

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Dezember 2009 (10.12.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/147060 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/505 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/056544

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2009 (28.05.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102008002209.8 4. Juni 2008 (04.06.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Relinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WIENAND, Wolfgang** [DE/DE]; Wiesenstrasse 28, 60385 Frankfurt am Main (DE). **KUNZ, Franz-Rudolf** [DE/DE]; Buchenweg 12, 63571 Gelnhausen (DE). **REICHERT, Dietmar** [DE/DE]; Elsavestraße 79, 63863 Eschau (DE). **EUL, Wilfried** [DE/DE]; Heidtanne 5, 63796 Kahl am Main (DE). **HANKO, Rudolf** [DE/DE]; Grunerstraße 48, 40239 Düsseldorf (DE). **BIRR, Christian** [DE/DE]; Bahnhofstraße 130, 69151 Neckargemünd (DE). **SINGHOFER-WOWRA, Monika** [DE/DE]; Goethestraße 9, 68526 Ladenburg (DE). **KÖNIG, Dagmar** [DE/DE]; Rehefelder Straße 29, 01127 Dresden (DE). **FABER, Lars** [DE/DE]; Blumenstraße 37, 69214 Eppelheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING ERYTHROPOIETIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUFREINIGUNG VON ERYTHROPOIETIN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing erythropoietin, wherein culture supernatant of erythropoietin-producing eukaryotic cells containing erythropoietin are subjected to the following steps: a) Removing the cell components; and b) treating the product from a) to the following chromatography steps in the sequence indicated i) reversed phase chromatography; ii) anion exchange chromatography; iii) hydroxyapatite chromatography.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung von Erythropoietin, wobei Erythropoietin enthaltender Kulturüberstand von Erythropoietin-produzierenden eukaryontischen Zellen folgenden Schritten unterworfen wird: a) Entfernen von Zellbestandteilen; und b) Behandlung des Produktes aus a) durch folgende Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge i) Reversed-Phase-Chromatographie; ii) Anionenaustausch-Chromatographie; iii) Hydroxyapatit-Chromatographie.



WO 2009/147060 A1

Verfahren zur Aufreinigung von Erythropoietin

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aufreinigung von Erythropoietin, wobei Erythropoietin enthal-
tender Kulturüberstand von Erythropoietin-produzierenden eu-
5 karyontischen Zellen durch bestimmte, in einer festgelegten
Art und Weise nacheinander ausgeführten chromatographischen
Aufreinigungsschritte aufgearbeitet wird.

Erythropoietin, kurz EPO genannt, ist ein Glykoprotein, das
die Bildung von Erythrocyten im Knochenmark anregt. EPO wird
10 hauptsächlich in den Nieren gebildet und gelangt von dort aus
über den Blutkreislauf zu seinem Zielort. Bei Niereninsuffi-
zienz produzieren die geschädigten Nieren zu wenig oder über-
haupt kein EPO, was zur Folge hat, dass aus den Stammzellen
des Knochenmarks zu wenig Erythrocyten hervorgehen. Diese so-
15 genannte renale Anämie kann durch Verabreichung von EPO in
physiologischen Mengen, die die Bildung von Erythrocyten im
Knochenmark stimulieren, behandelt werden. Das zur Verabrei-
chung verwendete EPO kann entweder aus Humanurin gewonnen o-
der durch gentechnologische Methoden erzeugt werden. Da EPO
20 im menschlichen Körper nur in geringen Spuren enthalten ist,
ist die Isolierung von EPO aus der natürlichen Quelle für
therapeutische Anwendungen praktisch unmöglich. Daher bieten
gentechnische Methoden die einzige wirtschaftliche Möglich-
keit, diesen Stoff in größeren Mengen zu produzieren.

25 Die rekombinante Herstellung von Erythropoietin ist seit der
Identifizierung des humanen Erythropoietin-Gens im Jahr 1984
möglich. Seit Anfang der 90er Jahre sind verschiedene Arznei-
mittel entwickelt worden, die humanes Erythropoietin enthal-
ten, das auf gentechnologischem Weg in eukaryontischen Zel-
30 len, vor allem in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) produ-
ziert wurde. Die Herstellung von rekombinantem humanen

Erythropoietin ist beispielsweise beschrieben in EP-A-0 148 605 und EP-A-205 564.

Die rekombinante Herstellung von Erythropoietin erfolgt üblicherweise in CHO-Wirtszellen. Während diese früher in Kulturmedien kultiviert wurden, denen fötales Kälberserum und manchmal auch Rinderinsulin zugesetzt war, findet die Kultivierung heutzutage regelmäßig in serum- und proteinfreiem Medium statt. Auf diese Weise kann das Risiko von Kontaminationen mit bovinen Proteinen, bovinen Viren, boviner DNA oder anderen unerwünschten Substanzen bovinen Ursprungs ganz vermieden werden. Für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen werden geeignete, serum- und proteinfreie Medien von verschiedenen kommerziellen Herstellern angeboten, z.B. das Medium MAM-PF2, vertrieben von u.a. durch Bioconcept, Allschwil, Schweiz, oder die Medien DMEM und DMENU12, angeboten z.B. von Invitrogen/Gibco, Eggenstein, Deutschland.

Auch verschiedene chromatographische Reinigungsverfahren für Erythropoietin sind bereits im Stand der Technik beschrieben worden. EP-A-0 228 452 beschreibt ein Verfahren zur Aufreinigung von biologisch aktivem Erythropoietin aus einer Flüssigkeit, umfassend die chromatographischen Schritte Anionenaustausch-Chromatographie und Reversed-Phase-Chromatographie.

In EP-A-0 267 678 wird die Aufreinigung eines in serumfreier Kultur hergestellten Erythropoietins beschrieben, wobei aufeinander folgend eine Dialyse, eine Ionenaustausch-Chromatographie, eine präparative Reversed-Phase-HPLC und eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt werden. Dabei kann der Gelfiltrationschromatographieschritt durch eine Ionenaustauschchromatographie ersetzt werden. Ebenso wird vorgeschlagen, vor der (ersten) Ionenaustauschchromatographie eine Farbstoffaffinitätschromatographie an einer Blue Trisacryl-Säule durchzuführen.

In EP-A-0 830 376 ist ein Verfahren zur Reinigung von Erythropoietin beschrieben, bei dem EPO aus dem Kulturüberstand im ersten Schritt der chromatographischen Aufreinigung einer Farbstoffaffinitätschromatographie unterzogen wird. Im
5 zweiten Schritt folgt eine Chromatographie an einem hydrophobierten Träger, gefolgt von einer Hydroxyapatit-Chromatographie. Hieran schließt sich dann eine Reversed-Phase-HPLC an, gefolgt von einer Anionenaustausch-Chromatographie als letztem Chromatographieschritt.

10 EP-A-1 127 063 beschreibt ein Aufreinigungsverfahren für Erythropoietin, das folgende Schritte umfasst: differentielle Präzipitation, hydrophobe Interaktionschromatographie, Diafiltration, Anionenaustausch-Chromatographie, Kationenaustausch-Chromatographie und Size-Exclusion-
15 Chromatographie. Die einzelnen Reinigungsschritte werden in EP-A-1 127 063 in der genannten Reihenfolge durchgeführt. In einer Variante des Verfahrens umfasst die Reinigung die folgenden Schritte: differentielle Präzipitation, hydrophobe Interaktionschromatographie, Diafiltration, Anionenaustausch-
20 Chromatographie, Kationenaustausch-Chromatographie, eine weitere Diafiltration und Size-Exclusion-Chromatographie. In jedem Fall sieht das Verfahren im ersten Schritt eine Präzipitation, gefolgt von einer Zentrifugation vor. Ebenso ist eine Gelfiltration zum Abschluss der chromatographischen Reinigung
25 zwingend vorgesehen.

