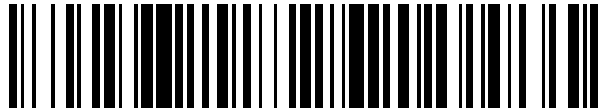


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 272**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09815645 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2334699**

54 Título: **Purificación de la eritropoyetina**

30 Prioridad:

23.09.2008 EP 08016678

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.12.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SCHMALZ, CHRISTIAN y
SCHMELZER, ANTJE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 435 272 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

Purificación de la eritropoyetina.

5 En la presente memoria se da a conocer un método para purificar eritropoyetina (EPO) utilizando cromatografía en hidroxapatito. Además, se describe un método para el empobrecimiento en proteínas de la célula huésped, así como a un método para modificar la distribución de isoformas de una composición de EPO.

Antecedentes de la invención

10 La eritropoyetina (EPO) es una glucoproteína humana que estimula la producción de los glóbulos rojos. Su acción y aplicación terapéutica se describen en detalle en, por ejemplo, las patentes EP nº 0 148 605, nº 0 205 564, nº 0 209 539 y nº 0 411 678, así como en Huang S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2708-2712, 1984; Lai P.H. *et al.*, J. Biol. Chem. 261:3116-3121, 1986, y Sasaki H. *et al.*, J. Biol. Chem. 262:12059-12076, 1987.

15 La EPO se encuentran presente sólo a concentraciones muy bajas en el plasma sanguíneo de las personas sanas. Es conocido el aislamiento de la EPO humana a partir de la orina de los pacientes con anemia aplásica (Miyake T. *et al.*, J. Biol. Chem. 252:5558-5564, 1977). Se ha descrito un método en siete etapas que comprende cromatografía de intercambio iónico, precipitación con etanol, filtración en gel y cromatografía de adsorción. Las patentes EP nº 0 148 605 y nº 0 205 564 dan a conocer la producción de EPO humana recombinante en células CHO. Un método para purificar EPO producido recombinantemente ha sido descrito en Nobuo I. *et al.*, J. Biochem. 107:352-359, 1990.

20 Se conocen métodos adicionales para producir y purificar eritropoyetina y describen en, entre otros, las patentes EP nº 0 148 605, nº 0 205 564, nº 0 255 231, nº 0 830 376, nº 0 267 678, nº 0 228 452, nº 1 127 063, nº 0 209 539, nº 0 358 463, nº 1 010 758, nº 0 820 468, nº 0 984 062, nº 0 640 619, nº 0 428 267, nº 1 037 921 y en Lai P.H. *et al.*, J. Biol. Chem. 261:3116-3121, 1986; Broudy V.C. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 265:329-336, 1988; Zou Z. *et al.*, Journal of Chrom. 16:263-264, 1998; Inoue N. *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 17:180-184, 1994; Qian R.L. *et al.*, Blood 68(1):258-262, 1986; Krystal G. *et al.*, Blood 67(1):71-79, 1986; Lange R.D. *et al.*, Blood Cells 10(2-3):305-314, 1984; Sasaki R. *et al.*, Methods Enzymol. 147:328-340, 1987; Ben Ghanem A. *et al.*, Prep. Biochem. 24:127-142, 1994; Cifuentes A. *et al.*, J. Chrom. A 830:453-463, 1999; y Gokana A. *et al.*, J. Chromat. A 791:109-118, 1997.

25 La patente EP nº 1 394 179 da a conocer un método para producir eritropoyetina libre de proteínas animales. La producción de eritropoyetina mediante la activación de un gen endógeno con promotores víricos es la materia objeto de la patente EP nº 0 986 644. Se da a conocer un método para producir glucoproteínas recombinantes y en particular eritropoyetina en la patente EP nº 1 428 878. Se da a conocer un método para producir un perfil deseado de glucoisoformas de eritropoyetina en la patente EP nº 1 492 878.

30 La patente EP nº 1 428 878 da a conocer un procedimiento para la producción y purificación de eritropoyetina. Se da a conocer un método para purificar eritropoyetina en el documento WO nº 2005/121173. En el documento WO nº 99/28346 se da a conocer una eritropoyetina de elevada actividad específica. Se da a conocer una composición de eritropoyetina en el documento US nº 2004/147431. En el documento WO nº 03/080852 se da a conocer un procedimiento para la preparación de un perfil deseado de glucoisobformas de eritropoyetina.

35 Descripción resumida de la invención

40 La producción y purificación de eritropoyetina recombinante requiere varias etapas, en particular etapas de cromatografía.

45 Un primer aspecto de la invención es un método para producir eritropoyetina, que comprende por lo menos una etapa de cromatografía con una fase estacionaria que contiene hidroxapatito, que comprende las etapas de:

- 50 i) poner en contacto una solución que contiene eritropoyetina que contiene iones calcio a una concentración de 5 mM que comprende TRIS-HCl 20 mM, pH 6,9 ± 0,2, con una fase estacionaria que contiene hidroxapatito cerámico que ha sido equilibrado con una solución que contiene iones calcio a la misma concentración de 5 mM que comprende TRIS-HCl 20 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2,
- 55 ii) pasar una solución que contiene iones calcio a una concentración inferior a 0,1 mM sobre la fase estacionaria que contiene hidroxapatito cerámico que comprende TRIS-HCl 20 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2, y
- 60 iii) pasar una solución que contiene iones calcio a una concentración inferior a 0,1 mM que comprende TRIS-HCl 10 mM, pH 6,9 ± 0,2, sobre la fase estacionaria que contiene hidroxapatito cerámico, para producir de esta manera eritropoyetina.

65 En una realización, la eritropoyetina producida se empobrece en las especies des-O-EPO y des-N-EPO en comparación con la solución que contiene eritropoyetina en i). En una realización adicional, el método comprende por lo menos una etapa adicional de cromatografía además de la etapa de cromatografía con una fase estacionaria

que contiene hidroxiapatito. En una realización adicional, cada una de todas las etapas de cromatografía se basa en diferentes principios cromatográficos, en los que cada principio cromatográfico se utiliza únicamente una vez en el método. En una realización adicional, el principio o principios cromatográficos se seleccionan de entre cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de fase inversa, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de intercambio catiónico y/o cromatografía de intercambio aniónico. En una realización adicional, la secuencia de etapas cromatográficas es: cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito, cromatografía de fase opcionalmente inversa y cromatografía de intercambio aniónico. En una realización, el método según la invención comprende etapas intermedias opcionales, tales como la precipitación con sales, la concentración, la diafiltración, la ultrafiltración, la diálisis, y/o la precipitación con etanol además de las etapas de cromatografía.

En otra realización, la solución utilizada en la cromatografía en la etapa ii) y/o iii) contiene fosfato sódico o potásico 5 mM.

Todavía un aspecto adicional de la presente invención es un método para producir eritropoyetina recombinante, que comprende cultivar células huésped que contienen un ácido nucleico codificante de eritropoyetina, en un medio adecuado bajo condiciones adecuadas para producir eritropoyetina, y aislar la eritropoyetina a partir del medio de cultivo o de las células. Las células se cultivan en suspensión en una realización. En una realización adicional, las células se cultivan en un fermentador y en particular en un fermentador con un volumen de entre 10 y 50.000 l.

El aislamiento de la eritropoyetina a partir del medio de cultivo comprende las etapas siguientes:

- (a) aplicar el sobrenadante de cultivo celular a un material de cromatografía de afinidad y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina,
- (b) opcionalmente aplicar las fracciones de (a) a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina,
- (c) aplicar las fracciones de (a) o (b) a una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina utilizando un método según la presente invención, y
- (d) concentrar y/o pasar las fracciones de (c) sobre un material de HPLC de fase inversa.

La etapa (a) del método de purificación comprende pasar el sobrenadante celular, que opcionalmente puede pretratarse, sobre un material de cromatografía de afinidad. En una realización, el material de cromatografía de afinidad es uno al que se ha acoplado un pigmento azul. Un ejemplo es la sefrosa azul. En una realización, tras la elución del material de cromatografía de afinidad, el eluido que contiene eritropoyetina se pasa sobre un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en el caso de que se utilice un medio de cultivo con un contenido de suero $\geq 2\%$ (v/v) para la fermentación/producción. En una realización, el material de cromatografía de interacción hidrofóbica es butil-sefrosa. El eluido de la etapa (a) o, en caso de utilizarse, de la etapa b), se pasa sobre una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito en la etapa (c) y se aísla el eluido que contiene eritropoyetina. En una realización, la concentración se lleva a cabo mediante cromatografía de exclusión, por ejemplo filtración a través de una membrana. En este caso, la utilización de, por ejemplo, una membrana con un tamaño de exclusión de 10 kDa ha demostrado resultar ventajosa. La eritropoyetina que puede obtenerse con el método según la invención puede contener residuos de ácido siálico unidos en enlace α -2,3 y/o α -2,6.

Otro aspecto de la invención es un método para producir eritropoyetina conjugada con poli(etilenglicol) que comprende las etapas siguientes:

- a) unir covalentemente, es decir PEGilar, la eritropoyetina utilizando un reactivo poli(etilenglicol) activado,
 - b) purificar la eritropoyetina conjugada con poli(etilenglicol) mediante dos etapas sucesivas de cromatografía de intercambio catiónico, produciendo de esta manera eritropoyetina conjugada con poli(etilenglicol),
- en las que la eritropoyetina utilizada en la etapa a) se purifica o se produce mediante un método según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La posibilidad de separar cromatográficamente diferentes sustancias depende principalmente de las condiciones bajo las que se lleva a cabo la cromatografía, además de un buen relleno de la columna y de la elección del material cromatográfico (fase estacionaria). Lo anterior incluye el modo en que las impurezas y el producto se eluyen además de la elección del sistema tampón.

