado y lavado contienen entre 5-50 mM fosfato de Na pH 7,4 y más preferentemente 10 mM fosfato de Na pH 7,4. Los tampones de elución contienen entre 150-750 mM NaCl y 5-50 mM fosfato de Na pH 7,5 y preferentemente 500 mM NaCl, 15 mM fosfato de Na pH 7,4.

55 *Procesamiento*

Las columnas de equilibrado se realizan normalmente con 5 a 20 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado. El lavado de las columnas después de la carga es realizado normalmente con 5 a 15 CV de tampón de lavado. La elución es realizada normalmente bien mediante elución por gradiente o elución escalonada con 3 a 10 CV de tampón de elución.

60 El índice de fluencia de las diversas etapas depende de la geometría de las columnas y de la resina usada. Puede ser calculado según las instrucciones del fabricante. El índice de fluencia es generalmente de aproximadamente 200 cm/h durante el equilibrado, carga, lavado y elución.

Etapas de lavado ácido en la cromatografía de intercambio de aniones

Según la invención, al menos una etapa de lavado ácido debe ser realizada durante el procedimiento DSP en una de las etapas de cromatografía de intercambio de aniones. En qué etapa del procedimiento DSP debe realizarse esta etapa de lavado ácido depende de la glicoproteína purificada. Sin embargo, si una segunda etapa de cromatografía de intercambio de iones es realizada durante el procedimiento DSP, tal como es preferente para la purificación de formas de eritropoyetina altamente sialiladas, la etapa de lavado ácido es realizada preferentemente en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

Las características generales de la etapa de lavado ácido se exponen a continuación.

Una etapa de lavado ácido puede ser empleada cuando en general una glicoproteína (específicamente eritropoyetina) es unida a una matriz de intercambio de aniones, las fuerzas de unión predominantes siendo interacciones iónicas entre los grupos cargados positivamente de la matriz y los residuos de glicoproteína cargados negativamente, resultando predominantemente de los residuos de ácido siálico. Otras glicoproteínas que pueden ser purificadas mediante este enfoque comprenden t-PA, Factor XIII, Factor VIII, Interferon- β , IL-2.

Las interacciones iónicas entre la glicoproteína, por ejemplo eritropoyetina, y la matriz pueden ser moduladas mediante el pH o la fuerza iónica. Se asume que reduciendo el pH, los residuos de ácido siálico son gradualmente neutralizados por protonación, de manera que la unión de la glicoproteína, por ejemplo eritropoyetina, a la matriz se hace más débil, resultando eventualmente en la elución de la eritropoyetina de la columna. Por lo tanto, el procedimiento ácido puede ser usado para retirar las isoformas de glicoproformas con un estado de sialilación menor (isoformas de glicoproteínas básicas, por ejemplo de eritropoyetina), manteniendo de esta manera las isoformas de glicoproformas con un estado de sialilación mayor (isoformas de glicoproteínas ácidas por ejemplo de eritropoyetina). Empleando una combinación de la fuerza de la sal y el pH, el sistema puede ser modulado adicionalmente para obtener las isoformas deseadas o para retirar las isoformas no deseadas.

De esta manera, era un objeto de la invención identificar las condiciones de lavado ácido (fuerza iónica y pH) que permitan eluir selectivamente isoformas de glicoproteínas básicas (por ejemplo eritropoyetina) y las impurezas no relacionadas, manteniendo al mismo tiempo las isoformas de glicoproteínas ácidas (por ejemplo eritropoyetina) cuantitativamente preferentes. Según la invención, el procedimiento DSP incluye de esta manera al menos una etapa de lavado ácido en una de las etapas de cromatografía de intercambio de aniones.

De esta manera, según la invención, las etapas de lavado ácido pueden realizarse en la etapa a) o la etapa d) sólo si el procedimiento DSP comprende dos etapas de cromatografía de intercambio de aniones. En otra forma de realización de la invención, las etapas de lavado ácido pueden realizarse en la etapa a) y la etapa d) si el procedimiento DSP comprende dos etapas de cromatografía de intercambio de aniones.

De esta manera, la posición de la etapa de lavado ácido no está restringida a ninguna de las 2 posiciones de la etapa de intercambio de iones. Sin embargo, para la purificación de glicoproteínas específicas tales como la eritropoyetina, puede ser preferente que se realice una sola etapa de lavado ácido en la etapa d) del procedimiento DSP. El uso de al menos una etapa de lavado ácido en conexión con el uso repetido del mismo principio de cromatografía de columna (intercambio de aniones) es particularmente adecuado para incrementar la selectividad de separación de las moléculas relacionadas de manera cercana que se diferencian por sutiles diferencias de carga.

Si se realiza un lavado ácido en la primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones en la etapa a) (etapa de captura), ésta puede servir i) para retirar principalmente las impurezas no relacionadas de los fluidos del cultivo celular y ii) para retirar algunas isoformas de glicoproteínas básicas (por ejemplo, eritropoyetina).

La etapa de lavado ácido en la etapa d) (segunda cromatografía de intercambio de aniones) sirve para retirar específicamente de manera selectiva las isoformas de glicoproteínas básicas (por ejemplo, eritropoyetina).

Las ventajas y características del procedimiento de lavado ácido según la invención son las siguientes:

- las etapas de lavado ácido demasiado fuertes tanto en la etapa a) como en la etapa d) causarán pérdidas de producto inaceptables;
- un único lavado ácido en la etapa d) con una fuerza intermedia proporciona un perfil de isoformas de glicoproformas con un enriquecimiento favorable de isoformas pI ácidas; y
- una etapa de lavado ácido suave adicional en la etapa a) proporcionará un conjunto de isoformas de glicoproteínas que tiene un menor contenido de isoformas de glicoproteínas básicas y proteínas básicas contaminantes no relacionadas. Este conjunto pre-purificado de glicoproteínas está cualificado para una purificación adicional para una retirada selectiva adicional de isoformas básicas, empleando un segundo lavado ácido. Esta combinación proporciona un fuerte enriquecimiento de las isoformas pI ácidas.

ES 2 312 523 T3

Etapas de lavado ácido en la etapa de captura de intercambio de aniones

Los tampones para el lavado ácido pueden contener fosfato de Na, acetato de Na, citrato de Na, MES u otros agentes tamponadores adecuados. Los tampones preferentes para la etapa de lavado ácido en la etapa de captura comprenden normalmente entre 5 y 50 mM, preferentemente entre 10 y 40 mM e incluso más preferentemente entre 20 y 35 mM acetato de Na.

Los tampones pueden comprender también entre 1 y 10 mM $MgCl_2$ o $CaCl_2$. Además los tampones pueden comprender entre 0,5 y 5 mM EDTA y otros inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF).

El pH de los tampones para el lavado ácido será ajustado normalmente a un pH entre 2,0 y 5,5, preferentemente entre 2,5 y 4,5 e incluso más preferentemente entre 3,0 y 4,0 dependiendo del agente tamponador usado y de la glicoproteína a purificar.

Debido a que la fuerza iónica del tampón también tiene influencia sobre la selectividad de la etapa de lavado ácido, los tampones que contienen acetato de Na son preferentes.

Preferentemente, los tampones de lavado ácido contienen entre 20 y 40 mM acetato de Na pH 3,0-4,0 y más preferentemente 33 mM acetato de Na pH 4,0.

Etapas de lavado ácido en la segunda etapa de intercambio de aniones

Una etapa de lavado ácido en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones es realizada generalmente con tampones de una composición igual o parecida a los tampones usados para las etapas de lavado ácido en la etapa de captura.

Los tampones preferentes en esta segunda etapa de intercambio de iones contienen entre 5 y 30 mM acetato de Na pH 3,0-4,0 y más preferentemente 20 mM acetato de Na pH 4,0.

Ejemplos

Más adelante, se proporcionan ejemplos que ilustran las formas de realización preferentes de la invención para la purificación y enriquecimiento de isoformas de eritropoyetina altamente glicosiladas y sialiladas. Los ejemplos no deberían ser interpretados como restrictivos de la invención.

Sistema de expresión para la producción de eritropoyetina

La eritropoyetina fue expresada con una suspensión de línea celular de Ovario de Hámster Chino (DHFR) (CHO, Puck *et al.*, (1958) J. Exp. Med. 108: 945; Urlaub *et al.* (1980) PNAS USA 77: 4216-4220). La línea celular del huésped negativo de dihidrofolato reductasa (DHFR) fue adaptada para el crecimiento en un medio libre de proteína. El gen eritropoyetina fue subclonado en un vector portador del gen DHFR bajo el control de un fuerte promotor de citomegalovirus. Las células transfectadas fueron seleccionadas y el gen eritropoyetina fue amplificado en presencia de metotrexato. Después de dos rondas de clonación celular, los clones fueron seleccionados para un buen crecimiento, una alta titración de producto y producción de eritropoyetina con un patrón de glicosilación favorable. Los patrones de glicosilación de las líneas celulares de eritropoyetina recombinante fueron determinados mediante el mapeado de oligosacáridos N-ligados con HPAD (Hermentin *et al.* (1996) Glycobiology, 6 (2): 217-30) y HPLC (Kanazawa (1999) Biol. Pharm. Bull 22 (4) 339-346).