Die internationale Anmeldung WO-A-03/045996 beschreibt ein Reinigungsverfahren für EPO, umfassend eine Anionenaustausch-Chromatographie, gefolgt von einer Reversed-Phase-Chromatographie und einer weiteren Anionenaustausch-
30 Chromatographie. An die zweite Anionenaustausch-Chromatographie schließt sich eine Size-Exclusion-Chromatographie unter Einsatz eines Gelfiltrationsmediums an.

Die Reinigung von Erythropoietin ist auch Gegenstand von EP-A-0 428 267. Hier wird eine Chromatographie an einer Q Sepharose-Säule durchgeführt, teilweise gefolgt von Reversed-Phase-Chromatographie und Gelfiltration.

5 In der WO2005/121173 wird ein Verfahren zur Aufreinigung von mittels fermentativer Verfahren hergestelltem EPO angegeben. Dieses Verfahren geht von einer chromatographischen Reinigung mit mindestens vier verschiedenen chromatographischen Trenn-
10 methoden aus. Die erste Anionenaustausch-chromatographie wird gefolgt von einer Affinitätschromatographie, einer hydrophoben Interaktionschromatographie und einer Hydroxyapatit-Chromatographie, wobei die Reihenfolge dieser 3 letztgenannten Chromatographiearten beliebig sein kann. Abschließend kommt wieder eine Anionenaustauschchromatographie zum Ein-
15 satz.

Es werden mittels dieses Verfahrens also mindestens 5 Chromatographieschritte benötigt, um EPO herzustellen, welches den von der Europäischen Pharmacopoeia geforderten Reinheitskriterien genügt. Kriterien für ein geeignetes EPO sind u.a. ein
20 Gehalt von Fremdproteinen, die aus der Wirtszelle stammen von <100 ppm, Gehalt an DNA aus der Wirtszelle von <100 pg/mg EPO und schließlich eine hinsichtlich der Isoformen-Zusammensetzung dem Standard entsprechende Zusammensetzung (Ph. Eur.; 01/2002:1316).

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein weiteres Aufreinigungsverfahren anzugeben. Dieses sollte ein EPO-Endprodukt liefern, das dem in der Europäischen Pharmacopoeia (Ph.Eur.; 01/2002:1316) definierten Standard bzw. der Guidance on Biosimilar Medicinal Products Containing Recombinant
30 Erythropoietins (EMEA/CHMP/94256/2005) entspricht und in geeigneter Weise in einer technischen, insbesondere fermentativen EPO-Produktion einsetzbar ist. Insbesondere sollte das vorliegende Verfahren vom ökonomischen Gesichtspunkt den Ver-

fahren des Standes der Technik überlegen sein. Weiterhin sollte das erfindungsgemäße Verfahren bei nicht erheblicher Verschlechterung der Reinigungsleistung mit weniger chromatographischen Reinigungsschritten auskommen und auf spezielle
5 technisch aufwendige Chromatographieschritte, wie z.B. der Affinitäts-Chromatographie verzichten können.

Die technische Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Aufreinigung von Erythropoietin, wobei Erythropoietin enthaltender Kulturüberstand von Erythropoietin-produzierenden eu-
10 karyontischen Zellen folgenden Schritten unterworfen wird:

- a) Entfernen von Zellbestandteilen; und
- b) Behandlung des Produktes aus a) durch folgende Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge
 - i) Reversed-Phase-Chromatographie;
 - 15 ii) Anionenaustausch-Chromatographie;
 - iii) Hydroxyapatit-Chromatographie.

In eine bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden vor Schritt a) und zwischen den Schritten a) bis b iii) keine anderen Chromatographie-Verfahren angewandt. Zudem ist weiter
20 bevorzugt, dass auch nach Schritt b iii) keine anderen Chromatographie-Verfahren angewandt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Erythropoietin Produkt hergestellt, das dem in der Europäischen Pharmacopoeia (Ph.Eur.; 01/2002:1316) definierten Standard bzw. der
25 Guidance on Biosimilar Medicinal Products Containing Recombinant Erythropoietins (EMEA/CHMP/94256/2005) entspricht. Dabei erfüllt das so hergestellte Erythropoietin die folgenden Kriterien: ein Gehalt von Fremdproteinen, die aus der Wirtszelle stammen von <100 ppm, Gehalt an DNA aus der Wirtszelle von
30 <100 pg/mg EPO und schließlich eine hinsichtlich der Isoformen-Zusammensetzung dem Standard entsprechende Zusammensetzung (Ph. Eur.; 01/2002:1316). Das erhaltene EPO-Produkt hat weiterhin eine biologische Aktivität von mindestens 150.000

IE/mg im Bio-Assay. Darüber hinaus entsprechen die Bandenstruktur in der IEF und das Glycosylierungsmuster einem marktüblichen Erypo®-Präparat.

5 Dadurch, dass in einem Verfahren zur Aufreinigung des Fermentationsüberstandes einer biotechnologischen EPO-Herstellung aus Säugerzellkulturen der von Zellbestandteilen gereinigte Fermentationsüberstand durch folgende Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge behandelt wird

- 10 i) Reversed-Phase-Chromatographie (RP-Chromatographie)
- ii) Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Chromatographie)
- iii) Hydroxyapatit-Chromatographie (HA-Chromatographie)

 gelangt man äußerst vorteilhaft und trotzdem in überraschender Art und Weise zur Lösung der gestellten Aufgaben. Der
15 Fachmann, der sich mit der formulierten Aufgabenstellung konfrontiert sieht, hätte angesichts des bestehenden Standes der Technik - insbesondere der WO2005/121173, wonach eine RP-Chromatographie möglichst vermieden werden sollte - nicht mit
20 Aussicht auf Erfolg in Betracht gezogen, dass eine Verminderung der Anzahl an erforderlichen Chromatographieschritte zur Aufreinigung von standardgemäßem EPO möglich ist. Dadurch resultieren ein geringerer apparativer, personeller und Materialaufwand sowie eine Zeitersparnis, vor allem aber höchste
25 Sicherheit gegen virale Kontaminationen. Auch können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren weniger Hilfsstoffe und nur unbedenkliche organische Lösungsmittel, wie z.B. Ethanol oder 2-Propanol verwendet werden. Dieses Ziel wird in geeigneter Weise dadurch erreicht, dass die oben angeführten Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt
30 werden.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren genutzten chromatographischen Prinzipien sind literaturbekannt und dem Fach-

mann geläufig (Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Wiley-VCH Weinheim 2004; Unger, Handbuch der HPLC, Teil 1 und 2, GIT Verlag Darmstadt 1994). Darüber hinaus finden sich weiterführende und detaillierte In-
5 formationen zu den Chromatographiemedien in den Produktinformationen der jeweiligen Hersteller bzw. Lieferanten.

Weiterhin ist bevorzugt, dass die eukaryontischen Erythropoietin-produzierenden Zellen, Säugetierzellen, besonders bevorzugt menschliche Zellen und ganz besonders bevorzugt Chinese-
10 Hamster-Ovary Zellen (CHO) sind, die humanes rekombinantes Erythropoietin exprimieren.

In einem weiteren bevorzugten Verfahren ist vorgesehen, dass zusätzlich solche Eluatfraktionen, die in ihrem Banden- bzw. Glycosylierungsmuster nicht dem Referenzmaterial entsprechen,
15 einer weiteren Anionenaustausch-Chromatographie nach ii) und/oder Hydroxyapatit-Chromatographie nach iii) unterzogen werden.

Weiterhin ist bevorzugt, dass nach den Schritten i), ii) und/oder iii) eine Ultrafiltration durchgeführt wird.

20 In einem weiteren bevorzugten Verfahren enthält Schritt a) eine Mikrofiltration und eine anschließende Ultrafiltration.