La presente invención da a conocer un método para purificar eritropoyetina, que comprende por lo menos una etapa de cromatografía con una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito, que comprende las etapas siguientes:

- i) poner en contacto una solución de eritropoyetina que debe purificarse que contiene iones calcio a una primera concentración, con una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito por el que se ha pasado un volumen de una solución que contiene iones calcio a una segunda concentración,

ii) pasar un volumen de una solución que contiene una concentración más baja de iones calcio que las soluciones de i), es decir, una tercera concentración, por la fase estacionaria que contiene hidroxapatito, de manera que durante este paso la eritropoyetina sigue unida/no se desprende de la fase estacionaria que contiene hidroxapatito, y

iii) pasar un volumen de una solución que contiene menos de 0,5 mM de iones calcio, es decir, a una cuarta concentración, por la fase estacionaria que contiene hidroxapatito de ii), de manera que la eritropoyetina se desprende y eluye de la fase estacionaria que contiene hidroxapatito.

En una realización, la primera y la segunda y/o la tercera y la cuarta concentraciones son diferentes. En otra realización, la tercera y cuarta concentraciones de ión calcio son 10% o menos de la primera y segunda concentraciones de ión calcio.

La eritropoyetina, que también se denomina EPO a continuación, se entiende como una proteína que presenta la capacidad biológica de estimular los procesos de diferenciación y división en células precursoras eritroides y, de esta manera, proporcionar eritrocitos. Esta proteína preferentemente es eritropoyetina humana y consiste de 165 ó 166 aminoácidos (SEC ID nº 1 y 2) con un peso molecular de aproximadamente 34 a 38 kDa. Los residuos glucosilo constituyen aproximadamente 40% del peso molecular. Los derivados y fragmentos de EPO, tales como EPO PEGilado, es decir, eritropoyetina conjugada con un poli(etilenglicol), que presentan propiedades biológicas análogas y comprenden eritropoyetina obtenida mediante el cultivo de una célula huésped productora de EPO, también pueden prepararse mediante el método según la invención. La secuencia de ADN y la secuencia proteica de la EPO humana se describen, entre otros, en las patentes EP nº 0 205 564 y nº 0 209 539.

La estructura de la EPO comprende dos puentes disulfuro y varias cadenas sacáridas. Las cadenas sacáridas, que también se denominan residuos glucosilo a continuación, se encuentran unidas al esqueleto de la proteína. Algunas cadenas se unen N-glucosídicamente a la proteína mediante residuos asparagina y una cadena se une O-glucosídicamente a la proteína mediante un residuo serina.

El ácido siálico (ácido n-acetilneuramínico) habitualmente se incorpora al final de un residuo glucosilo (ramificado o no ramificado). El residuo glucosilo posteriormente ya no puede extenderse. El ácido siálico únicamente puede unirse a un enlace α 2-3 de Gal (β 1-4) GlcNAc (Nimtz M. *et al.*, Eur. J. Biochem. 213:39-56, 1993).

El término "anteneridad" o "anteneridad de un residuo glucosilo" se refiere al grado de ramificación del residuo glucosilo. En el caso de que un residuo glucosilo presente, por ejemplo, dos brazos, el residuo glucosilo es biantenario, es decir, es un residuo glucosilo biantenario. Los residuos glucosilo pueden presentar secciones repetidas, denominadas repeticiones. Éstas son regiones en las que se repite la secuencia GlcNAc y galactosa (N-acetil-galactosamina) La longitud de cadena del residuo glucosilo y, de esta manera, también el peso molecular de la proteína, varía debido al diferente número de repeticiones (Nimtz M. *et al.*, Eur. J. Biochem. 213:39-56, 1993). En el caso de la EPO, los residuos glucosilo triantenarios pueden contener un máximo de una repetición, mientras que los residuos glucosilo tetraantenarios no pueden presentar más de dos repeticiones. Los residuos glucosilo biantenarios no presentan repeticiones.

La eritropoyetina es una proteína de glucosilación múltiple. En la naturaleza se encuentran formas e isoformas glucosiladas diferentemente glucosiladas, así como en la producción biotecnológica debido a variaciones en los residuos glucosilo y los diferentes grados de sialidación. Una elevada proporción de repeticiones también presenta un efecto positivo sobre la actividad *in vivo* (ver, por ejemplo, la patente EP nº 0 409 113).

La eritropoyetina consiste de diez isoformas principales. El término "isoforma" se refiere a un grupo de moléculas de EPO que presenta una secuencia de aminoácidos idéntica y el mismo número de residuos de ácido siálico unidos. Las isoformas presentan el mismo punto isoeléctrico y difieren con respecto al grado, complejidad y anteneridad de los residuos glucosilo unidos a la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la expresión "isoforma 2 de EPO" comprende un grupo de moléculas de EPO que presentan 14 residuos de ácido siálico. La isoforma 3 presenta 13 ácidos siálicos, etc. Además, existen formas raras de EPO que presentan ácidos siálicos adicionales que no se encuentran en los extremos. De esta manera, la isoforma 1 presenta 15 y la isoforma 1' presenta 16 ácidos siálicos unidos a los residuos glucosilo.

Un aspecto de la invención es un método para preparar eritropoyetina a alta pureza y con una distribución de isoformas de eritropoyetina, en la que el método comprende una combinación de diferentes etapas cromatográficas de manera que se modifica la distribución inicial de isoformas de la eritropoyetina. Las diferentes etapas cromatográficas del método comprenden una etapa cromatográfica con una fase estacionaria que contiene hidroxapatito y por lo menos una de las etapas cromatográficas seleccionadas de entre i) cromatografía de afinidad de pigmento, ii) cromatografía de interacción hidrofóbica, iii) cromatografía de intercambio aniónico, iv) cromatografía de fase inversa y/o v) cromatografía de permeación en gel. En una realización de dicho aspecto, se lleva a cabo un empobrecimiento en las isoformas de eritropoyetina con un número reducido de residuos de ácido siálico o se separan por completo. En esta aplicación, la expresión "por completo" se refiere a que el compuesto correspondiente ya no puede detectarse mediante un método analítico dado debido a que la concentración/cantidad es inferior al

límite de detección del método. En una realización, se lleva a cabo un empobrecimiento en las isoformas de eritropoyetina que presentan hasta tres, o hasta cuatro, o hasta cinco (inclusive) residuos de ácido siálico por cada molécula de eritropoyetina o se separan por completo. En una realización, se obtiene una eritropoyetina en la que la mezcla de isoformas comprende isoformas con 6 a 15 grupos de ácido siálico, o con 7 a 15 grupos de ácido siálico.

5 Además de los diversos residuos glucosilo e isoformas, existen formas adicionales de EPO. En el caso de las formas des-N-EPO y des-O-EPO, son especies que no han sido glucosiladas post-traduccionalmente por completo y se encuentran no glucosiladas en el residuo de serina 126 (des-O-EPO) o en el residuo de asparagina 24 (des-N-EPO).

10 El hidroxapatito es un compuesto inorgánico basado en fosfato de calcio que presenta la fórmula empírica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Como fase estacionaria cromatográfica, resulta adecuada para separar proteínas, enzimas, inmunoglobulinas y ácidos nucleicos. Se encuentra en la naturaleza principalmente en huesos y en el esmalte dental. La formación de hidroxapatito resulta favorecida por un valor de pH elevado. El hidroxapatito se disuelve a un valor de pH elevado. Los diversos mecanismos de unión del hidroxapatito se utilizan en separaciones
15 cromatográficas en las que actúa principalmente como adsorbente aunque también presenta las propiedades de un material de intercambio iónico. Resulta posible formar enlaces iónicos entre los grupos amino de carga positiva de una proteína (por ejemplo lisina) y los grupos fosfato de carga negativa de la fase estacionaria. Además, los grupos carboxilo de las proteínas (por ejemplo aspartato) pueden unirse a los iones calcio del hidroxapatito. Una característica del material es que puede tener lugar una unión compleja entre el grupo fosfato de la fase estacionaria y los iones calcio o magnesio en solución y los grupos carboxilo de la proteína (M. Kratzel, "Pharmazeutische Bioanalytik", parte 5, Universidad de Vienna).

Son conocidos diversos materiales de hidroxapatito. La eritropoyetina se une a esta matriz y en una realización se eluye a concentraciones de fosfato bajas.

25 Un material de columna adecuado es, por ejemplo, el hidroxapatito Ultrogel (BioSeptra, Alemania) o HA Biogel HT (Biorad, Alemania). La cromatografía se lleva a cabo ventajosamente a un pH aproximadamente neutro. El hidroxapatito incluido en una matriz de agarosa presenta una resistente a la presión más alta que el hidroxapatito puro (por ejemplo el disponible como HA Ultrogel). Este material presenta una distribución de tamaños heterogénea de las partículas de entre 50 y 160 nm, estando la fracción principal entre 70 y 90 nm. La superficie es muy rugosa y las partículas sólo son esféricas en un grado limitado.

En una realización diferente, la fase estacionaria que contiene hidroxapatito para la utilización en el método según la invención consiste de hidroxapatito puro sinterizado a alta temperatura y a alta presión (por ejemplo disponible como hidroxapatito cerámico CHT, de BioRad). Es un material resistente a la presión y consiste de partículas que son relativamente simétricas y uniformemente simétricas y que presentan una superficie relativamente lisa. Las partículas presentan un tamaño de aproximadamente 40 nm y una superficie específica de aproximadamente 40 m^2/g para CHT de tipo 1. El tamaño de partícula medio es de entre 20 y 30 nm. El material CHT de tipo 2 ha sido desarrollado especialmente para moléculas de mayor tamaño, tales como las inmunoglobulinas. La superficie específica de CHT de tipo 2 es 19 m^2/g y es, de esta manera, aproximadamente la mitad de CHT de tipo 1. Las partículas presentan una morfología similar al CHT de tipo 1. Las partículas también presentan un tamaño de 40 nm. De esta manera, en una realización del método según la invención, la fase estacionaria que contiene hidroxapatito es un hidroxapatito sinterizado a altas temperaturas y a altas presiones con una superficie específica de aproximadamente 40 m^2/g .

45 La figura 1 muestra un ejemplo de un cromatograma de una cromatografía de la eritropoyetina en una fase estacionaria que contiene hidroxapatito (HA-Ultrogel). El área enmarcada es el pico del producto fraccionado que se subdividió en las fracciones 1 a 16. La fracción 17 es el hombro de la curva, que se recogió como fracción separada. La pureza de las fracciones individuales se reduce prácticamente de manera lineal durante el pico (ver la figura 2).