El clon, que fue seleccionado para estudios adicionales, creció (en lote) en un tiempo de duplicación de aproximadamente 22 horas y produjo aproximadamente 45 mg/l de eritropoyetina a una densidad celular de 2×10^6 células/ml con una glicooestructura altamente antenaria.

Condiciones de cultivo

Las células CHO recombinantes que producían eritropoyetina fueron cultivadas a la escala de 2 litros y a la escala de 20 litros en procedimientos a) discontinuos, b) discontinuos repetidos y c) semicontínuos repetidos. Los fermentadores fueron inoculados a una densidad celular de aproximadamente 2×10^5 células por ml. En los cultivos discontinuos, las células fueron cultivadas en la fase de meseta y fueron cosechadas a aproximadamente 2×10^6 células por ml (concentración de producto de aproximadamente 45 mg/l).

En un procedimiento discontinuo repetido, la células fueron cultivadas a aproximadamente $1,5-2 \times 10^6$ células por ml (concentración de producto de aproximadamente 20 mg/ml) y el cultivo fue dividido a aproximadamente 2×10^5 células por ml retirando una parte del cultivo y remplazando el volumen de cultivo retirado con medio fresco para iniciar el ciclo de producción subsiguiente. El cultivo retirado que contenía el producto fue purificado.

ES 2 312 523 T3

En el procedimiento semicontinuo repetido, el tiempo de cultivo de los ciclos individuales del cultivo discontinuo repetido podría extenderse 1 día suministrando un concentrado de nutrientes al cultivo. La cosecha fue realizada 4 días después del inicio a aproximadamente $2\text{-}3 \times 10^6$ células por ml (la productividad de producto era de aproximadamente 30-40 mg/l). Otros procedimientos (por ejemplo, cultivo continuo o en perfusión) son alternativas viables.

El medio para la fermentación era un medio libre de proteína, usado típicamente para el cultivo de células CHO, que fue suplementado con 2 mM glutamina, 0,1% F68 Plurónico (Sigma, Alemania) y 2 ppm antiespuma C (Sigma, Alemania). Las temperaturas eran de entre 34°C y 37°C, preferentemente de 37°C. El pH se encontraba entre un pH de 7,2 y un pH de 7,5, preferentemente era un pH de 7,2. Durante el cultivo, se realizó la corrección del pH en el medio tamponado de bicarbonato mediante la inyección de CO₂ o adición de NaOH. La concentración de oxígeno fue controlada a un 40% de saturación de aire mediante la aspersión del cultivo con aire, nitrógeno y oxígeno.

Las cosechas de cultivo fueron depuradas de la mayoría de las células (98%) mediante una centrifugación continua con un dispositivo Biofuge 17RS (a aproximadamente 3540 x g). Las células restantes y los desechos fueron separados mediante filtración con un dispositivo Sartocoon II (Sartorius, Alemania) y un módulo de filtración 0,2 µm de acetato de celulosa 0,6 m² (Nr. 3021230706W, Sartorius, Alemania).

El filtrado fue concentrado mediante ultrafiltración y la conductividad fue ajustada por debajo de 5 mS a aproximadamente 4 mS. La cosecha fue concentrada a entre 6 y 9 veces y fue diafiltrada con 20 mM fosfato de Na, pH 7,5. El volumen resultante era de entre 2,2 y 3,3 litros.

Después de que la cosecha fue concentrada mediante ultrafiltración y fue dializada, la EPO fue purificada mediante la secuencia de etapas de cromatografía siguiente.

Por supuesto, pueden usarse también otras líneas celulares y clones productores de EPO, por ejemplo tal como se expone en EP-A-0 148 605 y EP-A-0 205 564. Lo mismo se aplica a las condiciones de cultivo, también aquí varios protocolos y condiciones se han descrito en la literatura de patentes así como en la literatura científica.

Etapas a)

Cromatografía de intercambio de aniones como etapa de captura

200 ml de resina Q Sefarosa XL (Amersham Biosciences, Alemania) fueron empaquetados en una columna XK50 (Amersham Biosciences, Alemania). La captura fue realizada a 2-8°C.

Se usaron los tampones siguientes:

tampón A: 20 mM fosfato de Na pH 7,5

tampón B: 300 mM NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,5

El procesamiento de esta etapa de cromatografía fue realizado como se indica a continuación:

Equilibrado de la columna con 10 CV de tampón A a 70 ml/min (220 cm/h)

Carga de la muestra a 70 ml/min (220 cm/h)

Etapas de lavado con tampón A con 2 CV a 70 ml/min (220 cm/h)

Elución con gradiente escalonado: 100% tampón B a 25 ml/min (80 cm/h) (Pico E1 de la Figura 3)

Los resultados se proporcionan en la Tabla 1.

ES 2 312 523 T3

TABLA 1

Resultado de la etapa de captura. Para el perfil de elución, ver la Figura 3

	Nombre de muestra	Volumen [L]	EPO [mg/l]	EPO [mg]	% de Producción
Etapa 1 (Inicio)					
Material de inicio:	A	3,14	110,48	346,9	
Etapa 2 (Carga)					
Flujo continuo	D	3,1	6,86	21,26	6
Lavado	W	0,5	9,27	4,63	1,3
Etapa 3 (Elución)					
Pico	E1	0,250	1097,1	274,2	79
	E2	0,090	15,90	1,43	0,4
Etapa 4 (Lavado)					
Pico	E3	0,180	1,64	0,29	0,1
Total eluido				301,81	87

Etapa b)

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

400 ml de Butil-Sefarosa FF (Amersham Biosciences, Alemania) fueron empaquetado en una columna XK-50 (Amersham Biosciences, Alemania). La purificación fue realizada a temperatura ambiente.

Se usaron los tampones siguientes:

tampón A: 4 M NaCl, 20mM fosfato de Na pH 7,5

tampón B: 5 mM CaCl₂, 20 mM Tris HCl pH 6,9

tampón C: 2 M NaCl, 10% Isopropanol, 20 mM fosfato de Na pH 7,5

tampón D: 0,75 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM Tris HCl pH 6,9

tampón E: 0,75 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 50% isopropanol, 20 mM Tris HCl pH 6,9

El procesamiento de esta etapa de cromatografía fue realizado como se indica a continuación:

El eluato capturado de la etapa a) fue diluido con 85% (v/v) de tampón A. Se añadió 10% isopropanol (v/v) para establecer una condiciones del tampón comparables al tampón C. La conductividad era de entre 95 y 105 mS/cm.

Equilibrado: 10 CV de tampón C a 25 ml/min (80 cm/h)

Carga: a 25 ml/min (80 cm/h)

ES 2 312 523 T3

Lavado: 3 CV de tampón C a 25 ml/min

Elución (gradiente escalonado): 3 CV de 38% de tampón E y 62% de tampón D a 25 ml/min (80 cm/h)

El pico E1 (ver Figura 4) fue recogido en 2,5 CV (1000 ml) de tampón B helado y fue procesado inmediatamente en la columna de afinidad de hidroxiapatita.

Los resultados de esta etapa se proporcionan en la Tabla 2.

TABLA 2

Resultados de la etapa HIC. Para el perfil de elución ver la Figura 4

	Nombre de muestra	Volumen [L]	EPO [mg/l]	EPO [mg]	% de Producción
Etapa 1 (Inicio)					
Material de inicio:	A	0,509	453,1	230,6	
Etapa 2 (Carga)					
Flujo continuo	D	0,510	2,49	1,26	
Lavado	W	2,000	0,58	1,16	
Etapa 3 (Elución)					
Pico	E1	1,875	111,5	209,06	90
Etapa 4 (Lavado)					
Pico	E2	0,250	195,8	48,95	21
Total eluido				260,43	111

Etapa c)

Cromatografía de afinidad con HAP

135 ml de Macro-Prep (Ceramic), Tipo I, 40 μ m (BioRad, Alemania) fueron empaquetados en un XK 26/40 (Amersham Biosciences, Alemania). El procedimiento fue realizado a temperatura ambiente.

Se usaron los tampones siguientes:

tampón A: 0,25 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 9% isopropanol, 20 mM Tris pH 6,9

tampón B: 20 mM Tris HCl pH 6,9

tampón D: 100 mM K₂HPO₄, 10 mM Tris, pH 6,9

ES 2 312 523 T3

El procesamiento de esta etapa de cromatografía fue realizado como se indica a continuación:

Equilibrado: 11,5 CV de tampón A a 10 ml/min (113 cm/h)

Carga: a 7 ml/min (80 cm/h)

Etapa de lavado 1: 5,75 CV de tampón A a 7 ml/min (80 cm/h)

Etapa de lavado 2: 1,15 CV de tampón B a 7 ml/min (80 cm/h)

Elución: tampón B, D: gradiente de 0% a 40% de tampón D en 4,6 CV a 7 ml/min

Resultados: la eritropoyetina se eluye en un pico (Figura 5), que fue procesada adicionalmente en una segunda columna de intercambio de aniones.