In bevorzugter Weise erfolgt die Reversed-Phase-Chromatographie an einem Trägermaterial als stationäre Phase, die ausgewählt ist aus der Gruppe C₁ bis C₈-modifizierte Kieselgele, hydrophobierte Polymerträger auf Basis von Polystyrol-/Divinylbenzol und hydrophobierte monolithische Phasenmaterialien auf Kieselgel- oder Polymerbasis, und als Eluent
25 wird eine wässrige Alkanollösung verwendet. Besonders bevorzugt werden Ethanol oder 2-Propanol oder deren Mischungen,

und ganz besonders bevorzugt 2-Propanol, mit entsprechend gepufferten wässrigen Systemen als Eluent verwendet.

In einem weiteren bevorzugten Verfahren erfolgt die Anionenaustausch-Chromatographie an einem Trägermaterial als stationäre Phase mit funktionellen Gruppen, die ausgewählt sind aus Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE), quaternäre Aminoethyl-Gruppen (QAE), quaternäre Ammonium-Gruppen oder Dimethylaminoethyl-Gruppen (DMAE).

Weiterhin ist bevorzugt, dass die Anionenaustausch-Chromatographie mindestens einen Waschschriff mit einem wässrigen Puffersystem, vorzugsweise mit einem Puffersystem auf Basis einer organischen Säure, insbesondere mit einem Acetatpuffer umfasst.

Besonders bevorzugt, umfasst die Anionenaustausch-Chromatographie mindestens einen Waschschriff mit einer wässrigen Pufferlösung mit einem pH von 3,5 bis 5,5, besonders bevorzugt mit einem pH von 4,0 bis 5,0 und am meisten bevorzugt mit einem pH bei etwa 4,5. Als Puffer eignet sich vor allem ein Acetat-Puffer, vorzugsweise ein Natriumacetat-Puffer.

In bevorzugter Weise wird als Eluent bei der Anionenaustausch-chromatographie anorganische Säure in einer wässrigen Pufferlösung verwendet. In außerdem und besonders bevorzugter Weise werden als Eluent bei der Anionenaustausch-Chromatographie Chloridionen in einer wässrigen Pufferlösung verwendet.

In einem weiteren bevorzugten Verfahren umfasst die Hydroxyapatit-Chromatographie mindestens einen Waschschriff mit einem Puffersystem auf Basis einer organischen Säure, vorzugsweise mit einem Acetatpuffer.

Ebenfalls bevorzugt wird als Eluent bei der Hydroxyapatit-Chromatographie ein Puffersystem auf Basis einer anorganischen Säure, besonders bevorzugt ein Phosphatpuffer verwendet.

5 Erläuterung der besonders bevorzugten Ausführungsformen

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit zur Aufreinigung von Erythropoietin, wobei Erythropoietin enthaltender Kulturüberstand von Erythropoietin-produzierenden eukaryontischen Zellen folgenden Schritten unterworfen wird:

- 10 a) Entfernen von Zellbestandteilen; und
- b) Behandlung des Produktes aus a) durch folgende Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge
 - i) Reversed-Phase-Chromatographie;
 - ii) Anionenaustausch-Chromatographie;
 - 15 iii) Hydroxyapatit-Chromatographie.

Die Reversed-Phase-Chromatographie wird als „Capture-Schritt“ eingesetzt. In diesem ersten Reinigungsschritt wird EPO aus dem Fermentationsüberstand angereichert. Dabei sind unterschiedliche hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proben-

20 molekülen und der stationären Phase von Bedeutung. Die Probenkomponenten werden umso stärker festgehalten, je weniger sie in Wasser löslich sind, d.h. je unpolarer sie sind. Die Reversed-Phase-Chromatographie kann mit herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Phasenmaterialien sowohl auf Kieselgel-

25 als auch auf Polymerbasis durchgeführt werden, die speziell zur Proteinanalytik geeignet sind. Typischerweise werden großporige Kieselgelmateriale, z.B. 300 Å oder 500 Å, mit kurzkettiger Kohlenstoffbelegung, z.B. C1, C2, C3 und C4, unporöse hydrophobierte Polymerträger auf Polystyrol-

30 /Divinylbenzolbasis und speziell hydrophobierte monolithische Phasenmaterialien ebenfalls auf Kieselgel- oder Polymerbasis eingesetzt. Zu den Herstellern bzw. Lieferanten dieser stationären Phasen zählen u.a. die Firmen Merck, Waters, GE

Healthcare, Tosoh Bioscience, Bio-Rad, Dionex, YMC, Phenomenex, Macherey-Nagel und BIA Separations.

Bevorzugte Reversed-Phase-Materialien sind unporöse hydrophobierte Polymerträger auf Polystyrol-/ Divinylbenzolbasis. Besonders bevorzugt werden SOURCE 30RPC oder das entsprechende 15 μm -Material (SOURCE 15RPC) von GE Healthcare.

Als Eluenten können vorzugsweise Alkohole wie Ethanol oder 2-Propanol oder deren Mischungen mit entsprechend gepufferten wässrigen Systemen Verwendung finden. Besonders bevorzugt wird der Einsatz von 2-Propanol, da der organische Lösungsmittelanteil im Eluenten, im Vergleich zu Ethanol, deutlich geringer ist und so sicherheitstechnische und ökonomische Vorteile bestehen. Darüber hinaus ist 2-Propanol aufgrund seiner Mischbarkeits- und Löslichkeitseigenschaften als Lösungsmittler vorzüglich geeignet (Unger, Handbuch der HPLC, Teil 1, GIT Verlag Darmstadt 1994; Nowotny et al., Chromatographia 1988, 25, 409-412).

Die Anionenaustausch-Chromatographie beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Ionen der Probelösung mit dem eingesetzten Puffermedium. Sie kann mit herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Anionenaustausch-Harzen mit Diethylaminoethyl- (DEAE), quaternärer Aminoethyl- (QAE), quaternärer Ammonium- oder Dimethylaminoethylfunktionalisierung (DMAE) durchgeführt werden. Erhältlich sind diese Phasenmaterialien z.B. bei GE Healthcare, Tosoh Bioscience, Bio-Rad oder Merck. Bevorzugt werden Diethylaminoethyl (DEAE)-funktionalisierte Anionenaustauscherharze eingesetzt. Besonders bevorzugt wird in der Anionenaustausch-Chromatographie TSKgel DEAE-5PW (30 μm), erhältlich von Tosoh Bioscience, verwendet. Dieser Chromatographieschritt ist im Hinblick auf das notwendige Glycosylierungsmuster im EPO-Endprodukt von Bedeutung.

Die Anionenaustausch-Chromatographie beinhaltet in der bevorzugten Ausführungsform einen sauren Waschschrift („Saurer Wash“), mit dem die basischen Isoformen des Erythropoietin durch die pH-Absenkung eluiert und somit abgetrennt werden
5 (EP-1428878). „Saurer Wash“ bedeutet dabei, dass der pH-Wert des Waschpuffers zwischen 3,5 und 5,5, besonders bevorzugt zwischen 4,0 und 5,0 und am meisten bevorzugt bei etwa 4,5 liegt. Als Puffer eignet sich vor allem ein Natriumacetat-Puffer.

10 Für die Hydroxyapatit-Chromatographie können übliche Hydroxyapatit- (bzw. Hydroxylapatit-) Materialien eingesetzt werden. Hydroxylapatit ist hexagonal kristallines Calciumphosphat und eignet sich besonders zur Trennung von Proteinen und anderen Biopolymeren. Dieser Aufreinigungsschritt wird zur Entfernung
15 der „phosphatierten“ EPO-Moleküle durchgeführt. Bevorzugt wird CHT keramisches Hydroxyapatit (Bio-Rad) eingesetzt, besonders bevorzugt CHT keramisches Hydroxyapatit Typ 1 (Bio-Rad).