50 Las diferentes fases estacionarias descritas que contienen hidroxapatito se compararon utilizando el mismo método cromatográfico para purificar la eritropoyetina que se describe en el Ejemplo 4.

Tabla 1: Resumen de los datos de las cromatografías de EPO.

Carga: 0,5 mg/ml de material de columna				
	HA-Ultrogel	CHT de tipo 1	CHT de tipo 2	Fast Flow
pureza [%]	99,5 -99,8	99,3 -99,8	99,8 -99,9	99,8-99,9
volumen de elución [ml]	7-8,5	8-9	8-14	11,5-14
rendimiento de producto [%]	49-59	47-54	44 -54	53
contenido de proteína de CHO [ppm]	24 -1463	109 -1463	197 -agotamiento completo	95-210
Carga: 5 mg/ml de material de columna				
Pérdida de EPO [%]	9,6	1,2	0,7	0,7
pureza del pico de producto [%]	94,6	99,9	99,8	99,3
volumen de elución [ml]	23	32	23	60

rendimiento de producto [%]	76,0	71,0	70,3	75,1
contenido de proteína de CHO [ppm]	21484	8439	8339	11598

En una realización, en el caso de que la concentración de proteína de CHO sea inferior a 15 ng/ml, la muestra se considera libre de proteína de CHO. Se ha encontrado que el material cerámico y de hidroxapatito cristalino eran comparables al cargarse con diferentes cantidades de eritropoyetina, mientras que el rendimiento, así como la calidad del producto, se reducían considerablemente con un material basado en agarosa a una carga de 5 mg de EPO/ml de material de columna. De esta manera, en la separación del material de hidroxapatito HA Ultrogel, prácticamente el 10% de la eritropoyetina se pierde durante la separación.

El análisis de las fracciones que contienen eritropoyetina mediante HPLC analítica de fase inversa (RP-HPLC) demuestra que el pico de producto presenta un hombro (figura 3) en prácticamente todas las fracciones en el lado de reducción del pico de eritropoyetina que se identificó como des-O-EPO. La proporción de des-O-EPO se determinó semicuantitativamente trazando una línea perpendicular en los cromatogramas de RP-HPLC y se muestra conjuntamente con la cantidad de EPO en la figura 4. El motivo de la formación de este hombro es que las formas de EPO que contienen residuo glucosilo biantenarío y triantenarío se encuentran empobrecidas respecto a otras en la cromatografía en hidroxapatito. Estas formas, a su vez, se eluyen directamente antes de des-O-EPO en la RP-HPLC analítica. Como resultado de este empobrecimiento selectivo, destaca el hombro des-O-EPO.

Las impurezas de tipo proteínas se encuentran distribuidas en la totalidad del pico de elución, pero las fracciones frontales eluidas contienen una menor proporción de proteína de célula huésped CHO que las fracciones posteriores (ver la figura 5).

La hidrofobicidad de la eritropoyetina se incrementa debido a las formas glucosilo de EPO más hidrofóbicas en las fracciones posteriores que contienen EPO. La cromatografía en una fase estacionaria que contiene hidroxapatito empobrece en especialmente las isoformas básicas, es decir, las isoformas que contienen menos ácido siálico. Tal como se muestra en la figura 6, el número de residuos de ácido siálico se reduce uniformemente durante las fracciones que contienen eritropoyetina. La basicidad se incrementa de la isoforma 1 a la isoforma 9. Mientras que las isoformas ácidas se encuentran enriquecidas en las primeras fracciones que contienen eritropoyetina (fracciones 1 a 5), se observa un desplazamiento considerable hacia las isoformas básicas (figura 7) en las últimas fracciones que contienen eritropoyetina (fracciones 12 a 16). El análisis de las formas glucosilo muestra que las formas de EPO hidrofílicas eluyen en las primeras fracciones, que presentan un contenido más alto de estructuras tetraantenarias y más repeticiones. Las formas más hidrofóbicas de EPO con menos repeticiones o una proporción más alta de estructuras triantenarias eluyen más tarde, el curso de las cuales es recíproco al de las formas glucosilo tetraantenarias (figura 8). La proporción de formas glucosilo biantenarias se incrementa de manera constante (figura 9), mientras que el incremento no es uniforme sino escalonado.

La figura 10 ilustra además la distribución de formas glucosilo en el pico de producto. Mientras que se encuentran presentes formas de glucosilo tetraantenario con un contenido de repeticiones elevado en las primeras fracciones que contienen EPO (por ejemplo en F1, fracción 1), existe una elevada proporción de formas glucosilo triantenario y biantenario en las últimas fracciones que contienen EPO (por ejemplo en F16, fracción 16). De esta manera, se ha encontrado que se encuentran empobrecidas las formas de EPO menos glucosiladas y eluyen después en la cromatografía en una fase estacionaria que contiene hidroxapatito con un método según la invención.

El contenido de proteínas de células huésped CHO también se incrementa en las fracciones terminales que contienen EPO. En consecuencia, puede conseguirse una buena separación y, de esta manera, un empobrecimiento en proteínas de las células huésped CHO utilizando un método cromatográfico que presenta una mejor separación entre EPO y las proteínas de las células huésped CHO, es decir, que presenta un hombro más pronunciado que contiene las proteínas de las células huésped CHO (ver la figura 11).

Esta fase estacionaria de hidroxapatito cristalino resulta adecuada debido a que el pico de producto generalmente es muy plano y presenta un hombro pronunciado. En una realización adicional, las soluciones en las etapas de lavado y elución utilizadas en la cromatografía contienen una concentración de iones fosfato de 5 mM. Se ha encontrado que esta concentración de ión fosfato resulta ventajosa para la purificación de la eritropoyetina con una fase estacionaria que contiene hidroxapatito cerámico, ya que la cantidad de proteínas de células huésped CHO en las fracciones que contienen EPO puede reducirse/empobrecerse hasta valores inferiores al límite de cuantificación o detección del método analítico correspondiente mediante la utilización de esta concentración de fosfato.

La distribución de isoformas de la eritropoyetina obtenida con las diversas fases estacionarias que contienen hidroxapatito se muestra en la figura 12. Se ha encontrado que ni la fase estacionaria que contiene hidroxapatito ni la carga presentan una influencia mayor sobre la distribución de isoformas. Una característica de las fases de hidroxapatito cerámico y cristalino es que empobrecen las isoformas básicas algo más que las fases de hidroxapatito basadas en agarosa. En una realización, la pureza de la eritropoyetina obtenida con un método según la invención es superior a 99,3% determinada mediante RP-HPLC. En una realización, opcionalmente a una carga de 5 mg/ml, la pureza de la EPO obtenida es de entre 99,3% y 99,9%, determinada mediante RP-HPLC (%=área en

porcentaje basada en el cromatograma de RP-HPLC). Las diferencias entre las fases estacionarias también se observan en el empobrecimiento/separación de las proteínas de las células huésped CHO. La fase de hidroxapatito basada en agarosa, así como la fase de hidroxapatito cristalino, resultan menos efectivas que las fases de hidroxapatito cerámico. Por lo tanto, en una realización de los métodos según la invención, la fase estacionaria que contiene hidroxapatito es una fase de hidroxapatito cerámico.

Se ha encontrado que la concentración de iones calcio contenida en las soluciones utilizadas para la cromatografía sobre una fase estacionaria que contiene hidroxapatito presenta una influencia pronunciada sobre la purificación y, por lo tanto, también sobre la pureza de la eritropoyetina obtenida de esta manera. Al reducir la concentraciones de iones calcio en las soluciones, ha resultado que la mayor parte de la eritropoyetina puede obtenerse de la fase estacionaria que contiene hidroxapatito con ayuda de una elución escalonada (es decir, mediante la etapa entre la solución tres y la solución cuatro) (ver los Ejemplos 4 y 8, y la figura 13). Al incrementar la concentración de iones calcio tras la elución de la eritropoyetina (con cambio a la quinta solución), las proteínas de las células huésped CHO y el ADN eluyen de la fase estacionaria que contiene hidroxapatito. Las fracciones de eritropoyetina obtenidas con la solución que contiene una concentración reducida de iones calcio son mucho más ácidas que las fracciones de eritropoyetina eluidas posteriormente (ver la figura 14). El lado decreciente del pico obtenido con la concentración incrementada de iones calcio es muy plano, es decir, contiene una gran cantidad de proteínas de las células huésped CHO. En contraste, el pico obtenido con la concentración reducida de iones calcio es muy simétrico.

La presente invención comprende un método para purificar eritropoyetina, que comprende por lo menos una etapa de cromatografía utilizando una fase estacionaria que contiene hidroxapatito, que comprende:

- i)
 - a) proporcionar una primera solución que contiene eritropoyetina e iones calcio a una primera concentración,
 - b) proporcionar una fase estacionaria que contiene hidroxapatito por la que se ha pasado un volumen de una segunda solución que contiene iones calcio a una segunda concentración (etapa de equilibrado),
 - c) aplicar la solución de a) a la fase estacionaria obtenida en b),
- ii) pasar una tercera solución que contiene una tercera concentración de iones calcio que es inferior a la de la primera y segunda soluciones por la fase estacionaria que contiene hidroxapatito obtenida en la etapa i) (etapa de lavado), y
- iii) pasar un volumen de una cuarta solución que contiene 0,5 mM de iones calcio o menos por la fase estacionaria que contiene hidroxapatito de ii), y de esta manera desenganchar y recuperar eritropoyetina de la fase estacionaria que contiene hidroxapatito, obteniendo de esta manera una eritropoyetina purificada (etapa de elución).