Los resultados de esta etapa se proporcionan en la Tabla 3:

TABLA 3

Resultados de la etapa HAP. Para el perfil de elución ver la Figura 5

	Nombre de muestra	Volumen [L]	EPO [mg/l]	EPO [mg]	% de Producción
Etapa 1 (Inicio)					
Material de inicio:	A	1,79	111,5	199,6	
Etapa 2 (Carga/Lavado)					
Flujo continuo	D	1,80	0,85	1,53	1
	W1	0,75	0,91	0,68	0,5
	W2	0,15	0,51	0,08	0,05
Etapa 3 (Elución)					
Pico	E1	0,200	745,9	149,2	75
Total:				151	77

Etapa d)

Cromatografía de intercambio de aniones

Esta etapa fue realizada con un Resource Q 1 ml pre-empaquetado (1 ml Source 15Q, Amersham Biosciences, Alemania). El recorrido de la columna fue realizado a temperatura ambiente. Alternativamente, se usó una membrana de intercambio de iones (Sartobind Membraneadsorber (MA) Q100 (Sartorius, Alemania).

Se usaron los tampones siguientes:

tampón A: 10 mM fosfato de Na pH 7,4

tampón B: 1 M NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,4

tampón C: 20 mM acetato de Na pH 4,0

ES 2 312 523 T3

El procesamiento de esta etapa de cromatografía fue realizado como se indica a continuación:

Equilibrado: 10 CV de tampón A a 1 ml/min
 Carga: a 1 ml/min (186 cm/h)
 Lavado: 10 CV de tampón A a 1 ml/min
 Lavado ácido: 2 CV de tampón C a 1 ml/min
 Lavado: 10 CV de tampón A a 1 ml/min
 Elución-escalonada: 1 CV 50% de tampón B a 1 ml/min

Los resultados se proporcionan en la Tabla 4:

TABLA 4

Resultados de la segunda etapa de intercambio de aniones. Para el perfil de elución ver la Figura 6

	Nombre de muestra	Volumen [L]	EPO [mg/l]	EPO [mg]	% de Producción
Etapa 1 (Inicio)					
Material de inicio:	Conjunto 1	0,0067	854,07	5,72	
Etapa 2 (Carga)					
Flujo continuo	D	0,007	0,48	0,003	0
Etapa 3 (Lavado ácido)					
Pico	AW	0,0035	191,24	0,67	11
Etapa 4 (Elución)					
Pico	E	0,0055	670,6	3,68	64
Total eluído				4,35	74

A continuación, el pico E1 de la Figura 6 fue analizado mediante electroforesis en gel SDS-PAGE y la tinción Coomassie subsiguiente. Tal como puede observarse en la Figura 6, la eritropoyetina fue eluída en una única etapa a alta pureza, comparable a la del estándar Ph. Eur. BRP.

A continuación se analizó el pico E1 de la Figura 6 con respecto a su contenido de isoformas mediante IEF (se realizó una electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico en un gel prefabricado (Amersham Biosciences) usando el sistema Phast (Amersham Biosciences) y aplicando un gradiente de pH de 3,5 a 6,5) (Figura 8). Las isoformas de EPO fueron visualizadas bien mediante transferencia Western o tinción con plata. El lavado ácido llevó a una reducción de las isoformas pI básicas, que produjo un perfil de isoformas muy parecido al del estándar Ph. Eur. BRP (Figura 8).

Esto fue confirmado adicionalmente por un análisis HPLC DEAE de oligo-azúcares AB (2-aminobenzamida) etiquetados nativo (Figura 9) y neutral (Figura 10), que fueron liberados de la eritropoyetina purificada (Kanazawa (1999) Biol. Pharm. Bull 22 (4) 339-346).

ES 2 312 523 T3

En otra forma de realización de la invención, el procedimiento DSP, tal como se ha ejemplificado para la purificación de la eritropoyetina puede comprender una etapa de lavado ácido en la primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Esto se ejemplifica como se indica a continuación.

Etapa a)

Cromatografía de intercambio de aniones como etapa de captura con una etapa de lavado ácido

Los extractos del cultivo fueron preparados como se ha detallado anteriormente. El mismo volumen fue aplicado a la columna de intercambio de aniones.

170 ml de resina Q sefarosa XL (Amersham Bioscience, Alemania) fueron empaquetados en una columna XK50 (Amersham Biosciences, Alemania). La captura fue realizada a temperatura ambiente.

Se usaron los tampones siguientes:

tampón A1: 20 mM fosfato de Na pH 7,5

tampón A2: 33 mM acetato de Na pH 4,0

tampón B: 300 mM NaCl, 20 mM fosfato de Na pH 7,5

El procesamiento de esta etapa de cromatografía fue realizado como se indica a continuación:

Equilibrado de la columna con 5 CV de tampón A1 a 25 ml/min (80 cm/h)

Carga de la muestra a 25 ml/min (80 cm/h)

Etapa de lavado con tampón A1 con 2 CV a 25 ml/min (80 cm/h)

Etapa de lavado con tampón A2 con 3 CV a 25 ml/min (80 cm/h)

Elución con gradiente escalonado con tampón B a 25 ml/min (80 cm/h)

La etapa de elución resultó en 2 picos (E2 y E3). Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

TABLA 5

Datos de la etapa de captura con una etapa de lavado ácido

Recorrido 1,21	Volumen [ml]	Conc. de eritropoyetina [mg/l]	Total de eritropoyetina [mg]	% de Producción
Carga	760	81,8	62,2	100
Flujo continuo	800	1	0,8	1,3
Lavado ácido: Pico E1	100	55,6	5,6	9
Pico Elución E2	59	648,9	38,3	61,6
Pico Elución E3	35	40,5	1,4	2,2
Total eluído				74,1

Tal como puede observarse a partir de la Figura 11, la etapa de lavado ácido con 33 mM acetato de Na pH 4,0 lleva a la pérdida de cierto material (E1). Ello permite, sin embargo, la discriminación de las isoformas de eritropoyetina (E2 y E3), que se parecen a la del estándar (Std) Ph. Eur. BRP y las isoformas de eritropoyetina más básicas (E1). Esto proporciona un ajuste del perfil de isoformas de eritropoyetina al del estándar BRP ya en la etapa de captura.

También se ensayó qué condiciones de tampón de sal son óptimas si se realiza una etapa de lavado ácido en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones.

Optimización de la etapa de lavado ácido en la segunda etapa de intercambio de aniones

Para optimizar las condiciones del tampón de la etapa de lavado ácido en la segunda columna de cromatografía de intercambio de aniones, los tampones fueron preparados de manera que contenían 5, 10 ó 20 mM acetato de Na pH 4,0. La etapa de purificación fue realizada tal como se ha descrito anteriormente para la etapa d). Después los eluatos fueron analizados con respecto a sus contenidos de isoformas de eritropoyetina mediante IEF (Figura 12).

Las concentraciones en el intervalo de 5 mM, 10 mM y 20 mM de acetato de Na pH 4,0 produjeron material creciente en el lavado ácido (1%, 6,3% y 10%) y un desplazamiento hacia un perfil de isoformas más ácidas de la eritropoyetina eluída. Tal como se muestra en la Figura 12, a un lavado de 20 mM acetato de Na pH 4,0, el perfil de isoformas de eritropoyetina se parece mucho al del estándar Ph. Eur. BRP. Por lo tanto, esta concentración es preferente para la purificación de formas de EPO altamente sialiladas.

La eritropoyetina, que fue expuesta a una etapa de lavado ácido en la captura, fue procesada a través de un protocolo de purificación de 4 etapas con o sin una segunda etapa de lavado ácido en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones. Las isoformas aisladas mediante la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones fueron analizadas mediante IEF seguido por transferencia Western (ver Figura 13). La secuencia de purificación fue por otra parte idéntica al procedimiento descrito anteriormente.

La Figura 13 muestra que las isoformas de eritropoyetina purificadas sin una etapa de lavado ácido adicional en la segunda etapa de intercambio de aniones contienen la mayoría de las bandas de isoformas tal como el estándar Ph. Eur. BRP de eritropoyetina (Figura 13A). Pudo demostrarse además que una segunda etapa de lavado ácido lleva a un enriquecimiento selectivo de isoformas más ácidas, representadas por las isoformas 3-4 más ácidas (Figura 13B). El segundo lavado ácido retira la mayoría de las isoformas de eritropoyetina básicas restantes.