Sowohl die Reversed-Phase-Chromatographie als auch die Anionenaustausch-Chromatographie als auch die Hydroxyapatit-Chromatographie kann zur Steigerung der Gesamtproduktausbeute im Sinne einer Reprozessierung für solche Eluatfraktionen wiederholt werden, die in ihrer Produktqualität, insbesondere ihrem Banden- bzw. Glycosylierungsmuster nicht dem Referenz-
25 material entsprechen. Dabei handelt es sich typischerweise um die frühen bzw. späten Randfraktionen der Hauptfraktionen, die als solche bereits nach dem ersten Aufreinigungsschritt die gewünschten Produkteigenschaften aufweisen. Die Einstufung der Güte der Fraktionen auf den verschiedenen Aufreinigungsstufen erfolgt mit Standardmethoden (Isoelektrische Fokussierung (IEF) und Hochleistungsanionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD): Lasne, Nature 2000, 405 605-635; Holländer et al., LaborPraxis 2004, 56-59; Hokke et al., Eur. J. Biochem.

1995, 228, 981-1008; Dionex Technical Note 42, 1997. Als Referenzmaterial dient jeweils ein kommerziell erhältliches Erypo®-Präparat (JANSSEN-CILAG).

Vor der Aufreinigung des Kulturüberstandes mit den genannten
5 Chromatographie-Verfahren wird zur Zellabtrennung eine Mikro-
filtration über 1,2 µm- und 0,65 µm-Filter durchgeführt. An-
schließend erfolgt eine Ultrafiltration (cut off 10.000 Da)
des zellfreien Filtrats auf 1/10 des Ausgangsvolumens. Nach
der Ultrafiltration wird der konzentrierte Zellüberstand ste-
10 rilfiltriert und im ersten Chromatographieschritt (Reversed-
Phase-Chromatographie) eingesetzt. Die Filtrationsschritte,
insbesondere die Sterilfiltration, sind literaturbekannt und
dem Fachmann geläufig (Munir, Handbuch Ultrafiltration, Behr
Hamburg 1990; Ullmann B2, 10-2, 10-21 und B3 11-6; Gasper,
15 Handbuch der industriellen Fest-Flüssig-Filtration, Hüthig
Heidelberg 1990; Ullmann A16, 187-258).

Es wurde gefunden, dass das mit dem erfindungsgemäßen Verfah-
ren erhaltene EPO die in der Europäischen Pharmacopoeia defi-
nierten Qualitätskriterien erfüllt. Insbesondere entsprechen
20 die Isoformen-Zusammensetzung und das Glycosylierungsmuster
dem in der Europäischen Pharmacopoeia (Ph.Eur.; 01/2002:1316)
bzw. der Guidance on Biosimilar Medicinal Products Containing
Recombinant Erythropoietins (EMA/CHMP/94256/2005) definier-
ten Standard. Als Referenzmaterial dient ein kommerziell er-
25 hältliches Erypo®-Präparat (JANSSEN-CILAG).

Die Aktivität des Proteins sollte mindestens 100.000 IE/mg
betragen, vorzugsweise mindestens 125.000 IE/mg und besonders
bevorzugt mindestens 150.000 IE/mg (siehe auch Europäische
Pharmacopoeia 01/2002:1316).

30 Das erfindungsgemäß aufgereinigte EPO ist bevorzugt rekombi-
nantes humanes Erythropoietin, hergestellt in eukaryontischen
Zellen. Bevorzugt wird das rekombinante EPO in Säugerzellen,

besonders bevorzugt in CHO-Zellen hergestellt, wie z.B. beschrieben in EP-A-0 205 564 und EP-A-0 148 605. Die Fermentation erfolgt nach herkömmlichen Protokollen in kommerziell erhältlichen Kulturmedien.

5 Unter Erythropoietin (EPO) wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jedes Protein verstanden, das in der Lage ist, die Erythrocyten-Bildung im Knochenmark zu stimulieren und gemäß dem in der Europäischen Pharmacopoeia (Ph. Eur.;
01/2002:1316) beschriebenen Assay eindeutig als Erythropoie-
10 tin identifiziert werden kann (Bestimmung der Aktivität in polyzythämischen oder normozythämischen Mäusen). Bei dem Erythropoietin kann es sich um das wildtypische humane Erythropoietin oder um eine Variante davon mit einem oder mehreren Aminosäureaustauschen, -deletionen oder -additionen handeln.
15 Wenn es sich um eine Variante von Erythropoietin handelt, dann ist bevorzugt, dass diese Variante sich lediglich in 1 bis 20, bevorzugt in lediglich 1 bis 15, besonders bevorzugt in lediglich 1 bis 10 Aminosäurepositionen vom humanen Wildtyp-Erythropoietin durch Aminosäureaustausche, -deletionen
20 oder -additionen unterscheidet.

Unter Reinigung von Erythropoietin oder Anreicherung von Erythropoietin wird vorliegend verstanden, dass das Protein Erythropoietin aus einem Gemisch in sehr reiner Form erhalten wird, das in dem Gemisch enthaltene Erythropoietin wird also
25 angereichert, bis im Wesentlichen neben standardgemäßem Erythropoietin keine weiteren Proteine mehr enthalten sind.

Beschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt exemplarisch die chromatographische Abtrennung des Erythropoietin-Peaks bei der Reversed-Phase-
30 Chromatographie. Aufgetragen ist die Peakintensität in Form von milli-Absorption Units (mAU) über der Elutionszeit (in min.) bei einer UV-Wellenlänge von 280 nm.

Figur 2 zeigt exemplarisch die chromatographische Abtrennung des Erythropoietin-Peaks unter den Bedingungen der Anionenaustausch-Chromatographie. Aufgetragen ist die Peakintensität in Form von milli-Absorption Units (mAU) über der Elutionszeit (in min.) bei einer UV-Wellenlänge von 280 nm.

Figur 3 zeigt exemplarisch das IEF-Gel der isolierten EPO-Eluatfraktion nach der Anionenaustausch-Chromatographie im Vergleich zum Erypo®-Präparat.

Figur 4 zeigt exemplarisch die chromatographische Abtrennung des Erythropoietin-Peaks bei der Hydroxyapatit-Chromatographie. Aufgetragen ist die Peakintensität in Form von milli-Absorption Units (mAU) über der Elutionszeit (in min.) bei einer UV-Wellenlänge von 280 nm.

Figur 5 zeigt exemplarisch das IEF-Gel der isolierten EPO-Eluatfraktion nach der Hydroxyapatit-Chromatographie im Vergleich zum Erypo®-Präparat.

Figur 6 zeigt den nativen Glycosylierungsstatus des aufgereinigten EPO-Endproduktes.

Figur 7 zeigt den Glycosylierungsstatus eines kommerziell erhältlichen Erypo®-Präparates (JANSSEN-CILAG).

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken.

Beispiele

Beispiel 1: Produktion von EPO in CHO-Zellen

EPO wird fermentativ in CHO-Zellen produziert. Die Fermentation erfolgt nach Standardverfahren, wie sie in der patent- und wissenschaftlichen Literatur für eukaryontische, insbesondere CHO-Zellen beschrieben sind. Die Kultivierung erfolgt im Perforationsreaktor in Kulturmedium, das frei von tierischen Komponenten ist. Die Ernte findet in einem Zeitraum bis zu 50 Tagen kontinuierlich statt. Zur Zellabtrennung wird eine Mikrofiltration über einen geeigneten Filter (z.B. Opticap XLT30 Capsule mit Milligard-Medium 0,5 - 1,2 µm, Millipore und Sartobran P Midi-caps 0,45 - 0,65 µm, Sartorius) bei einer Flussrate von 1-2 L/min durchgeführt. Anschließend erfolgt zunächst eine Ultrafiltration (cut off 10.000 Da) des zellfreien Filtrats (z.B. Ultratan Pilot, Polyethersulfon 4 x 0,45 m², Schleicher & Schüll) und dann eine Sterilfiltration (z.B. über Opticap-Filtereinheiten mit 0,5 µm Milligard-Vorfilter und 0,2 µm Durapore Sterilfilter, Millipore) .