En una realización, la primera concentración de iones calcio es igual a la segunda concentración de iones calcio. En una realización adicional, la segunda y tercera soluciones contienen 2-propanol. En una realización adicional, la primera y/o la segunda concentraciones de iones calcio son 5 mM. En una realización adicional, el valor de pH de las soluciones es $6,9 \pm 0,2$. En una realización adicional, el contenido de 2-propanol es 9% (v/v). En una realización adicional, la tercera concentración de iones calcio es igual o inferior a 0,1 mM; en una realización es de entre 0,000001 mM y 0,1 mM. En otra realización, la cuarta solución contiene 0,1 mM de iones calcio o menos; en una realización entre 0,000001 mM y 0,1 mM. En una realización adicional se aplican en la columna entre 4 y 7 volúmenes de columna de la segunda solución. En una realización adicional, el volumen aplicado en la columna de la tercera solución es de entre 0,5 y 2,5 volúmenes de columna. En una realización adicional, sólo se eluye/desengancha una cantidad reducida de eritropoyetina de la fase estacionaria en la etapa ii). En una realización adicional, esta cantidad es inferior al 10%; en otra realización es inferior a 5%, y en una realización final, es inferior a 1% de la eritropoyetina unida a la fase estacionaria. En una realización adicional, los iones calcio se introducen en la solución en forma de CaCl_2 . En una realización del método según la invención, la segunda solución contiene TRIS-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v) con un pH de $6,9 \pm 0,2$. En una realización adicional, la tercera solución contiene TRIS-HCl 20 mM, NaCl 0,25 mM, 2-propanol al 9% (v/v) con un pH de $6,9 \pm 0,2$. En una realización adicional, la cuarta solución contiene TRIS-HCl 10 mM, pH $6,9 \pm 0,2$. El valor de, por ejemplo, 9% (v/v), indica que la solución se prepara proporcionando 2-propanol al 9% y añadiendo la solución preparada hasta obtener el volumen final.

La cantidad de formas glucosilo tetraantenario se encuentra incrementada en las fracciones obtenidas con la cuarta solución en comparación con las fracciones obtenidas con la quinta solución. Sin embargo, las fracciones obtenidas con la quinta solución presentan una proporción más elevada de formas glucosilo biantenarias y triantenarias. También se ha encontrado que con la quinta solución se encuentra una proporción más alta de las especies des-O-EPO y des-N-EPO en las fracciones en comparación con los análisis en CHT de tipo 2 con CaCl_2 sin modificación.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para producir eritropoyetina recombinante, que comprende cultivar células que comprenden un ácido nucleico codificante de EPO en un medio adecuado bajo condiciones adecuadas y aislar la eritropoyetina a partir del medio de cultivo o de las células. En una realización, las células se cultivan en suspensión. En una realización adicional, el cultivo se lleva a cabo en un fermentador, en particular en un fermentador que presenta un volumen de entre 10 y 50.000 l. El aislamiento de la eritropoyetina a partir del medio de cultivo de la célula comprende las etapas siguientes:

- 5 a) aplicar el sobrenadante de cultivo celular o el sobrenadante de la suspensión celular desintegrada en un material de cromatografía de afinidad y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina,
 b) opcionalmente aplicar las fracciones que contienen eritropoyetina obtenidas en la etapa a) en un material de cromatografía de interacción hidrofóbica y recuperar/recolectar las fracciones que contienen EPO,
 c) aplicar las fracciones que contienen EPO de a) o b) a una fase estacionaria que contiene hidroxapatito y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina utilizando un método según la invención, y
 d) concentrar y/o aplicar las fracciones que contienen EPO de c) en un material de HPLC de fase inversa.

10 La etapa a) del método de purificación comprende aplicar el sobrenadante de cultivo celular, que opcionalmente puede pretratarse, a un material de cromatografía de afinidad. En una realización, el material de cromatografía de afinidad es uno al que se ha acoplado covalentemente un pigmento azul. Un ejemplo del mismo es la sefarosa azul. En una realización, tras la elución del material de cromatografía de afinidad, el eluido que contiene eritropoyetina se aplica en un material de cromatografía de interacción hidrofóbica en el caso de que se haya utilizado un medio de cultivo con un contenido de suero igual o superior a 2% ($\geq 2\%$) (v/v). En una realización, el material de cromatografía de interacción es butil-sefarosa. El eluido de la etapa a) o, en caso de utilizarse, de la etapa b), se aplica en una fase estacionaria que contiene hidroxapatito en la etapa (c) del método y se recupera el eluido que contiene eritropoyetina según el método según la presente invención. En una realización, se concentra el eluido mediante cromatografía de exclusión, por ejemplo mediante filtración por membranas, en cuyo caso la utilización de un medio, por ejemplo una membrana, con un tamaño de exclusión de 10 kDa ha demostrado ser ventajosa. La eritropoyetina que puede obtenerse con el método según la invención puede contener residuos de ácido siálico unidos en enlace α -2,3 y/o α -2,6.

20 Con el fin de producir la eritropoyetina recombinante, se aísla el sobrenadante de cultivo libre de células y se somete al método según la invención. En caso necesario, adicionalmente puede llevarse a cabo una filtración para separar la turbidez y/o puede llevarse adicionalmente una concentración antes del procedimiento de purificación.

30 En la primera etapa, la cromatografía de pigmentos elimina la contaminación por proteasas. En una realización, se utiliza como pigmento una triazina azul, tal como azul Cibachron[®]. También resultan adecuados otros pigmentos triazina. El material de soporte para la cromatografía de pigmentos no resulta crucial, aunque preferentemente se utiliza un material de soporte basado en polisacáridos, tal como, por ejemplo, sefarosa, preferentemente sefarosa-6 Fast Flow. La columna se equilibra con tampón con un valor de pH de entre 4,5 y 5,5; en una realización, un pH de entre 4,85 y 5,2; en una realización adicional, con tampón acetato o ácido acético. La cromatografía se realiza, en una realización, a temperaturas de entre 1°C y 10°C; en otra realización, a una temperatura de aproximadamente 5°C. La elución/recuperación se lleva a cabo, en una realización, incrementando la concentración salina a pH ácido o neutro (en una realización a un pH de entre 5 y 7). A pH básico, en una realización a un pH de entre 8,5 y 9,5; en otra realización a un pH de entre 8,8 y 9,2, también resulta posible eluir la eritropoyetina sin ningún cambio sustancial de la concentración salina.

40 En la segunda etapa, se lleva a cabo una cromatografía en un soporte hidrofobizado. Se describen materiales adsorbentes adecuados para la cromatografía hidrofóbica en, por ejemplo, Protein Purification Methods, A Practical Approach, editado por Harris E.L.V. y Angal S., IRL Press, Oxford, Inglaterra, 1989, página 224, y Protein Purification, Janson J.C., Ryden L. (editores), VCH Publisher, Weinheim, Alemania, 1989, páginas 207 a 226. El material de soporte mismo no resulta crucial y puede ser, por ejemplo, sefarosa, un copolímero de ácido acrílico y ácido metacrílico, o gel de sílice. Resulta importante que se unan covalentemente al soporte grupos hidrofóbicos, en una realización grupos butilo. Los soportes adecuados se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo butilo Toyopearl, de Tosoh Haas, Alemania, o butil-sefarosa, de Pharmacia, Alemania). En una realización se utiliza un soporte butilado. Otros soportes alquilados o arilados ligan la eritropoyetina, en algunos casos irreversiblemente o resultan en una separación más pobre. La elución en la cromatografía hidrofóbica tiene lugar reduciendo la concentración salina (por ejemplo con un gradiente de 4 moles/l a 0 moles/l), mediante la adición de agentes caotrópicos tales como yodo, perclorato o tiocianato, o mediante la adición de alcoholes tales como glicerol, etilenglicol ó 2-propanol. En una realización, la cromatografía hidrofóbica se lleva a cabo a un pH neutro y en presencia de sal, en una realización de aproximadamente 0,75 moles/l de NaCl. También resulta posible llevar a cabo la cromatografía hidrofóbica en presencia de un alcohol de bajo peso molecular, y en una realización en presencia de isopropanol (=2-propanol). La concentración del alcohol de bajo peso molecular en el tampón de elución es aproximadamente dos a tres veces más alta que en el tampón de equilibración. En el tampón de lavado, la concentración del alcohol de bajo peso molecular es aproximadamente el doble de la del tampón de equilibración. Para la equilibración (carga del material cromatográfico) se añadió 2-propanol aproximadamente al 10-15%, en una realización aproximadamente al 10%; se añadió 2-propanol aproximadamente al 25-35%, en una realización aproximadamente al 27%, para la elución y se añadió 2-propanol al 19% al tampón de lavado (también resultan adecuadas concentraciones especificadas para otros alcoholes, indicadas en % en volumen, v/v). La cromatografía hidrofóbica puede llevarse a cabo en un amplio intervalo de temperaturas, de entre 10°C y 40°C. Sin embargo, resulta ventajoso operar a una temperatura controlada de 27°C \pm 2°C.

65 A continuación, puede llevarse a cabo según un método según la invención una separación en una fase estacionaria que contenga hidroxapatito.

Tras la etapa de hidroxapatito puede realizarse una cromatografía de fase inversa en un soporte hidrofobizado a modo de etapa opcional para la purificación. Sin embargo, lo anterior habitualmente ya no resulta necesaria al utilizar una cromatografía en hidroxapatito según la presente invención y, por lo tanto, puede omitirse. Además del tiempo ahorrado, lo anterior también reduce los costes y evita la utilización de solventes orgánicos que posteriormente deben separarse. Los materiales siguientes, por ejemplo, resultan adecuados como materiales de cromatografía para la cromatografía de fase inversa: fenil-sefarosa y octil-sefarosa (Farmacia, Suecia), butilo Toyopearl (Tosoh Haas, Alemania) o propilo-TSK (Merck, Alemania). Sin embargo, en esta etapa de procedimiento también resulta ventajoso utilizar soportes que contienen grupos alquilo más largos (por ejemplo C₈ ó C₁₈). La columna se equilibra, en una realización, en un intervalo de pH de entre 2 y 7; en otra realización, a pH 2,5, y en otra realización se utiliza ácido trifluoroacético acuoso. Para la elución se utiliza un gradiente entre el tampón de equilibración y una solución acuosa de un solvente orgánico polar, tal como, por ejemplo, acetonitrilo. El eluido ventajosamente se neutraliza después de la cromatografía.

A continuación, como etapa siguiente del método de purificación según la invención se realiza una cromatografía de intercambio aniónico. En esta etapa, en una realización se utiliza un material de cromatografía de DEAE sefarosa Fast Flow como material de columna. La equilibración tiene lugar en ella a un valor de pH de entre 6 y 9; en otra realización a pH 7,5. Opcionalmente, tras el lavado, en una realización con una solución ácida (aproximadamente de un pH de 4,5), la elución se lleva a cabo en un intervalo neutro o ligeramente básico (pH de 6 a 9, en una realización de 7,5, incrementando la fuerza iónica, en una realización con NaCl). Como tampón en una realización se utiliza tampón fosfato.