De esta manera, se ha demostrado que un procedimiento de lavado ácido de 2 etapas es otro medio mediante el cual puede conseguirse un enriquecimiento relativamente fuerte de isoformas ácidas.

De esta manera, la presente invención permite la purificación de una glicoproteína con una composición de isoformas específica, rica en isoformas pI ácidas. Esto se consigue combinando condiciones de cultivo celular favorables y nuevas técnicas de purificación. En base a un clon celular, que fue seleccionado para la productividad de producto altamente sialilado, i) las condiciones de cultivo para la producción de isoformas altamente sialiladas fueron identificadas como óptimas en el intervalo de pH 7,2 a pH 7,5 e ii) se descubrió que al menos una etapa de lavado ácido en una de las etapas de intercambio de aniones durante la purificación proporciona medidas para el enriquecimiento selectivo adicional de las isoformas más ácidas.

Leyendas de las figuras

Figura 1:

Distribución de isoformas del estándar Ph. Eur. BRP y eritropoyetina, que fue producida mediante los cultivos CHO a pH 6,9, pH 7,2 y pH 7,5. La eritropoyetina fue purificada según un protocolo de purificación de 2 etapas (captura con Q-sefarosa XL y elución con sal escalonada seguida por una etapa de HIC con butil-sefarosa FF tal como se ha expuesto en los ejemplos) y fue analizada mediante electroforesis capilar (CE). Los números de pico más bajos presentan las isoformas básicas, los números de pico más altos presentan las isoformas de pI ácido. El cultivo a pH alto proporciona un mayor grado de isoformas ácidas de eritropoyetina. Los números de pico corresponden a la anotación de la Ph. Eur.

Figura 2:

Los cultivos CHO, que producen eritropoyetina, fueron cultivados a pH 6,9, pH 7,2 y pH 7,5. Las células crecían mejor a un pH bajo (pH 6,9) y presentaron la mejor productividad a mayor pH (pH 7,5). El perfil de glicofomas era mejor a pH mayor (pH 7,2 y pH 7,5, ver Figura 1). Las condiciones de cultivo de pH 7,2 proporcionan buen crecimiento celular, alta sialilación de producto y buena producción final de producto.

ES 2 312 523 T3

Figura 3:

Perfil de elución de la etapa a) de la secuencia de purificación. El pico E1 fue recogido, el pico E2 fue registrado durante el lavado.

Figura 4:

Perfil de elución de la etapa b) de la secuencia de purificación. El pico E1 fue recogido, el pico E2 fue registrado durante el lavado.

Figura 5:

Perfil de elución de la etapa c) de la secuencia de purificación. El pico de elución fue recogido tal como se indica mediante la flecha.

Figura 6:

Perfil de elución de la etapa d) del procedimiento de purificación. El pico E1 fue recogido tal como se indica mediante la flecha.

Figura 7:

El análisis de tinción de gel SDS-PAGE con azul Coomassie muestra una pureza comparable entre la eritropoyetina después de la etapa d) (línea 1) y el estándar Ph. Eur. BRP (línea 2). La línea 3 es un marcador.

Figura 8:

Enfoque isoeléctrico del estándar Ph. Eur. BRP (línea 1), la eritropoyetina eluída purificada de la etapa d) (línea 2) y la carga (línea 3) de esta etapa de cromatografía. La detección se consiguió mediante transferencia Western (panel izquierdo) y tinción de plata (panel derecho). Las isoformas pI más básicas en la carga (línea 3) fueron significativamente retiradas por el lavado ácido. Esto proporciona un producto (línea 2) con un perfil de isoformas muy parecido al del estándar Ph. Eur. BRP (Línea 1).

Figura 9

La comparación de imagen especular de los oligo-azúcares de la eritropoyetina nativa liberados de la eritropoyetina purificada después de la etapa d) y los liberados del estándar Ph. Eur. BRP. Los oligos fueron etiquetados AB y separados mediante HPLC en una columna DEAE. Un lavado ácido en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones produjo una distribución de oligosacáridos de la muestra, que se compara con la del estándar Ph. Eur. BRP (STD).

Figura 10:

Comparación de imagen especular de los oligo-azúcares de la eritropoyetina neutral liberados de la eritropoyetina purificada después de la etapa d) y los liberados del estándar Ph. Eur. BRP. El lavado ácido en la segunda captura produce un perfil de distribución de oligosacáridos neutrales, que tiene un gran parecido con el del estándar Ph. Eur. BRP (STD).

Figura 11:

La composición de isoformas de eritropoyetina en la fracción de lavado ácido (E1) y los picos de elución (E2 y E3) en la etapa de captura fueron analizados mediante IEF. Las isoformas de proteína fueron visualizadas mediante transferencia Western. El lavado ácido con 33 mM acetato de Na, pH 4,0 permite discriminar las isoformas de eritropoyetina, que se parecen a las del estándar Ph. Eur. BRP (Std) y las isoformas más básicas. Esto produce un ajuste del perfil de isoformas de eritropoyetina al del estándar BRP ya en la etapa de captura.

Figura 12:

Análisis de la carga de la segunda columna de intercambio de aniones (línea 4) y de las eluciones después de los lavados ácidos con 20 mM (línea 3), 5 mM (línea 2) y 10 mM (línea 1) acetato de Na pH 4,0 con respecto a la distribución de isoformas mediante IEF. Las isoformas de proteína fueron visualizadas mediante transferencia Western (panel izquierdo) o tinción de plata (panel derecho). Después de un lavado ácido en la segunda etapa de intercambio de aniones, los eluatos contenían considerablemente menos isoformas pl básicas comparado con la carga (línea 4). El tampón con 20 mM de acetato de Na pH 4,0 produjo la reducción más fuerte. El perfil de isoformas es comparable al del estándar BRP (STD).

Figura 13:

Análisis de las isoformas de eritropoyetina en el eluato de la segunda etapa de intercambio de aniones, tal como es analizado mediante IEF. Las proteínas fueron visualizadas mediante transferencia Western. A) Purificación sin una etapa de lavado ácido después de la segunda columna de intercambio de iones. B) Purificación con una etapa de lavado ácido adicional después de la segunda columna de intercambio de iones. El eluato fue recogido en 5 fracciones (F1 a F5). Se había realizado un lavado ácido en A) y B) en la primera etapa de captura mediante cromatografía de intercambio de aniones.

El producto sin un segundo lavado ácido (A) contiene la mayoría de las isoformas del estándar Ph. Eur. Standard (Estándar). El producto con un segundo lavado ácido (B) está enriquecido selectivamente en las isoformas pl más ácidas, representadas por las isoformas 3-4 más ácidas.

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citadas por el solicitante se proporciona solamente para conveniencia del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado durante la recopilación de las referencias, no deben excluirse la posibilidad de que se hayan producido errores u omisiones y a este respecto la OEP se exime de toda responsabilidad.

Documentos de patente citadas en la descripción

- WO 8801643 A [0012]
- US 5096816 A [0012][0013]
- WO 18607594 A [0022]
- WO 9635718 A1 [0023]
- EP 0148605 A [0114]
- EP 0205564 A [0114]

Documentos (no patentes) citados en la descripción

- IMAI *et al. Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 194, 457-462 [0007]
- RUSH *et al. Anal. Chem.*, 1995, vol. 67, 1442-1452 [0007]
- FUKUDA *et al. Blood*, 1989, vol. 73, 84-89 [0007]
- HOGANS. *Blood*, 1989, vol. 73, 90-99 [0007]
- EAGLE. *J. Cell Physiol.*, 1973, vol. 82, 1-89 [0011]
- GOKANA *et al. J. Chromatogr.*, 1997, vol. 791 (1-2), 109-18 [0021]
- INOUE N *et al. Biol. & Pharm. Bulletin*, 1994, vol. 17 (2), 180-184 [0024]
- DEUTSCHER. *Protein Purification. Academic Press*, 1990 [0048] [0083]
- *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, vol. 29, 151-156 [0070]
- KAUFMANN D.B. *Biotech. Bioeng.*, 2002, vol. 77 (3), 278-288 [0070]

ES 2 312 523 T3

• **BEN GHANEM** *et al. Preparative Biochemistry*, 1994, vol. 24 (2), 127-142 [0070]

• **PUCK** *et al. J. Exp. Med.*, 1958, vol. 108, 945 [0105]

5 • **URLAUB** *et al. PNAS USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0105]

• **HERMENTIN** *et al. Glycobiology*, 1996, vol. 6 (2), 217-30 [0105]

10 • **KANAZAWA**, *Biol. Pharm. Bull.*, 1999, vol. 22 (4), 339-346 [0105] [0136]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar isoformas ácidas de eritropoyetina a partir de una mezcla de proteínas compleja, **caracterizado** porque el procedimiento comprende dos etapas de cromatografía de intercambio de aniones, que están separadas por etapas de cromatografía basadas en un principio diferente al de la cromatografía de intercambio de aniones y al menos una etapa de lavado ácido en una de las etapas de intercambio de aniones.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) una primera etapa de cromatografía de intercambio de aniones como una etapa de captura y una etapa de lavado ácido opcional,
- b) cromatografía de interacción hidrofóbica,
- c) cromatografía de afinidad,
- d) una segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones y una etapa de lavado ácido.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 **caracterizado** porque

la elución en las subetapas a) a d) es realizada mediante una elución escalonada o por gradiente.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 2 ó 3 **caracterizado** porque

las subetapas a) y d) se realizan con membranas o resinas de intercambio de aniones que contienen grupos dietilaminoetil (DEAE), grupos aminoetil cuaternario (QAE), grupos amoníaco cuaternario (Q), grupos dimetilaminoetil (DMAE) y/o grupos trimetilaminoetil (TMAE) como grupos funcionales.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque

la subetapa a) se realiza con una resina Q-Sefarosa XL disponible comercialmente.

6. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque

la subetapa d) se realiza con una resina Resource Q disponible comercialmente.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 2 ó 3 **caracterizado** porque

la subetapa b) se realiza con resinas que contienen grupos butil-, fenil-, propil- y/o octil- como grupos funcionales.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque

la subetapa b) se realiza con una resina Butil-Sefarosa FF disponible comercialmente.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 2 ó 3 **caracterizado** porque

la subetapa c) se realiza con resinas de afinidad tales como hidroxiapatita, Ni-NTA, Talon, resinas de cromatografía de tinción tales como Dye- o Blue-Sefarosa, resinas de afinidad por anticuerpos, resinas de afinidad por lectina y/o resinas de afinidad por ligandos peptídicos.

10. Procedimiento según la reivindicación 9 **caracterizado** porque

la subetapa c) se realiza con una resina hidroxiapatita Macro-Prep de tipo I disponible comercialmente.

ES 2 312 523 T3

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 **caracterizado** porque

el tampón para la etapa de lavado ácido tiene un pH de entre 2,0 y 5,0, preferentemente entre 2,5 y 4,5 y más preferentemente entre 3,0 y 4,0.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque

el tampón para la etapa de lavado ácido contiene acetato de Na, citrato de Na, HEPES, PIPES, MES y/o MOPS como agentes tamponadores.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 **caracterizado** porque

el tampón para la etapa de lavado ácido en la etapa de captura contiene entre 5 y 50 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0, preferentemente entre 10 y 40 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0, incluso más preferentemente entre 15 y 35 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0 y más preferentemente 33 mM acetato de Na con un pH de 4,0.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 **caracterizado** porque

el tampón para la etapa de lavado ácido en la segunda etapa de cromatografía de intercambio de aniones contiene entre 5 y 50 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0, preferentemente entre 10 y 40 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0, incluso más preferentemente entre 15 y 30 mM acetato de Na con un pH entre 3,0 y 4,0 y más preferentemente 20 mM acetato de Na pH 4,0.

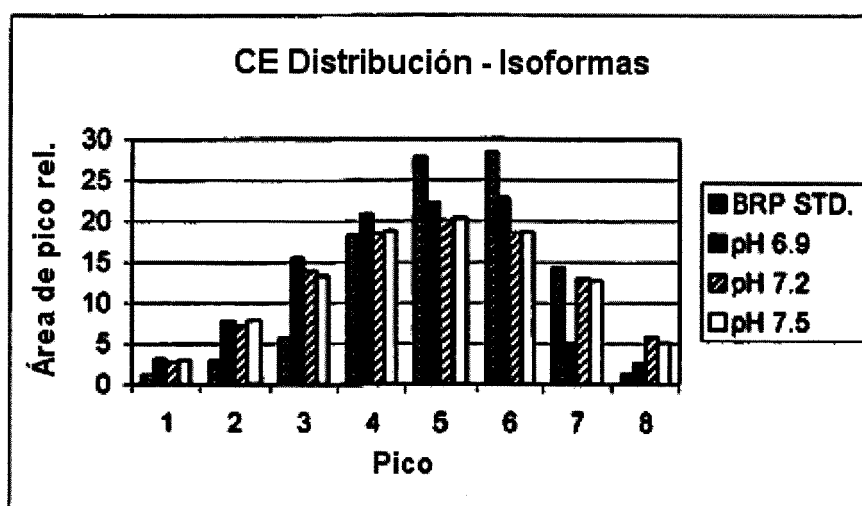
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 **caracterizado** porque la eritropoyetina es eritropoyetina humana recombinante.

16. Isoformas ácidas de eritropoyetina purificadas mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

17. Isoformas ácidas de eritropoyetina según la reivindicación 16 en las que la eritropoyetina es eritropoyetina humana recombinante.

Figura 1

A)



B)

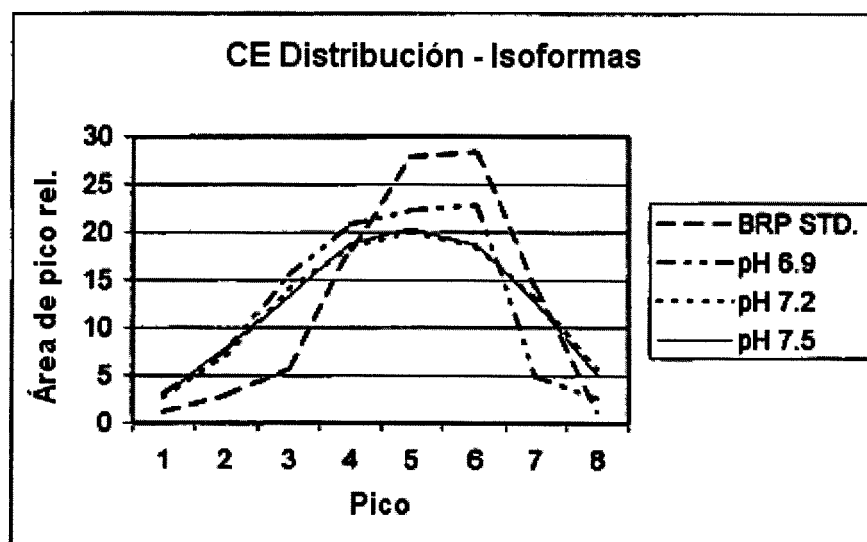
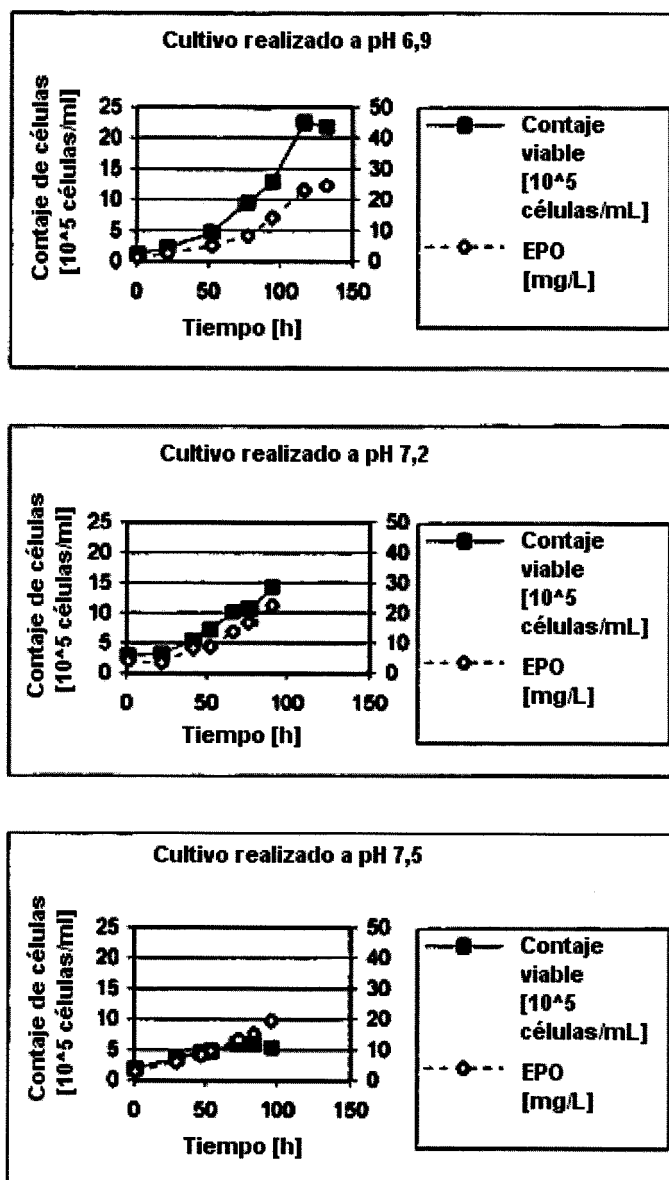