Beispiel 2: Reversed-Phase-Chromatographie („Capture-Schritt“)

Als „Capture-Schritt“ wird eine Reversed-Phase-Chromatographie an SOURCE 30RPC durchgeführt. In diesem ersten Reinigungsschritt wird EPO aus dem Fermentationsüberstand angereichert. Dabei werden mehrere Waschschriffe durchgeführt. Der erste Waschschriffe wird mit PBS Puffer (Phosphat buffered saline) durchgeführt. Der nächste Waschschriffe wird mit einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/TFA im Volumen-Verhältnis von 10/2/0.1 bis 10/1/0.1 bei einer Flussrate 40 - 50 mL/min durchgeführt. Die Produktelution wird mit einer Mischung aus Wasser/Isopropanol/TFA im Volumen-Verhältnis von 10/4/0.1 bei einer Flussrate von 30-40 mL/min durchgeführt. Die Flussraten wurden für diese Trennung entsprechend opti-

miert und angepasst. Danach wird ein Waschschrift mit Isopropanol/0,1% TFA-Lösung im Volumen-Verhältnis 60/40 durchgeführt.

Die trifluoressigsäure Produktfraktion wird direkt nach der
5 Elution im Verhältnis 1:1 mit einem Phosphatpuffer (pH-Wert 10) versetzt und mit 15 mM Natriumphosphatpuffer bis auf pH 7,2 verdünnt. Die dabei neutralisierte EPO-haltige Lösung wird jetzt steril filtriert.

Die Inprozesskontrolle (IPC) zur EPO-Anreicherung wird auf
10 einer analytischen RP-HPLC-Trennsäule im TFA / Acetonitril-System durchgeführt. Die Ausbeute an EPO nach diesem Chromatographieschritt beträgt mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 65 % und besonders bevorzugt mindestens 80 %.

Beispiel 3: Anionenaustausch-Chromatographie

15 Die neutralisierte EPO-Produktfraktion aus der Reversed-Phase-Chromatographie wird mit einer Förderleistung von 20 mL/min aufgetragen. Die EPO-haltige Lösung wird jetzt durch drei Waschschriffe bei konstanter Flussrate von 40 mL/min aufgereinigt, wobei der erste und dritte Waschschrift jeweils
20 bei einem pH von 7,2 mit 20 mM Natriumacetatlösung und der zweite bei einem pH von 4,5 mit einer entsprechenden Natriumacetatlösung durchgeführt wird. Die Produktelution wird unter Gradientenbedingungen mit einem Natriumacetat/Natriumchlorid-Puffer (pH 7,2) durchgeführt (Flussrate
25 30-40 mL/min). Dabei wird der Pufferanteil langsam, linear von 0 auf 80% erhöht.

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Eluatfraktionen analysiert und entsprechend der Bandenlage im IEF in Produkt-Pool (Hauptfraktion) und Randfraktionen unter-
30 teilt. Als Referenzmaterial dient ein kommerziell erhältlich-

ches Erypo®-Präparat. Der EPO-Gehalt der Hauptfraktion wird mittels RP-Chromatographie ermittelt. Die ausgewählten Eluatfraktionen werden mittels Ultrafiltration konzentriert und für die nachfolgende Hydroxyapatit-Chromatographie umgepuffert. Die Ausbeute an Erythropoietin nach diesem Chromatographieschritt beträgt mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 30 % und besonders bevorzugt mindestens 40 %.

Die isoelektrische Fokussierung wird auf einem Ultradünnschicht-Polyacrylamidgel durchgeführt. Dazu müssen die Probelösungen vor der Applikation mit Hilfe eines Mikrozentrifugationskit (cutoff 10.000 Da) entsalzt und aufkonzentriert werden. Die Fokussierung erfolgt bei Spannungen von 300 - 2.000 V. Nach 5.000 Vh ist die Entwicklung beendet. Das Gel wird anschließend mit Silbernitrat oder Coomassie angefärbt und ausgewertet.

Beispiel 4: Hydroxyapatit-Chromatographie

Dieser Aufreinigungsschritt ist zur Entfernung der „phosphatierten“ EPO-Moleküle geeignet. Die Hauptfraktion der Anionenaustausch-Chromatographie wird mittels Ultrafiltration in den Startpuffer der Hydroxyapatit-Säule umgepuffert und anschließend sterilfiltriert.

Die Probeninjektion erfolgt mit einer Förderleistung von 30 mL/min auf eine CHT Ceramic Hydroxyapatit Typ 1-Phase. Der Waschschrift wird mit einem Natriumacetatpuffer (pH 6,8), die Probenelution mit einem Phosphatpuffer bei pH 6,8 und einer Flussrate von 50 mL/min unter Gradientenbedingung durchgeführt. Dabei wird der Phosphatpufferanteil langsam, linear von 0 auf 25% erhöht.

Die spezifikationsgerechten EPO-Fractionen liegen in einem Natriumacetat-Natriumphosphat-Puffer vor und werden mit PBS

(Endabfüllungspuffer) mittels Ultrafiltration umgepuffert und bei -20°C tiefgefroren. Der EPO-Gehalt der einzelnen Fraktionen wird mittels RP-Chromatographie ermittelt. Die Ausbeute an Erythropoietin nach diesem Chromatographieschritt beträgt
5 mindestens 30 %, bevorzugt mindestens 40 % und besonders bevorzugt mindestens 50 %.

Die Analyse des Glycosylierungsmusters mittels HPAEC-PAD erfolgt nach enzymatischer Abspaltung der Kohlenhydratketten mittels PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) vom Protein. Nach
10 Isolierung und Entsalzung erfolgt die Analyse der Zuckerreste auf einem Hochleistungsanionenaustauscher mit gepulster amperometrischer Detektion.

Das schließlich erhaltene EPO-Produkt hat eine biologische Aktivität von mindestens 150.000 IE/mg im Bio-Assay und er-
15 füllt alle Anforderungen der Europäischen Pharmacopoeia (Ph.Eur.; 01/2002:1316) bzw. der Guidance on Biosimilar Medicinal Products Containing Recombinant Erythropoietins (EMA/CHMP/94256/2005). Darüber hinaus entsprechen die Bandenstruktur in der IEF und das Glycosylierungsmuster einem
20 marktüblichen Erypo®-Präparat.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Aufreinigung von Erythropoietin, wobei Erythropoietin enthaltender Kulturüberstand von Erythropoietin-produzierenden eukaryontischen Zellen folgenden Schritten unterworfen wird:
 - a) Entfernen von Zellbestandteilen; und
 - b) Behandlung des Produktes aus a) durch folgende Chromatographieschritte in der angegebenen Reihenfolge
 - i) Reversed-Phase-Chromatographie;
 - ii) Anionenaustausch-Chromatographie;
 - iii) Hydroxyapatit-Chromatographie.
2. Das Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass vor Schritt a) und zwischen den Schritten a) bis b iii) keine anderen Chromatographie-Verfahren angewandt werden.
3. Das Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryontischen Erythropoietin-produzierenden Zellen Säugetier-Zellen, bevorzugt menschliche Zellen und besonders bevorzugt Chinese-Hamster-Ovary Zellen sind, die humanes rekombinantes Erythropoietin exprimieren.
4. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich solche Eluatfraktionen, deren Produktqualität nicht dem Referenzmaterial entsprechen, einer weiteren Reversed-Phase-Chromatographie nach i) und/oder Anionenaustausch-Chromatographie nach ii) und/oder Hydroxyapatit-Chromatographie nach iii) unterzogen werden.

5. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass nach den Schritten i), ii) und/oder iii) eine Ultrafiltration durchgeführt wird.
6. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt a) eine Mikrofiltration und eine anschließende Ultrafiltration enthält.
7. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reversed-Phase-Chromatographie an einem Trägermaterial als stationäre Phase erfolgt, die ausgewählt ist aus der Gruppe C₁ bis C₈-modifizierte Kieselgele, hydrophobierte Polymerträger auf Basis von Polystyrol-/Divinylbenzol und hydrophobierte monolithische Phasenmaterialien auf Kieselgel- oder Polymerbasis, und wobei als Eluent eine wässrige Alkanollösung verwendet wird.
8. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Anionenaustausch-Chromatographie an einem Trägermaterial als stationärer Phase erfolgt mit funktionellen Gruppen, die ausgewählt sind aus Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE), quarternäre Aminoethyl-Gruppen (QAE), quaternäre Ammonium-Gruppen oder Dimethylaminoethyl-Gruppen (DMAE).
9. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Anionenaustausch-Chromatographie mindestens einen Waschschriff mit einem wässrigen Puffersystem umfasst.
10. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Anionenaustausch-Chromatographie mindestens einen Waschschriff mit einem Puffersystem auf Basis einer organischen Säure umfasst.

11. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Anionenaustausch-Chromatographie mindestens einen Waschschrift mit einer wässrigen Pufferlösung mit einem pH von 3,5 bis 5,5 umfasst.
12. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Eluent bei der Anionenaustausch-Chromatographie anorganische Säure in einer wässrigen Pufferlösung verwendet wird.
13. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Eluent bei der Anionenaustausch-Chromatographie Chloridionen in einer wässrigen Pufferlösung verwendet werden.
14. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyapatit-Chromatographie mindestens einen Waschschrift mit einem Puffersystem auf Basis einer organischen Säure umfasst.
15. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyapatit-Chromatographie mindestens einen Waschschrift mit einem Acetatpuffer umfasst.
16. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Eluent bei der Hydroxyapatit-Chromatographie ein Puffersystem auf Basis einer anorganischen Säure verwendet wird.
17. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass als Eluent bei der Hydroxyapatit-Chromatographie ein Phosphatpuffer verwendet wird.

Fig. 1

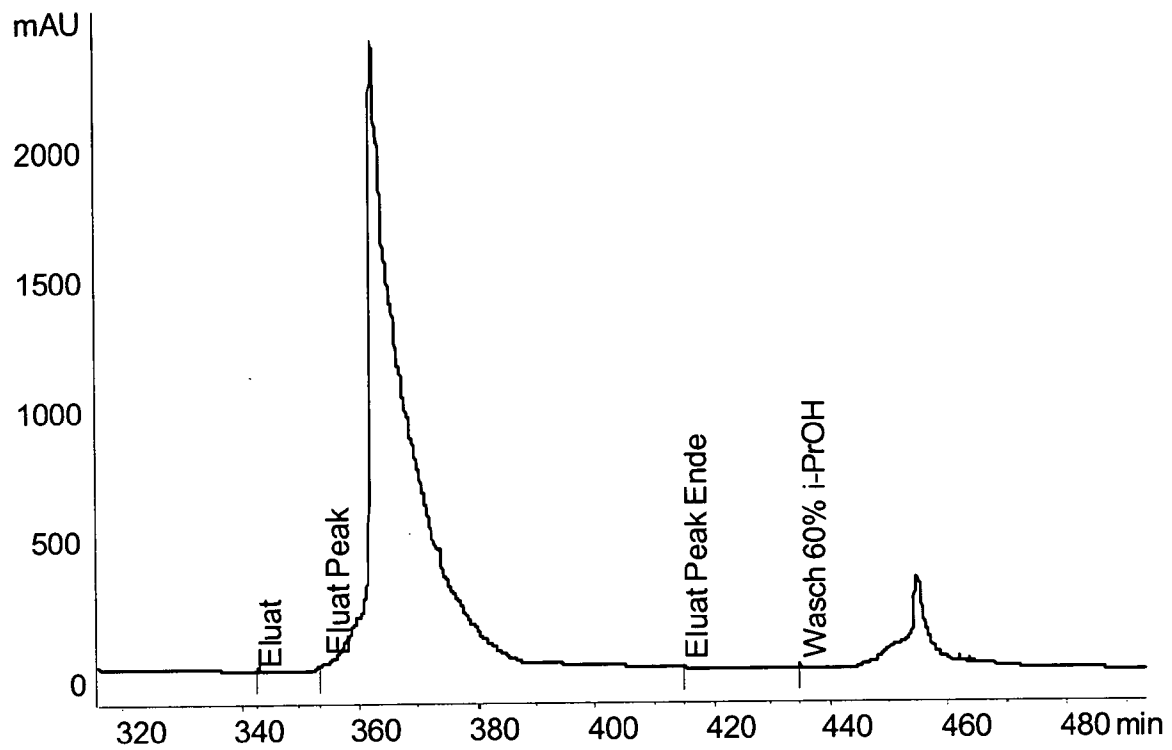


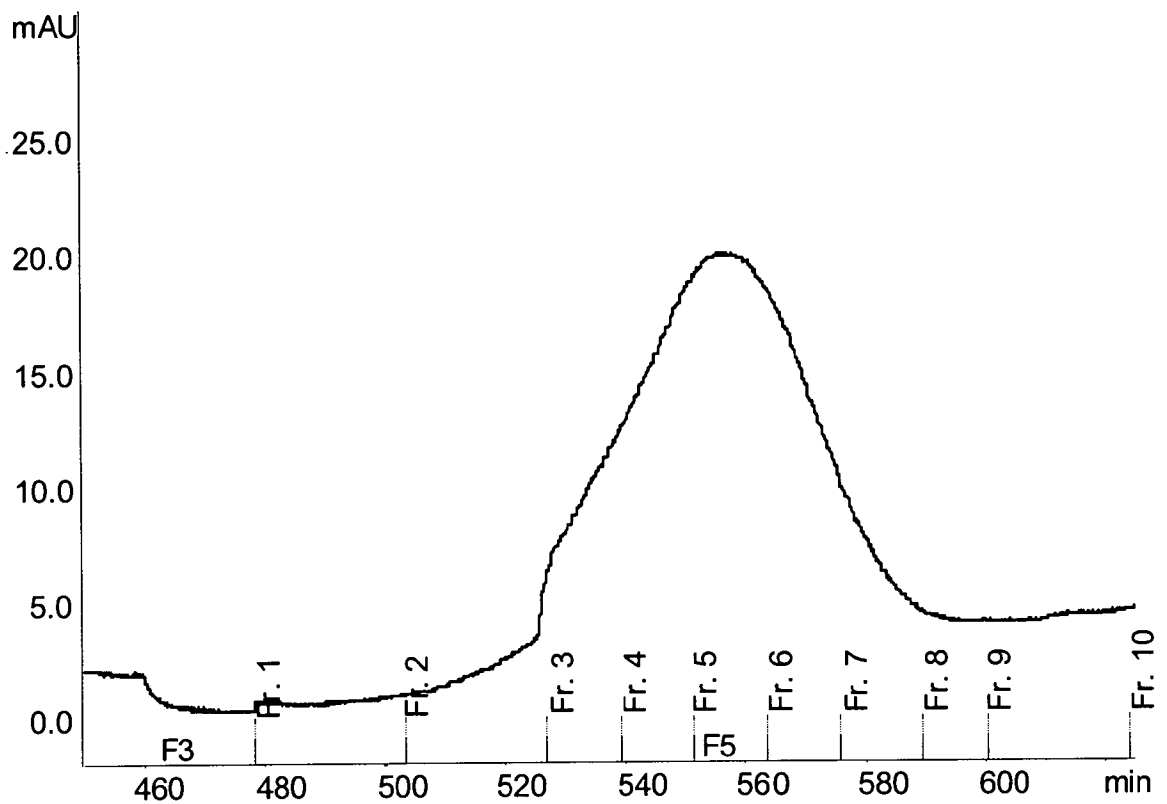
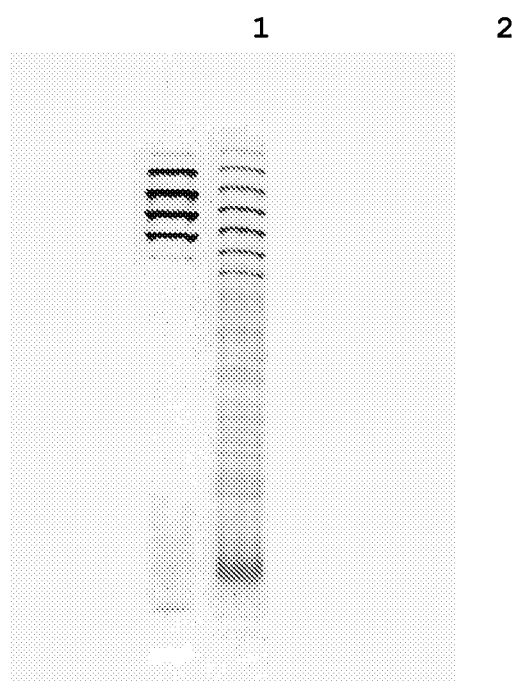
Fig. 2