En una realización, la preparación de proteínas se lleva a cabo en lotes de entre 0,1 y 10 g. Se ha demostrado que EPO puede purificarse suficientemente para el uso terapéutico tras el cultivo en un medio que, en una realización, se encuentra libre de proteínas de mamífero naturales en el caso de que se lleve a cabo una cromatografía hidrofóbica como segunda etapa tras la cromatografía de afinidad con un pigmento (patente EP n° 1 394 179). No resulta necesario añadir inhibidores de proteasa (por ejemplo CuSO₄) antes de la purificación cromatográfica, tal como indica Nobuo I. *et al.*, J. Biochem. 107:352-359, 1990, o en el documento WO n° 86/07494. La cromatografía hidrofóbica en una realización se lleva a cabo sobre un soporte alquilado (C₄-C₁₈) o arilado (en una realización, fenilado o bencilado). En otra realización se utiliza particularmente un soporte butilado.

La expresión "completamente libre de proteínas de mamífero naturales" se refiere en la presente memoria a que la preparación no contiene dichas proteínas en cantidades detectables. La preparación se encuentra completamente libre de proteínas de mamífero añadidas deliberadamente que no se deriven de la célula huésped y, de otra manera, se añaden habitualmente al medio de cultivo para mantener y potenciar el crecimiento celular, así como para optimizar el rendimiento. Las proteínas de mamífero naturales se entienden como proteínas de mamífero de fuentes naturales, tales como humanas o animales, pero no proteínas de mamífero recombinantes, las cuales han sido producidas, por ejemplo, en procariotas tales como *E. coli*.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para producir eritropoyetina unida covalentemente a un polímero poli(etilenglicol) (eritropoyetina mono-PEGilada) que comprende las etapas siguientes:

- a) conjugar eritropoyetina con poli(etilenglicol) (PEGilación de la eritropoyetina) mediante la utilización de un reactivo PEG activado con un peso molecular de entre 20 y 40 kDa,
- b) purificar la eritropoyetina PEGilada obtenida en la etapa a) con dos etapas sucesivas de cromatografía de intercambio catiónico, utilizando cada una de ellas la misma fase estacionaria, aunque métodos de elución diferentes,
- c) aislar la eritropoyetina conjugada con PEG (poli(etilenglicol)) de la segunda fase estacionaria.

Este método resulta particularmente adecuado para purificar EPO PEGilada que ha sido producida recombinantemente y que ha sido posteriormente PEGilada químicamente. En la primera etapa del método se PEGila la eritropoyetina. El polímero poli(etilenglicol) (PEG) que se utiliza en dicha reacción presenta un peso molecular de aproximadamente 20 a 40 kDa (la expresión "peso molecular" se refiere en este contexto al peso molecular medio de poli(etilenglicol), ya que el PEG es un compuesto polimérico que no se obtiene con un peso molecular definido sino que presenta una distribución de pesos moleculares). El término "aproximadamente" se refiere a que algunas moléculas de PEG presentan un peso molecular más alto y algunas presentan un peso molecular más bajo, es decir, el término "aproximadamente" se refiere a que es una distribución de pesos moleculares en la que 95% de las moléculas de PEG presentan un peso molecular +/-10% del peso molecular indicado.

El término "PEGilación" se refiere a un enlace covalente entre una molécula de poli(etilenglicol) y el extremo N-terminal o una cadena lateral de lisina de un polipéptido. La PEGilación de proteínas se describe, entre otros, en Veronese F.M., Biomateriales 22:405-417, 2001. El poli(etilenglicol) puede unirse a las proteínas mediante diversos grupos funcionales y con diversos pesos moleculares (Francis G.E. *et al.*, Int. J. Hematol. 68:1-18, 1998; Delgado C. *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems 9:249-304, 1992). El enlace covalente del poli(etilenglicol) y la

eritropoyetina puede llevarse a cabo en solución acuosa, por ejemplo tal como se informa en el documento WO n° 00/44785; en una realización utilizando moléculas de poli(etilenglicol) (PEG) lineal o ramificado activado con NHS que presentan un peso molecular de entre 5 y 40 kDa. La reacción de PEGilación también puede llevarse a cabo como reacción en fase sólida (Lu Y. *et al.*, *Reactive Polymers* 22:221-229, 1994). Pueden obtenerse proteínas PEGiladas N-terminalmente seleccionadas según el documento WO n° 94/01451, o Felix A.M. *et al.*, *ACS Symp. Ser.* 680 (poly(ethylenglycol)) 218-238, 1997.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción del listado de secuencias

SEC ID n° 1 Eritropoyetina humana con una secuencia de aminoácidos de 165 residuos.

SEC ID n° 2 Eritropoyetina humana con una secuencia de aminoácidos de 166 residuos.

Descripción de las figuras

Figura 1 Cromatograma ejemplar de una cromatografía de eritropoyetina con una fase estacionaria que contiene hidroxapatito (HA-Ultrogel).

Figura 2 Gráfico de la pureza de fracciones individuales que contienen eritropoyetina.

Figura 3 Cromatografía analítica de una fracción que contiene eritropoyetina mediante HPLC analítica de fase inversa.

Figura 4 Diagrama del porcentaje de des-O-EPO y EPO en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 5 Distribución de las impurezas de tipo proteína en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 6 Gráfico del recuento de ácido siálico de las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 7 Distribución de las isoformas ácidas y básicas en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 8 Distribución de las formas glucosilo triantenarias en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 9 Distribución de las formas glucosilo biantenarias en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 10 Vista global de la distribución de las formas glucosilo en las fracciones que contienen eritropoyetina.

Figura 11 Ejemplo comparativo del hombro de un pico que contiene eritropoyetina.

Figura 12 Distribución de isoformas de la eritropoyetina obtenida con diferentes fases estacionarias que contienen hidroxapatito.

Figura 13 Cromatograma obtenido utilizando el método según la invención.

Figura 14 Comparación de la distribución de isoformas en los diferentes métodos cromatográficos.

40 Materiales y métodos

Tampón para la cromatografía:

Todas las soluciones se prepararon a partir de soluciones madre. Si no se indica lo contrario, el pH de todos los tampones se ajustó con NaOH 1 M o HCl 1 M. En todos los casos se utilizó agua superpura de tipo II (agua MilliQ).

Solución madre (en agua):

Tampón de fosfato potásico 1 mol/l, pH 6,9 ± 0,2,
 50 Tampón tris (hidroxiaminometano) (TRIS-HCl) 1 mol/l , pH 6,9 ± 0,2,
 Cloruro sódico 5 moles/l,
 Cloruro cálcico 1 moles/l,
 Hidróxido sódico 10 moles/l.

55 Tampón de cromatografía estándar:

Tampón de lavado estándar: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2

Tampón de relleno HA Ultrogel/Fast Flow: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2

Tampón de relleno CHT: Fosfato potásico 200 mM, pH 9-10

Tampón de regeneración 1H Ultrogel: Fosfato potásico 200 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 6,9 ± 0,2

Tampón de regeneración 1 CHT, Fast Flow: Fosfato potásico 200 mM, pH 6,9 ± 0,2

Regeneración alcalina: NaOH 0,5 M

Tampón de equilibración: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v),

Tampón de lavado: pH 6,9 ± 0,2
 TRIS-HCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2
 Tampón de elución: TRIS-HCl 10 mM, CaCl₂ 0,5 mM, fosfato potásico 10 mM, pH 6,9 ± 0,2

Tampones para determinaciones analíticas:

RP-HPLC analítica:

eluyente A: TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%, eluyente acuoso B: TFA al 0,1%, acetonitrilo al 70%, agua
 determinación de proteínas A₂₈₀:
 fosfato de Na/K 10 mM, NaCl 0,1 moles/l, pH 7,5 ± 0,2

Determinación de proteínas

Se utilizó una cubeta de cuarzo con una longitud de camino de 1 cm. Las muestras se diluyeron de manera que la absorbancia determinada se encontraba entre 0,2 y 1,0 UA. En caso de requerirse una dilución, las muestras se diluyeron independientemente y se midieron en una determinación por triplicado. Se determinaron muestras no diluidas con una sola medición. Se utilizó el tampón del producto final eritropoyetina para la dilución de muestras y para la determinación del blanco.

Las mediciones se llevaron a cabo a 280 nm. Se midió una muestra de estándar de referencia de eritropoyetina al inicio a modo de control del sistema. Las muestras reales se ajustaron previamente al análisis hasta una concentración media de las proteínas de entre 1,86 mg/ml y 2,05 mg/ml. Se calculó la concentración de las proteínas utilizando la fórmula siguiente:

$$c = \frac{A_{280}}{1,25^{(1)}} \cdot F^{(2)} [mg / ml]$$

- 1) coeficiente de extinción de una solución al 0,1%: $\epsilon = 1,25 \text{ ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{cm})^{-1}$
- 2) factor de dilución de la muestra

La cantidad de proteína la proporciona la fórmula siguiente:

$$m[g] = c[mg / ml] \cdot V[L]$$

RP-HPLC analítica:

En la RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa), todas las muestras se diluyeron con eluyente A hasta una concentración máxima de 0,12 mg/ml. Se determinó la concentración de proteína mediante mediciones fotométricas a 280 nm. Se inyectaron cuatro muestras de 100% de eluyente A antes del análisis de las muestras. Ello garantizó que la columna se encontraba completamente equilibrada. Se analizó el estándar de referencia de eritropoyetina al inicio y al final de la secuencia de muestras. Con el fin de evitar desviaciones, se analizaron los cromatogramas mediante un método de integración estandarizado. Se separó cada uno de los picos trazando una línea perpendicular a la base.

Determinación del contenido de proteínas de CHO/contenido de proteínas de la célula huésped

Se determinaron las proteínas de las células CHO mediante un ensayo ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima). En la presente memoria se utilizó un ensayo de tipo sándwich basado en la tecnología de la estreptavidina/biotina. Para el ensayo se utilizó una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Un anticuerpo dirigido contra las proteínas de las células CHO se unió a la placa mediante biotina. Se añadió la solución de muestra que debía analizarse utilizando una pipeta a una concentración de proteínas de CHO de entre 15 y 150 ng/ml. En el caso de que la concentración fuese inferior a 15 ng/ml, la muestra se consideró que se encontraba libre de proteínas de CHO. En el caso de que la concentración fuese superior a 150 ng/ml, se repetía el ensayo a una dilución más alta.