Figura 2



pH del Cultivo	Tasa de Crecimiento [h ⁻¹]	Productividad Celular [μg·c ⁻¹ ·h ⁻¹]
6.9	0.026	2.72E-07
7.2	0.018	2.67E-07
7.5	0.014	4.03E-07

Figura 3

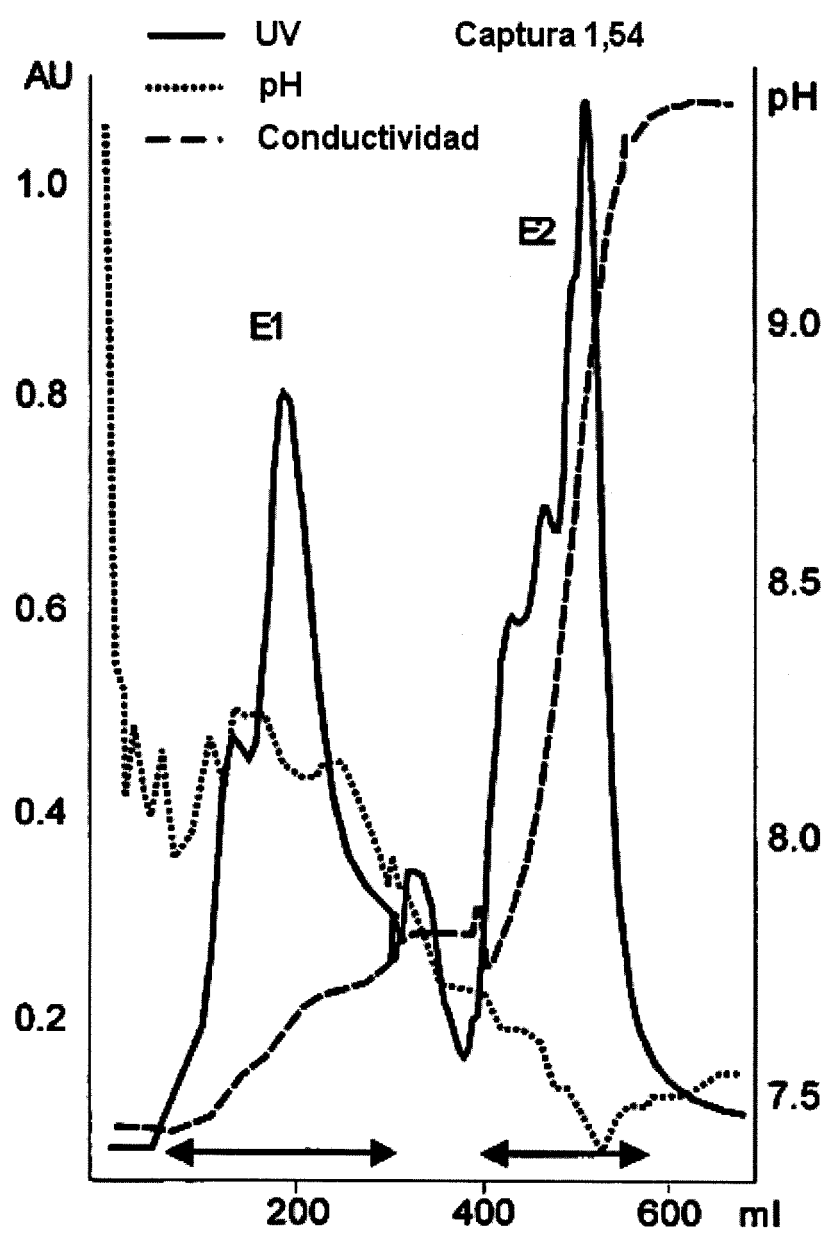


Figura 4

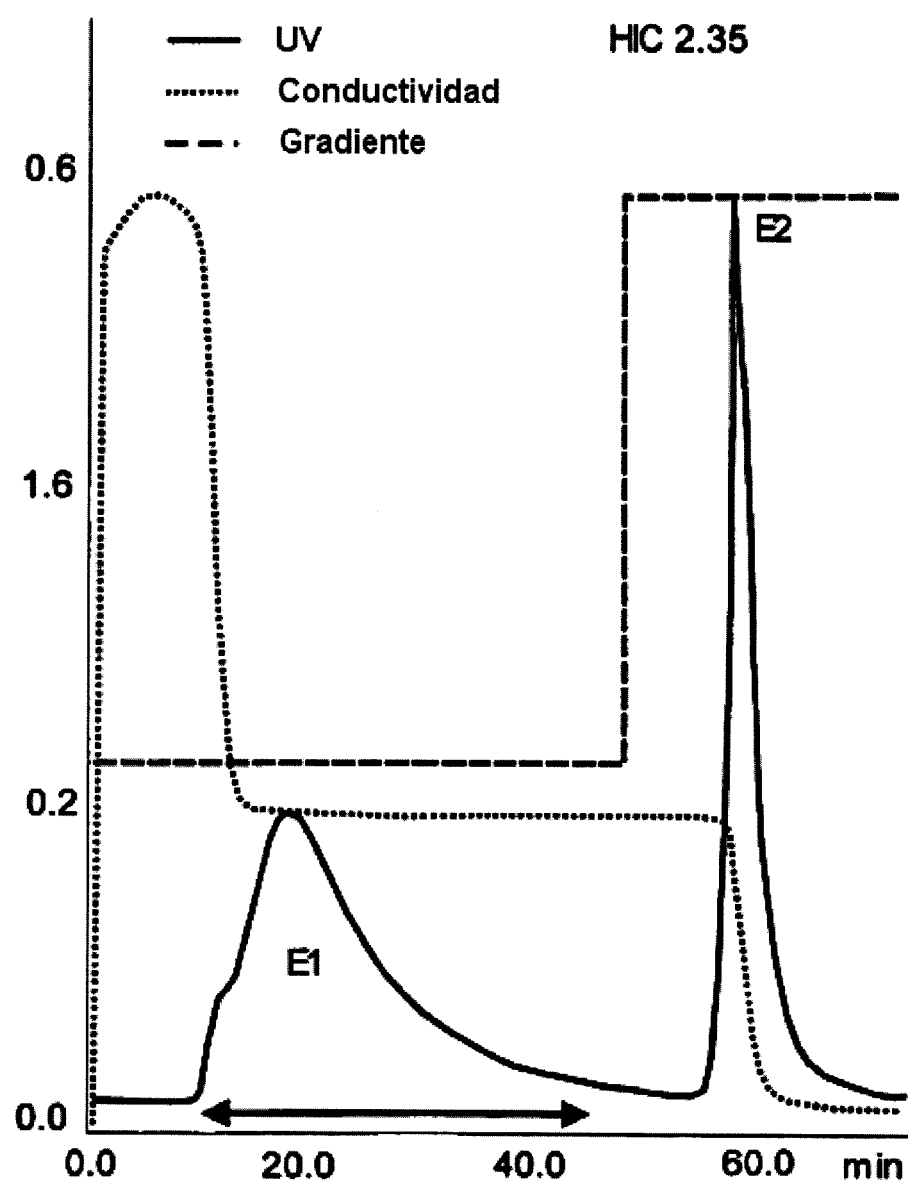