Fig. 3

1 Erypo®-Präparat

2 DEAE 30 EPO-Eluatfraktion

Fig. 4

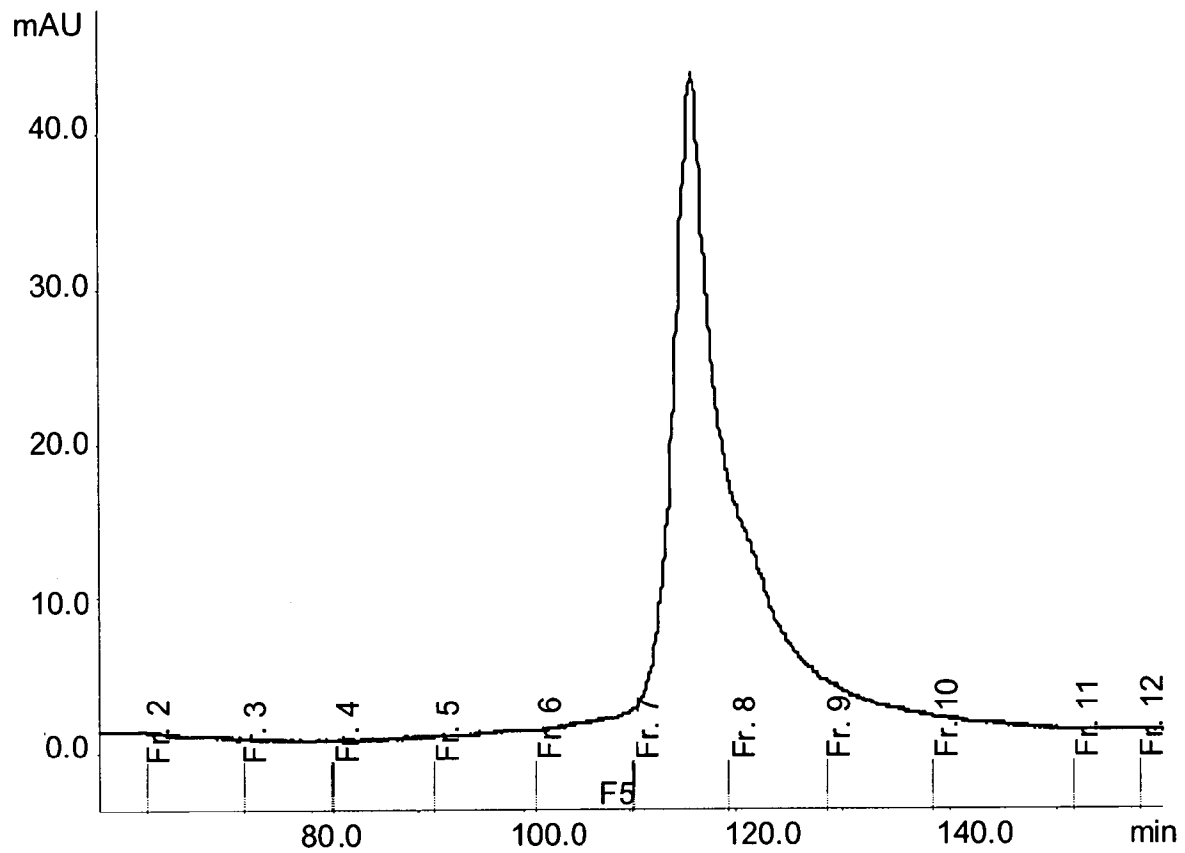
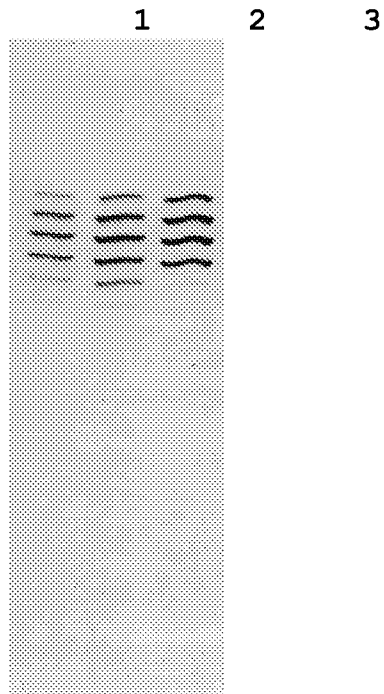