Se indican los resultados como proteínas de CHO [ppm].

$$\frac{\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \text{ CHO}}{\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ EPO}} = \text{ppm}$$

Determinación de la distribución de isoformas

Se determinó la distribución de las isoformas mediante electroforesis capilar. Para el análisis, la muestra se diafiltró

en agua. A continuación, el capilar se enjuagó con una solución de electrolitos, seguido de la aplicación de las muestras diluidas en el capilar. La separación tuvo lugar mediante la aplicación de un voltaje elevado, de 25.000 V. El tampón móvil presentaba un exceso de iones positivos, lo que resultaba en un flujo electroosmótico. La utilización de un capilar de cuarzo permitió una detección fotométrica de las proteínas en el capilar y una determinación cuantitativa a partir de las áreas de los picos.

Análisis de azúcares

Para el análisis de los azúcares se utilizó un procedimiento de ensayo enzimático. En este procedimiento, se cortaron los oligosacáridos unidos N-glucosídicamente de la eritropoyetina utilizando el enzima N-glucosidasa. Además, se eliminaron los ácidos siálicos de los oligosacáridos con ayuda del enzima neuramidasa. Los N-oligosacáridos obtenidos se separaron y se analizaron utilizando un intercambiador de aniones. Se midió un estándar de referencia de eritropoyetina que se trató exactamente de la misma manera que las muestras, durante la serie de ensayos. Se detectaron las estructuras de azúcares siguientes: biantenarico, triantenarico, triantenarico 1 repetición, tetraantenarico, tetraantenarico 1 repetición, tetraantenarico 2 repeticiones.

Cromatografía de exclusión (SE-HPLC)

Para la SE-HPLC, la columna cromatográfica se equilibró con tres a cinco volúmenes de columna (VC) de tampón con el fin de obtener una línea base uniforme sin picos adicionales antes de iniciar la separación. Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 0,2 mg/ml y se inyectaron en la SE-HPLC. Los picos se integraron según métodos estándares. Los picos se separaron unos de otros trazando perpendiculares.

Determinación del ADN

Se unió biotina a una placa de microtitulación. Se añadió una mezcla de reacción de estreptavidina, ADN de cadena sencilla y proteína ligante biotinilada de ADN de cadena sencilla. La proteína ligante era capaz de unirse al ADN y se encontraba biotinilada. De esta manera resultó posible eliminar específicamente el ADN de la mezcla de muestra. La estreptavidina ligaba la biotina sobre la placa de microtitulación, y además la biotina se acoplaba a la proteína ligante de ADN de cadena sencilla. A este complejo total se añadió un anticuerpo específico de ADN que se acopló a ureasa. La adición de urea resultó en una hidrólisis de la urea, lo que provocaba un cambio local del pH. Este cambio se detectaba como una alteración del potencial de superficie. El cambio de potencial de superficie era proporcional a la cantidad de ADN unido. Se obtuvo el ADN de cadena sencilla mediante digestión con proteinasa K y desnaturalización con SDS.

Mapa peptídico

Las especies de eritropoyetina incompletamente glucosiladas, tales como des-O-epo y des-N-EPO pueden determinarse cuantitativamente mediante mapeado de péptidos. Con este fin, se cortó la molécula de eritropoyetina en péptidos con la endoproteinasa Lys-C y estos péptidos se separaron mediante HPLC. El patrón de péptidos obtenido se comparó con un estándar de referencia. Los resultados obtenidos se compararon con el estándar con respecto al tamaño del pico, el tiempo de aparición del pico y el tiempo de retención.

Ejemplo 1

Producción recombinante de eritropoyetina en células CHO

La EPO se produce en las células CHO mediante un método por lotes. Se inoculó el fermentador con un precultivo y tras aproximadamente cinco días, se recolectó el contenido del mismo. Se separaron las células CHO intactas y fragmentos celulares del sobrenadante de fermentación mediante centrifugación. Se ajustó el pH del sobrenadante de cultivo libre de células utilizando ácido acético (1 mol/l) hasta pH 5,0-5,2 y la solución de pH ajustado seguidamente se filtró a 1-9°C. Se utilizó un medio sin suero como medio de cultivo, que consistía del medio base DME (HG)/F-12 de Ham modificado (R5) (GRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, USA, nº de pedido 57-736), hidrogenocarbonato sódico, L-(+) glutamina, D-(+) glucosa, insulina recombinante, selenita sódica, diamino-butano, hidrocortisona, sulfato de hierro (II), asparagina, ácido aspártico, serina y alcohol polivinílico.

Ejemplo 2

Cromatografía en sefarosa azul

La sefarosa azul (Pharmacia) consiste de perlas de sefarosa a las que se ha unido covalentemente el pigmento Cibachron®. La eritropoyetina se une a este soporte con baja fuerza iónica y a valores de pH neutros a ácidos. La eritropoyetina se eluye incrementando la fuerza iónica y el valor del pH.

La columna de cromatografía (Amicon P440 x 500, Amicon, GB) se rellena con 60-80 l Seфарosa azul y se regenera

con NaOH 0,5 N. A continuación, la columna se equilibró con aproximadamente tres volúmenes de columna (VC) de tampón acetato. El sobrenadante de cultivo libre de células ajustado a pH 5 se adsorbió a la columna a una temperatura de 10°C ± 5°C y un caudal de 800 a 1.400 ml/min. La columna se lavó nuevamente al mismo caudal y a 5°C ± 4°C con aproximadamente 1 VC de tampón de lavado, seguido de aproximadamente 2 VC de tampón de lavado 2. A continuación, la columna se eluyó con aproximadamente 3 VC de tampón de elución. Se recolectó el pico de proteínas completo (aproximadamente 30 a 60 l), ajustado a pH 6,9 con HCl y se almacenó a 5°C ± 4°C hasta el procesamiento posterior. La solución de producto se concentró en esta etapa de cromatografía, alcanzando una pureza de aproximadamente 40% a 50%.

Tampón de equilibración: Acetato de Na 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,1 M, pH 5,0 ± 0,2
 tampón de lavado 1: Acetato de Na 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, pH 5,0 ± 0,2
 tampón de lavado 2: Tampón TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,5 ± 0,3, TRIS-HCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM,
 de elución: NaCl 1 M, pH 9,0 ± 0,2

Ejemplo 3

Cromatografía en butilo Toyopearl (cromatografía hidrofóbica)

El butilo Toyopearl (Tosoh Haas) es un soporte sobre el que se encuentran unidos covalentemente a la superficie residuos butilo. La eritropoyetina se unió a esta matriz y se eluyó con un tampón que contenía 2- propanol.

Tras unir la proteína a la matriz de butilo en un tampón de equilibración que contenía 2-propanol al 10%, la eritropoyetina se eluyó con un gradiente consistente de solución tampón acuosa y 2-propanol al 50%. La elución se inició con 2-propanol aproximadamente al 20%.

La columna de cromatografía (Pharmacia BPG 300/500) se rellenó con 30-40 l butilo Toyopearl y se regeneró con HCl de guanidina 4 M y NaOH 0,5 N. A continuación, la columna se equilibró con por lo menos tres VC de tampón de equilibración. El eluido de la columna de sefrosa azul se ajustó a 2-propanol al 10% y se adsorbió en la columna a una temperatura de 27°C ± 2°C y un caudal de 800 a 1.200 ml/min. La columna se lavó nuevamente con aproximadamente un VC de tampón de equilibración a la misma temperatura y caudal y después con aproximadamente dos VC de tampón de lavado. A continuación, la eritropoyetina se eluyó con aproximadamente tres VC de tampón de elución. Se recolectó el pico de proteínas completo (aproximadamente 10 a 18 l), se diluyó inmediatamente tres veces con tampón de dilución y se almacenó a 15°C. Se alcanzó una pureza de aproximadamente 90% en esta cromatografía.

tampón de equilibración: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,75 M, 2-propanol al 10%, pH 6,9 ± 0,2
 Tampón de lavado: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,75 M, 2-propanol al 19%, pH 6,9 ± 0,2
 Tampón de elución: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,75 M, 2-propanol al 27%, pH 6,9 ± 0,2
 tampón de dilución: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2
 primera solución: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2

Ejemplo 4

Cromatografía en fases estacionarias que contienen hidroxiapatito

Se han utilizado las mismas etapas metodológicas básicas en la separación de cada una de las fases estacionarias que contienen hidroxiapatito con el fin de alcanzar una buena comparabilidad basada en las condiciones de procedimiento actuales. La secuencia era:

regeneración -equilibración -separación -regeneración.

Los tampones se adaptaron según las instrucciones del fabricante para la regeneración.

Tabla 2: regeneración -equilibración.

Regeneración			
	HA Ultrogel	Fast Flow	CHT de tipo 1 y de tipo 2
etapa 1	tampón de regeneración 1 HA Ultrogel	tampón de regeneración 1 CHT, Fast Flow	tampón de regeneración 1 CHT tipo 1, 2
etapa 2	regeneración alcalina	regeneración alcalina	regeneración alcalina
etapa 3			tampón de regeneración 1 CHT tipo 1, 2
etapa 4	equilibración	equilibración	equilibración

Separación	
etapa 1	adsorción
etapa 2	lavado 1 (tampón de equilibración)
etapa 3	lavado 2 (tampón de lavado)
etapa 4	elución

Los parámetros de la cromatografía para las separaciones se muestran en la Tabla 4, a continuación. Se utilizaron los mismos para todos los materiales.