Figura 5

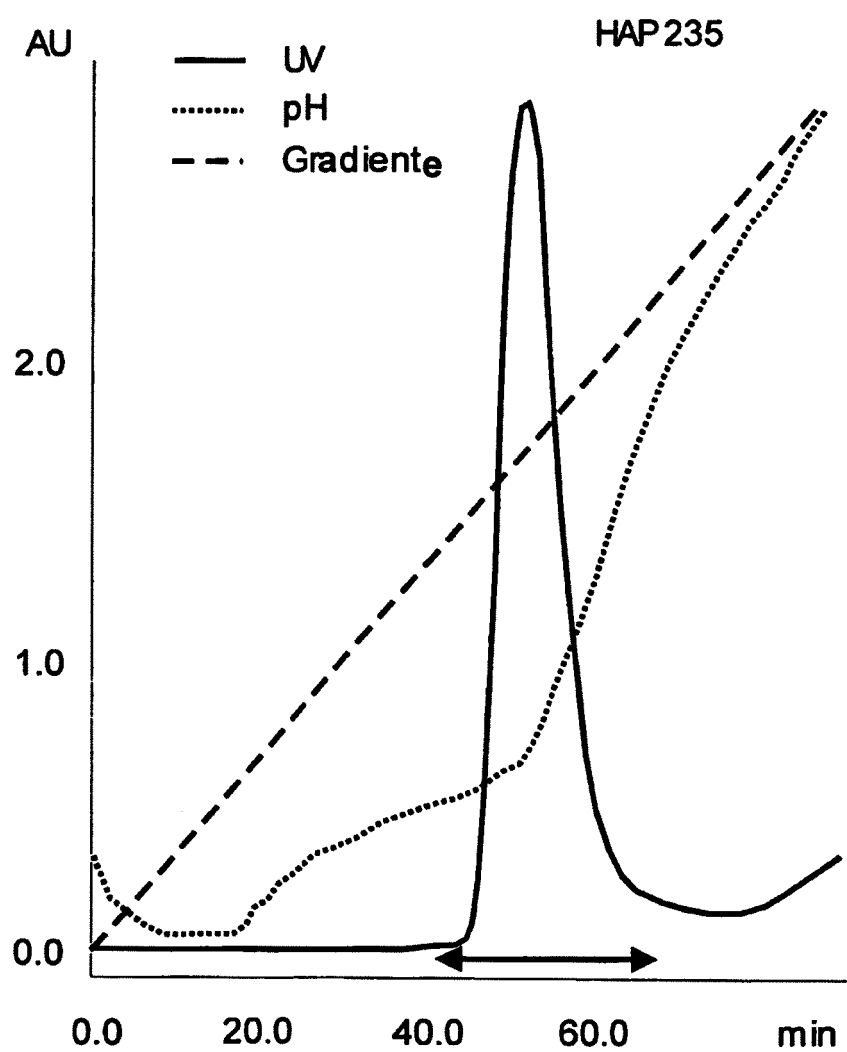


Figura 6

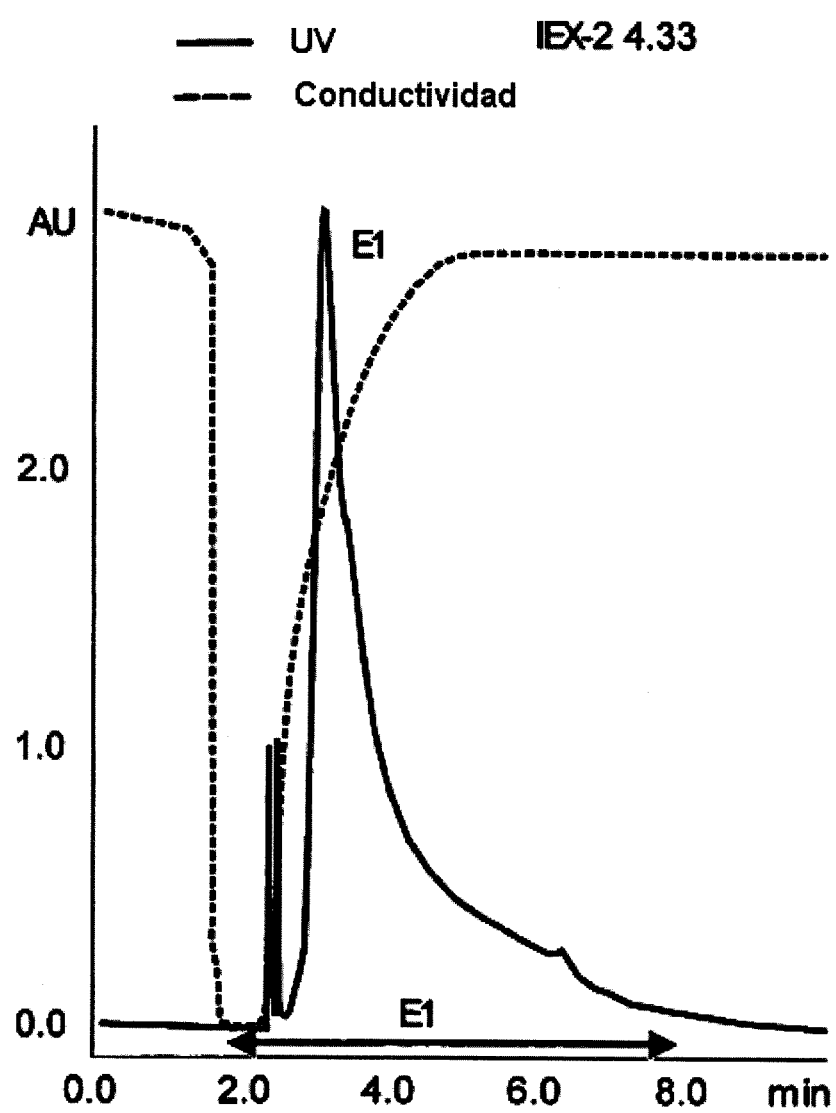


Figura 7

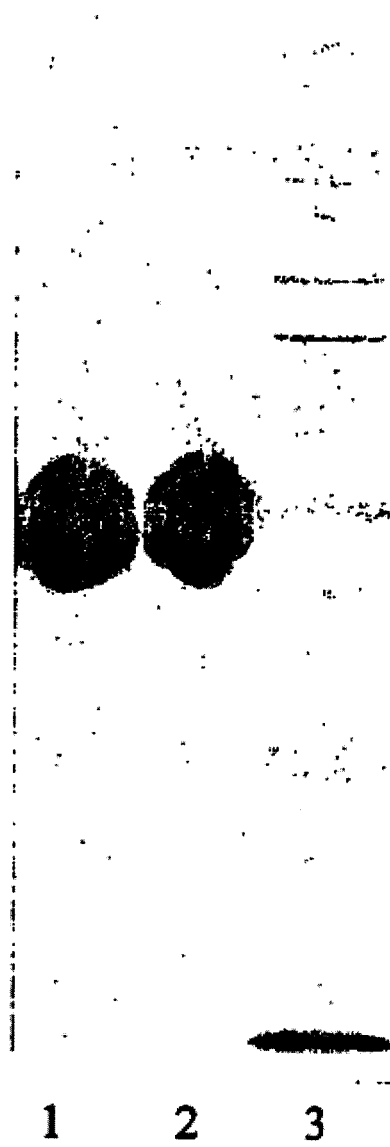


Figura 8

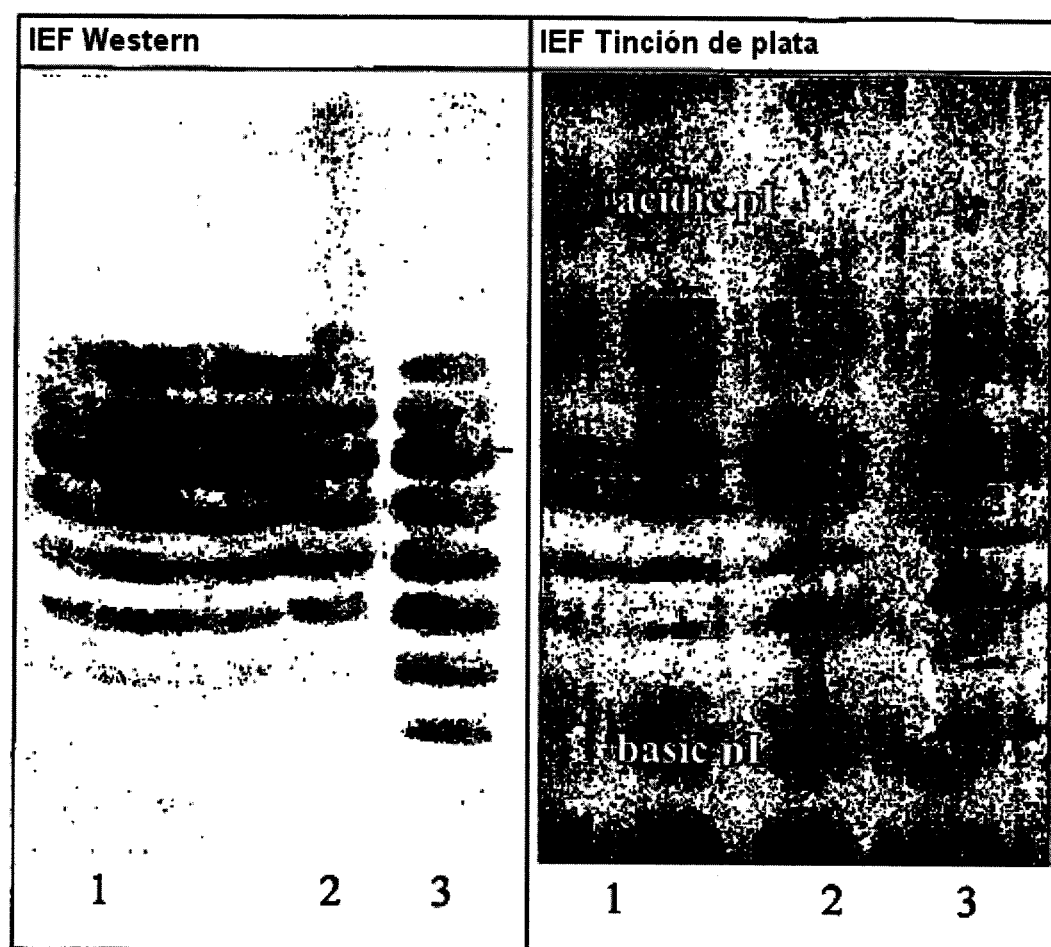