Fig. 5

1 Hydroxyapatit EPO-Eluatfraktion (Konzentration 1, niedrig)

2 Hydroxyapatit EPO-Eluatfraktion (Konzentration 1, hoch)

3 Erypo®-Präparat

Fig. 6

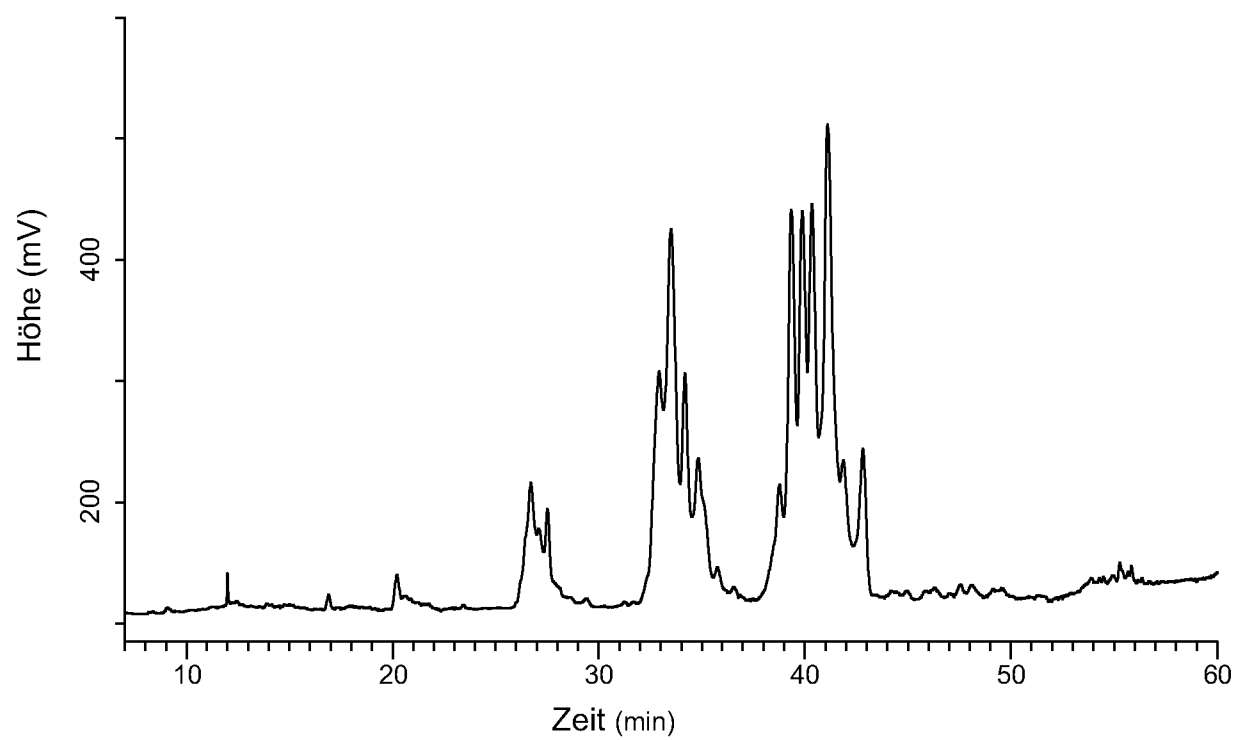
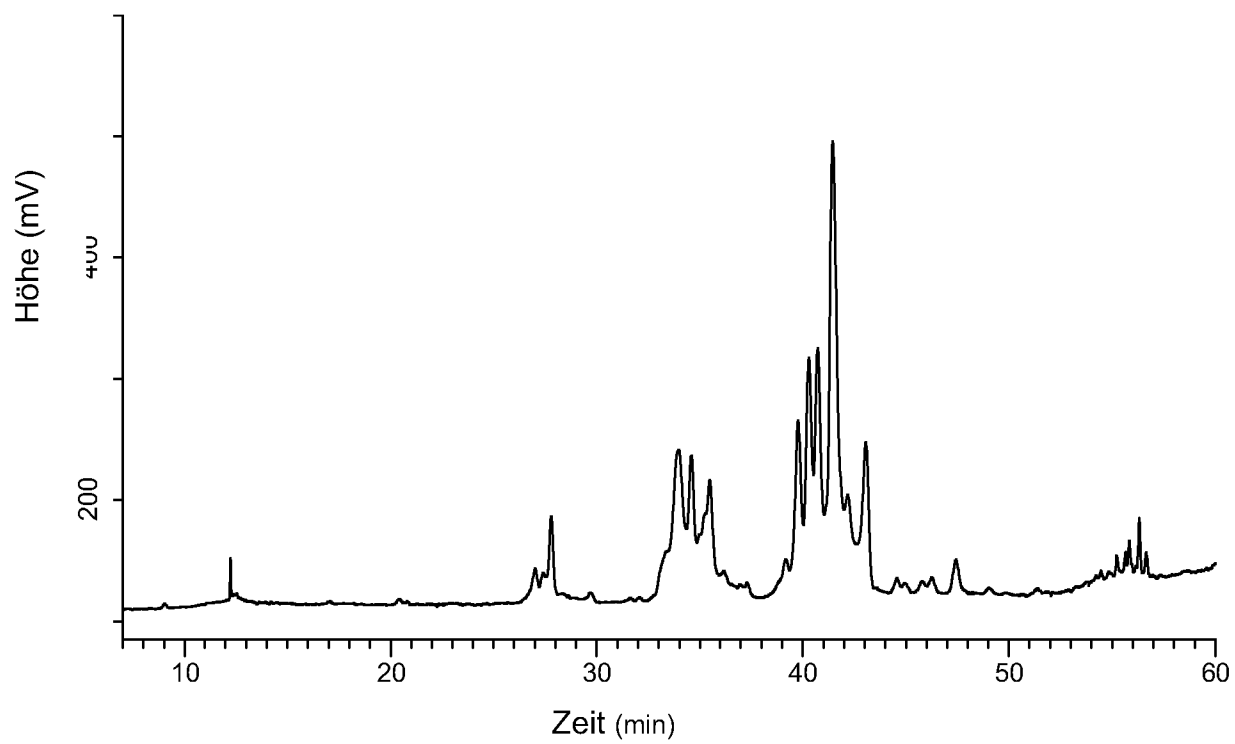


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/056544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/505

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1 548 031 A (DUBAI GENETICS FZ LLC [AE]) 29 June 2005 (2005-06-29) paragraph [0043]; claim 41 -----	1-17
Y	WO 86/07594 A (KIRIN AMGEN INC [US]) 31 December 1986 (1986-12-31) claim 1 -----	1-17
Y	HU YUNLONG ET AL: "An improved, inexpensive procedure for the large-scale purification of recombinant human erythropoietin." BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY AUG 2004, vol. 40, no. Pt 1, August 2004 (2004-08), pages 89-94, XP000912276 ISSN: 0885-4513 the whole document ----- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2009

Date of mailing of the international search report

30/09/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/056544

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZANETTE D ET AL: "EVALUATION OF PHENYLBORONATE AGAROSE FOR INDUSTRIAL-SCALE PURIFICATION OF ERYTHROPOIETIN FROM MAMMALIAN CELL CULTURES" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 101, no. 3, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 275-287, XP008065442 ISSN: 0168-1656 the whole document -----	1-17
A	QIAN R L ET AL: "Purification of murine erythropoietin produced in serum-free cultures of erythroleukemia cells." BLOOD JUL 1986, vol. 68, no. 1, July 1986 (1986-07), pages 258-262, XP002546001 ISSN: 0006-4971 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/056544

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1548031	A	29-06-2005	AU 2004309170 A1	14-07-2005
			WO 2005063809 A1	14-07-2005
			US 2007275882 A1	29-11-2007
WO 8607594	A	31-12-1986	AT 120208 T	15-04-1995
			AU 606578 B2	14-02-1991
			AU 6123086 A	13-01-1987
			CA 1297635 C	17-03-1992
			DE 3650276 D1	27-04-1995
			DE 3650276 T2	27-07-1995
			DK 81387 A	18-02-1987
			EP 0228452 A1	15-07-1987
			ES 8801381 A1	01-03-1988
			GR 861624 A1	21-10-1986
			IE 69343 B1	04-09-1996
			IL 79176 A	21-06-1992
			JP 6098019 B	07-12-1994
			PT 82811 A	01-07-1986

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07K14/505

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 1 548 031 A (DUBAI GENETICS FZ LLC [AE]) 29. Juni 2005 (2005-06-29) Absatz [0043]; Anspruch 41	1-17
Y	WO 86/07594 A (KIRIN AMGEN INC [US]) 31. Dezember 1986 (1986-12-31) Anspruch 1	1-17
Y	HU YUNLONG ET AL: "An improved, inexpensive procedure for the large-scale purification of recombinant human erythropoietin." BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY AUG 2004, Bd. 40, Nr. Pt 1, August 2004 (2004-08), Seiten 89-94, XP000912276 ISSN: 0885-4513 das ganze Dokument	1-17
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. September 2009

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/09/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heder, Andreas

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ZANETTE D ET AL: "EVALUATION OF PHENYLBORONATE AGAROSE FOR INDUSTRIAL-SCALE PURIFICATION OF ERYTHROPOIETIN FROM MAMMALIAN CELL CULTURES" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 101, Nr. 3, 1. Januar 2003 (2003-01-01), Seiten 275-287, XP008065442 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-17
A	QIAN R L ET AL: "Purification of murine erythropoietin produced in serum-free cultures of erythroleukemia cells." BLOOD JUL 1986, Bd. 68, Nr. 1, Juli 1986 (1986-07), Seiten 258-262, XP002546001 ISSN: 0006-4971 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/056544

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 1548031	A	29-06-2005	AU	2004309170 A1	14-07-2005
			WO	2005063809 A1	14-07-2005
			US	2007275882 A1	29-11-2007

WO 8607594	A	31-12-1986	AT	120208 T	15-04-1995
			AU	606578 B2	14-02-1991
			AU	6123086 A	13-01-1987
			CA	1297635 C	17-03-1992
			DE	3650276 D1	27-04-1995
			DE	3650276 T2	27-07-1995
			DK	81387 A	18-02-1987
			EP	0228452 A1	15-07-1987
			ES	8801381 A1	01-03-1988
			GR	861624 A1	21-10-1986
			IE	69343 B1	04-09-1996
			IL	79176 A	21-06-1992
			JP	6098019 B	07-12-1994
			PT	82811 A	01-07-1986