5

Tabla 4: parámetros de la cromatografía.

etapa del procedimiento	Tampón	volumen
tampón de reg. 1	tampón de regeneración 1	2,3 VC (1,79 a 2,69 VC)
regeneración	tampón de regeneración básico (NaOH)	2,15 VC (1,79 a 2,69 VC)
lavado	tampón de lavado estándar	6,5 VC (5,97 a 8,95 VC)
equilibración	tampón de equilibración	5,75 VC
adsorción	solución que debe separarse	Varía según la concentración de proteínas cargada: 0,5 -5 mg/ml
lavado 1	tampón de equilibración	1,3 VC (0,77 a 1,15 VC)
lavado 2	tampón de lavado	2,3 VC (1,54 a 2,31 VC)
elución	tampón de elución	aproximadamente 2,6 VC (según se requiera)

10

Se recolectaron los picos basándose en la señal de absorción de UV. Se inició la recolección a 15 mUA y se detuvo tras superar el máximo del pico respectivo al nivel de 40 mUA. Se llevó a cabo la regeneración tras la separación. Los picos de la elución y de las etapas de regeneración se recolectaron y se almacenaron a -20°C. Los límites de corte para la generación se fijaron entre 15 mUA en el lado creciente y 15 mUA en el lado decreciente. El caudal de elución se varió entre 0,35 cm/min y 1,7 cm/min en las etapas individuales.

15

Soluciones estándares:

- tampón de lavado estándar: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2
- Tampón de relleno HA Ultrogel/Fast Flow: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2
- Tampón de relleno CHT: Fosfato potásico 200 mM, pH 9-10
- Tampón de regeneración 1H Ultrogel: Fosfato potásico 200 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH 6,9 ± 0,2
- Tampón de regeneración 1 CHT, Fast Flow: Fosfato potásico 200 mM, pH 6,9 ± 0,2
- Regeneración alcalina: NaOH 0,5 M
- tampón de equilibración: TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2
- Tampón de lavado: TRIS-HCl 10 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2
- Tampón de elución: TRIS-HCl 10 mM, CaCl₂ 0,5 mM, fosfato potásico 10 mM, pH 6,9 ± 0,2

Ejemplo 5

20

Cromatografía en hidroxapatito Ultrogel

El hidroxapatito Ultrogel (BioSeptra) consiste de hidroxapatito que se encuentra incorporado en un esqueleto de agarosa con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas e hidrodinámicas. La eritropoyetina se une a esta matriz y resulta eluida a una concentración de fosfato más baja que la mayoría de las impurezas proteicas.

25

La columna de cromatografía (Amicon P440 x 500 ó equivalente) se relleno con 30-80 l hidroxapatito Ultrogel y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación, la columna se equilibró con por lo menos tres VC de tampón de equilibración. La solución de eritropoyetina que debía purificarse se adsorbió a la columna a una temperatura de aproximadamente 15°C y un caudal de 500 a 1.200 ml/min. La columna se lavó nuevamente con aproximadamente un VC de tampón de equilibración y después con aproximadamente dos VC de tampón de lavado a la misma temperatura y caudal. A continuación, se eluyó con aproximadamente 3 VC de tampón de elución. Se recolectó el pico de proteínas completo (aproximadamente 10 a 18 l) y se almacenó a 15°C hasta el procesamiento posterior. Se alcanzó una pureza superior al 95% en esta cromatografía.

30

tampón de equilibración: acetato de Na 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,1 M, pH 5,0 ± 0,2

tampón de lavado 1:	acetato de Na 20 mM, CaCl ₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, pH 5,0 ± 0,2
tampón de lavado 2:	TRIS-HCl 20 mM, CaCl ₂ 5 mM, pH 6,5 ± 0,3
Tampón de elución:	TRIS-HCl 100 mM, CaCl ₂ 5 mM, NaCl 1 M, pH 9,0 ± 0,2

Ejemplo 6

Cromatografía Fast Flow en hidroxiapatito

5 Esta material fue suministrado por el fabricante en forma de un sólido. Se dosificó una cantidad apropiada de material y se suspendió en tampón de lavado estándar. Se incubaron los polvos en el tampón durante unas cuantas horas con el fin de humectar la superficie completa de las partículas. Se utilizó una suspensión de gel fina (aproximadamente al 20% (v/v)) para el relleno. La columna se empaquetó sin presión, permitiendo que el material de gel sedimentase durante dos días. Tras completarse la sedimentación del gel, la columna se enjuagó con cinco
10 VC a un caudal de 0,5 ml/min (0,64 cm/min). A continuación, se regeneró la columna.

La cromatografía se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 7

15 Cromatografía en hidroxiapatito CHT

Los materiales cerámicos (CHT de tipos 1 y 2) fueron suministrados por el fabricante en forma de un sólido. La cantidad de relleno se dosificó y se suspendió en tampón de relleno CHT tipo 1, 2. El CHT se incubó durante unas
20 cuantas horas en tampón de relleno con el fin de humectar la totalidad de la superficie del material. Se utilizó una suspensión de gel fino (aproximadamente al 20% (v/v)) para el relleno y se rellenó la columna con la suspensión entera y se empaquetó a un caudal de 1 ml/min (1,3 cm/h). Tras sedimentar por completo el gel, se regeneró la columna.

25 La cromatografía se llevó a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 8

30 Cromatografía en hidroxiapatito CHT según la invención sin CaCl₂

Se empaquetó la columna tal como se ha indicado en el Ejemplo 7 y la cromatografía se llevó a cabo tal como se ha indicado en el Ejemplo 4.

35 En contraste con el Ejemplo 4, se utilizaron las soluciones siguientes:

segunda solución:	TRIS-HCl 20 mM, CaCl ₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2
tercera solución:	TRIS-HCl 20 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v), pH 6,9 ± 0,2
cuarta solución:	TRIS-HCl 10 mM, pH 6,9 ± 0,2
quinta solución:	TRIS-HCl 10 mM, CaCl ₂ 5 mM, fosfato potásico 10 mM, pH 6,9 ± 0,2

Ejemplo 9

40 HPLC de fase inversa (RP-HPLC)

El material de RP-HPLC, por ejemplo Vydac C4 (Vydac, USA) consiste de partículas de gel de sílice cuya superficie porta cadenas de alquilo C4. La eritropoyetina se une a esta matriz como resultado de interacciones hidrofóbicas y resulta selectivamente eluida con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido.

45 La HPLC preparativa se llevó a cabo con un sistema de separación Prepbar 100 de Merck (o equivalente) a una temperatura de 22°C ± 4°C. La columna de separación (100 mm x 400 mm, 3.2 1) se empaquetó con material Vydac C4. Antes de la utilización, la columna se regeneró mediante la aplicación varias veces de un gradiente de tampón A a solvente al 100% y posteriormente se equilibró con tampón A. El eluido de la columna de hidroxiapatito se acidificó a aproximadamente pH 2,5 con ácido trifluoroacético y se esterilizó mediante filtración. A continuación, se adsorbió la eritropoyetina a la columna a una temperatura de 22°C ± 4°C y a un caudal de 250-310 ml/min. La columna se
50 eluyó con un gradiente lineal de tampón A a tampón B a la misma temperatura y caudal. Se recogió el pico de elución en fracciones. El eluido se neutralizó inmediatamente mediante la adición de cuatro volúmenes de tampón de dilución de HPLC.

55 Se agruparon las fracciones que presentaban una pureza de por lo menos 99% en la HPLC analítica (volumen del agrupado de aproximadamente 4 a 6 l). Se separaron las impurezas traza en esta cromatografía y se alcanzó una pureza superior al 99%.

ES 2 435 272 T3

tampón A:	ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
tampón B:	acetonitrilo al 80%, ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
tampón de dilución de HPLC:	fosfato de Na/K 10 mM, pH 7,5 ± 0,2

Ejemplo 10

Cromatografía FF en DEAE-sefarosa

- 5 La Fast Flow en DEAE-sefarosa (Pharmacia) consiste de grupos DEAE que se encuentran unidos covalentemente a la superficie de perlas de sefarosa. La eritropoyetina se une a esta matriz como resultado de interacciones iónicas y se eluye incrementando la fuerza iónica.
- 10 La columna de cromatografía (Amicon P90 x 250 ó equivalente) se rellenó con 100 a 200 ml de gel por g de eritropoyetina en la muestra aplicada y se regeneró con NaOH 0,5 M. A continuación, la columna se equilibró con tampón de Na/K 100 mM, pH 7,5 y posteriormente con por lo menos 12 VC de tampón de equilibración. El eluido de la columna de HPLC se adsorbió a la columna a una temperatura de 5°C ± 4°C y a un caudal de aproximadamente 150 ml/min. La columna se lavó con como mínimo cinco VC de tampón de equilibración y después con
- 15 aproximadamente diez VC de tampón de lavado a la misma temperatura y caudal. A continuación, la columna se lavó nuevamente con aproximadamente diez VC de tampón de equilibración y la eritropoyetina se eluyó con aproximadamente siete VC de tampón de elución. Se recolectó el pico de proteínas completo (aproximadamente 2 a 5 l), se esterilizó mediante filtración y se dispensó.
- 20 En esta cromatografía, se separó el solvente de la etapa de HPLC y se eliminaron las impurezas traza. La pureza era superior al 99%.

tampón de equilibración:	fosfato de Na/K 10 mM, pH 7,5 ± 0,2
tampón de lavado:	acetato de Na 30 mM, pH 4,5 ± 0,1
tampón de elución:	fosfato de Na/K 10 mM, NaCl 80 mM, pH 7,5 ± 0,2

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Purificación de eritropoyetina
- 30 <130> 25389 WO
- <150> EP08016678.8
- <151> 2008-09-23
- 35 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 40 <211> 165
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 45 <400> 1