Figura 9

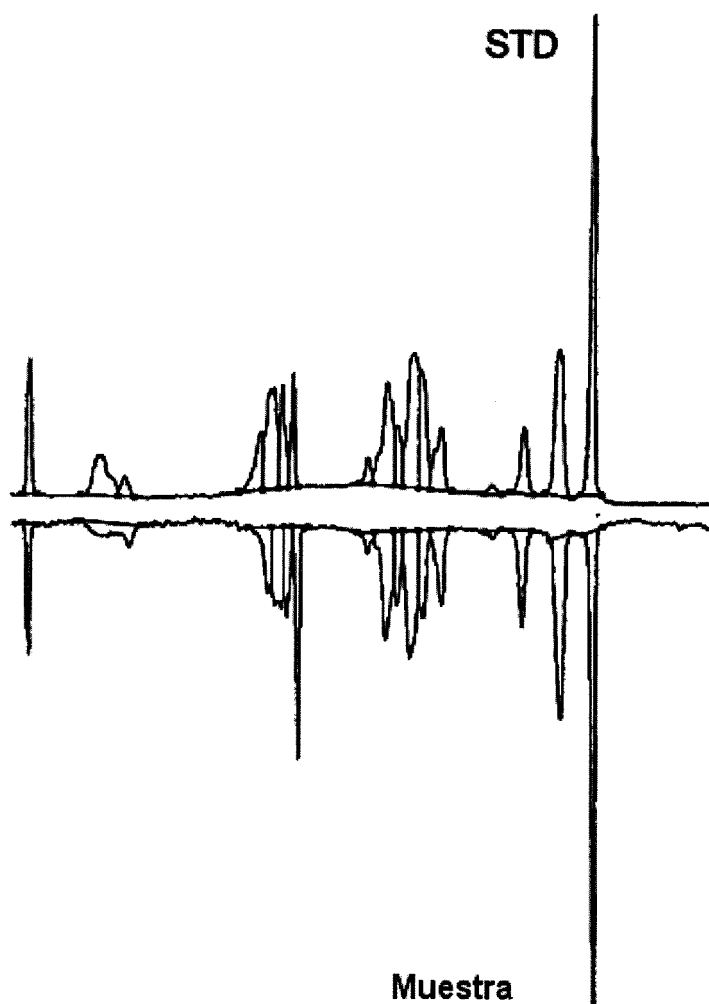


Figura 10

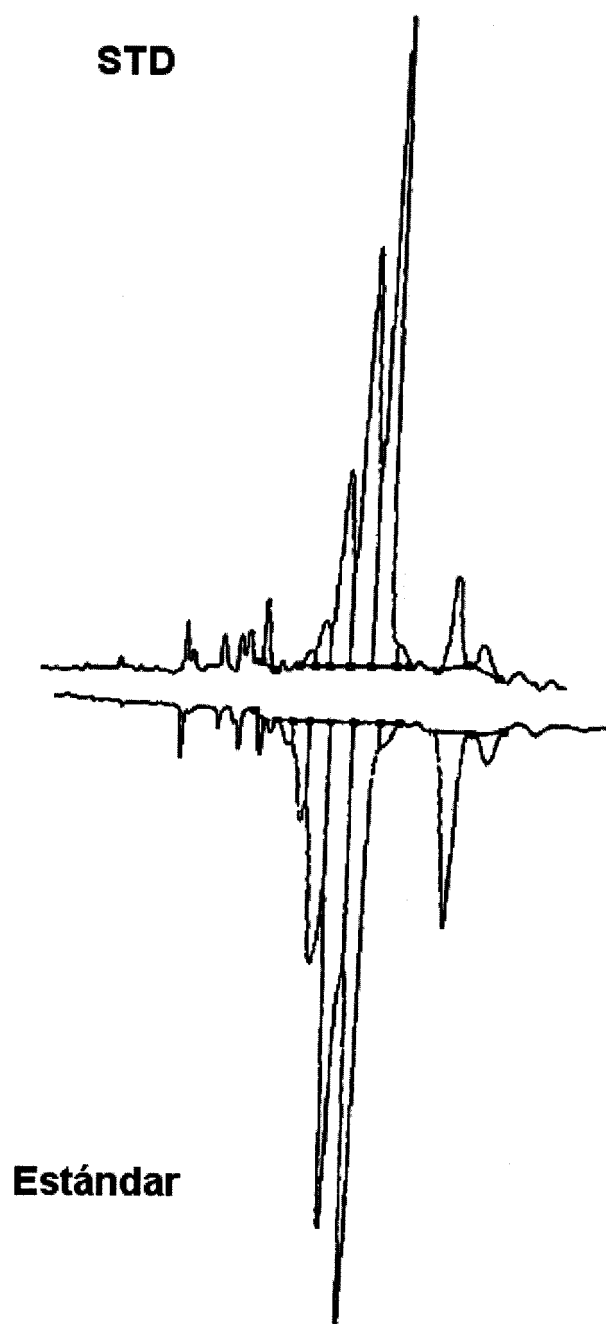


Figura 11



Figura 12

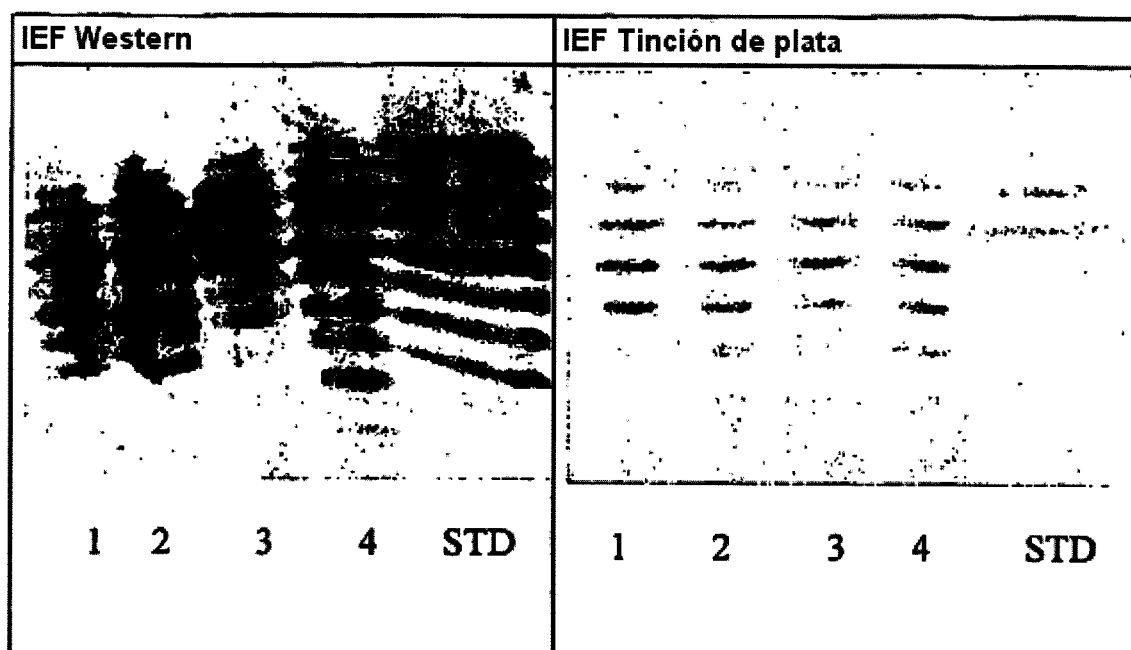
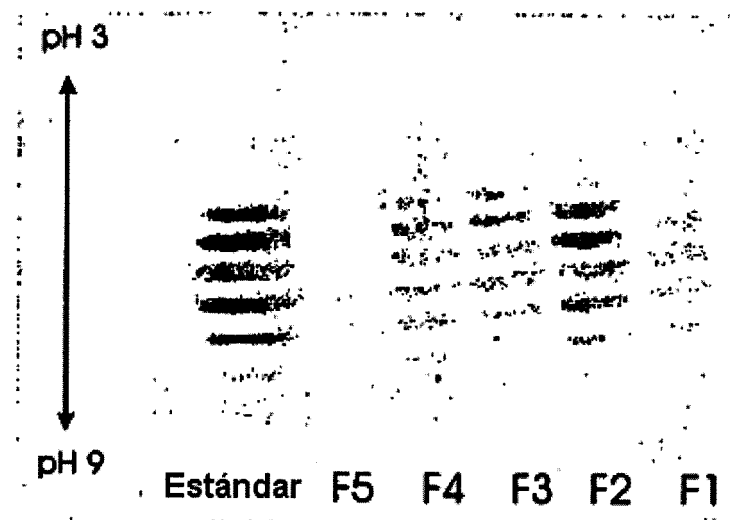


Figura 13

A)



B)