ES 2 435 272 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

- <210> 2
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

ES 2 435 272 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

REIVINDICACIONES

1. Método in vitro de purificación de eritropoyetina, que comprende:
- 5 a) proporcionar una solución que contiene: i) eritropoyetina, e ii) iones calcio a una primera concentración, que comprende TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6,9 ± 0,2,
 - b) proporcionar una columna de cromatografía que contiene una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito cerámico,
 - 10 c) aplicar una solución que contiene iones calcio a una segunda concentración en la columna de b) que comprende TRIS-HCl 20 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v) con un pH de 6,9 ± 0,2,
 - d) aplicar la solución de a) en la columna obtenida en c),
 - e) aplicar una solución que contiene iones calcio a una tercera concentración en la columna obtenida en d) que comprende TRIS-HCl 20 mM, NaCl 0,25 M, 2-propanol al 9% (v/v) con un pH de 6,9 ± 0,2, y
 - 15 f) recuperar la eritropoyetina purificada mediante la aplicación de una solución que contiene iones calcio a una cuarta concentración en la columna obtenida en e) que comprende TRIS-HCl 10 mM, pH 6,9 ± 0,2, en el que dichas primera y segunda concentraciones de ión calcio son iguales y dichas tercera y cuarta concentraciones de ión calcio son iguales, inferiores a dichas primera y segunda concentraciones de ión calcio, en el que dichas tercera y cuarta concentraciones de ión calcio son de 0,1 mM o inferiores.
- 20 2. Método de producción de eritropoyetina mediante la utilización de una secuencia de etapas cromatográficas tal como la siguiente:
- i) cromatografía de afinidad, ii) cromatografía de interacción hidrofóbica, iii) cromatografía en una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito cerámico, en la que la cromatografía en una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito se lleva a cabo según la reivindicación 1.
- 25 3. Método de producción de eritropoyetina, que comprende cultivar células que contienen un ácido nucleico codificante de EPO y aislar la eritropoyetina a partir de las células o del medio de cultivo, caracterizado porque el aislamiento de eritropoyetina comprende las etapas siguientes:
- 30 i) aplicar el sobrenadante celular en un material de cromatografía de afinidad y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina, ii) opcionalmente aplicar las fracciones que contienen eritropoyetina obtenidas de i) en un material de cromatografía de interacción hidrofóbica y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina,
 - 35 iii) aplicar las fracciones que contienen eritropoyetina de i) o ii) en una fase estacionaria que contiene hidroxiapatito cerámico y recuperar/recolectar las fracciones que contienen eritropoyetina utilizando un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Método de producción de eritropoyetina mono-PEGilada, que comprende las etapas siguientes:
- 40 i) purificar la eritropoyetina con un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, ii) PEGilar la eritropoyetina utilizando un PEG activado con un peso molecular de entre 20 kDa y 40 kDa, iii) purificar la eritropoyetina PEGilada obtenida en la etapa ii) con dos etapas sucesivas de cromatografía de intercambio catiónico utilizando la misma fase estacionaria,
 - 45 iv) recuperar y producir de esta manera eritropoyetina mono-PEGilada a partir de la segunda fase estacionaria.

Fig. 1

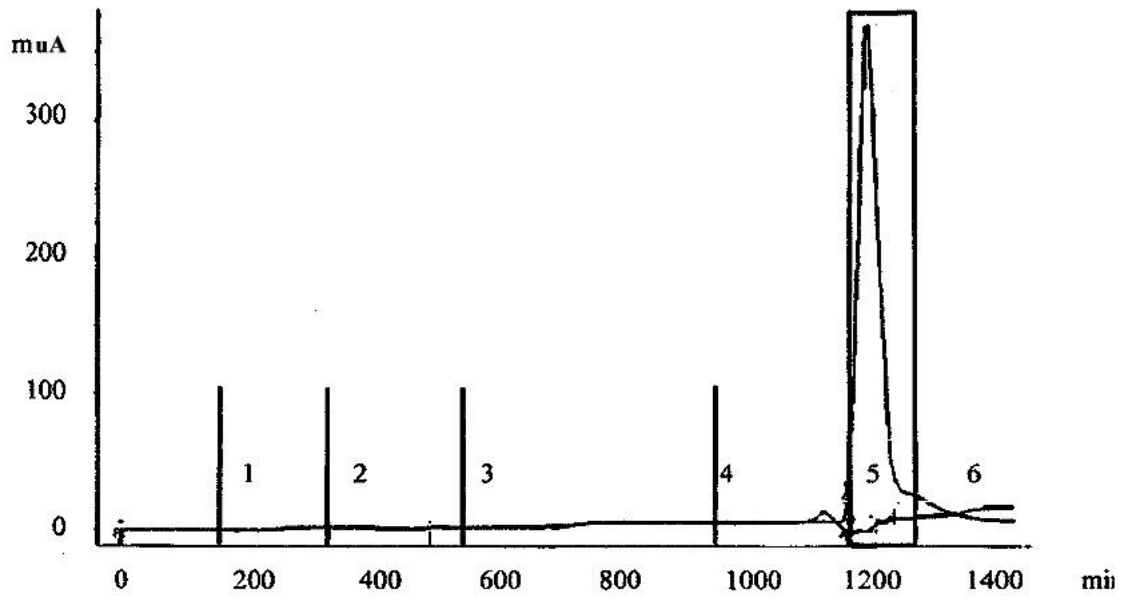


Fig. 2

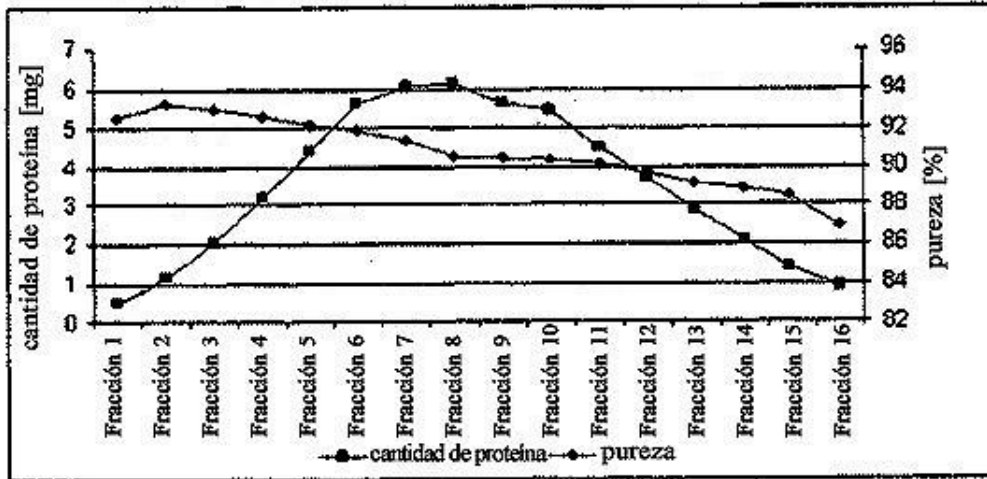


Fig. 3

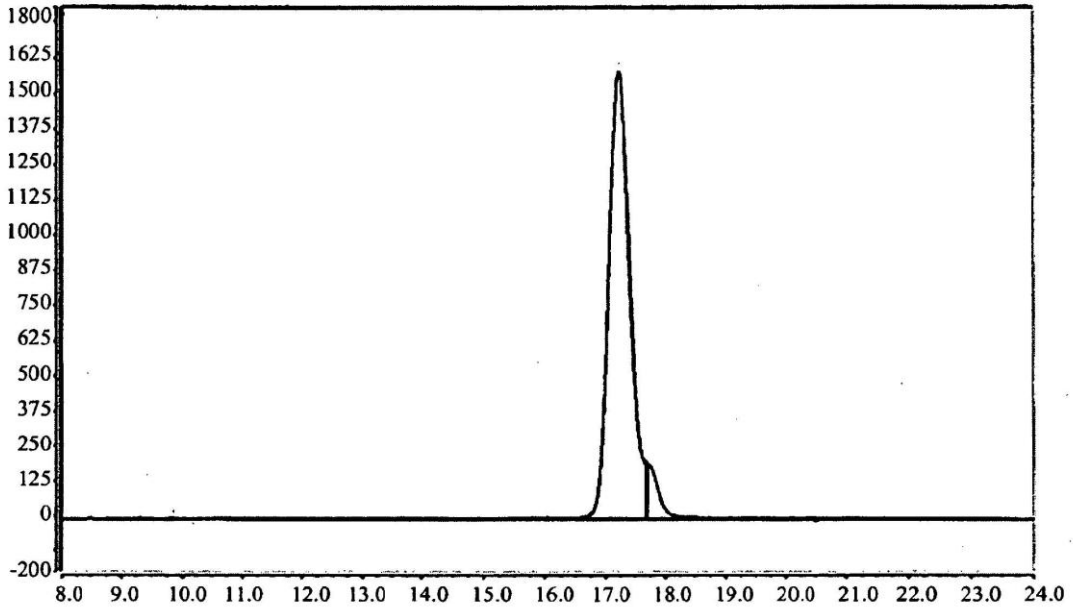


Fig. 4

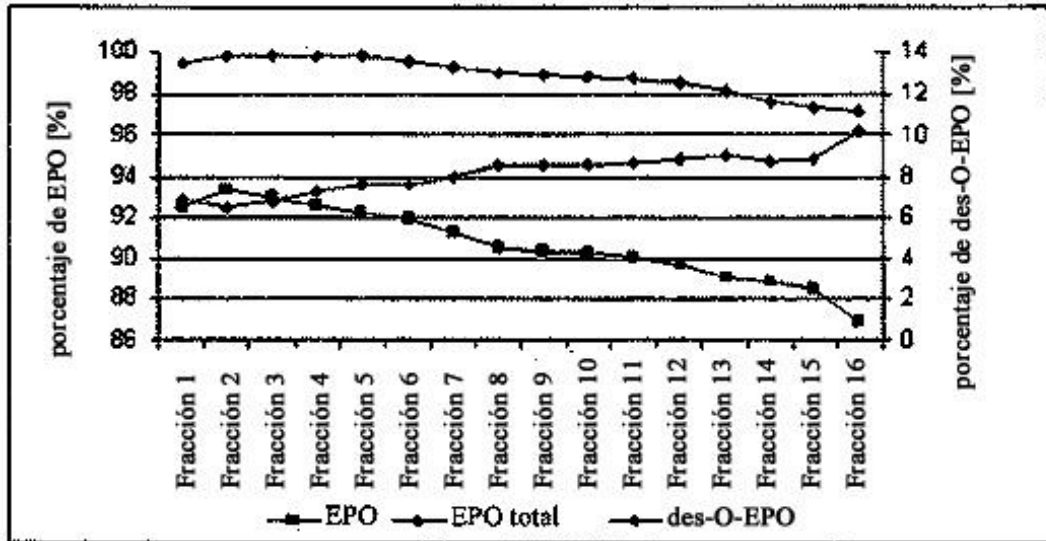


Fig. 5

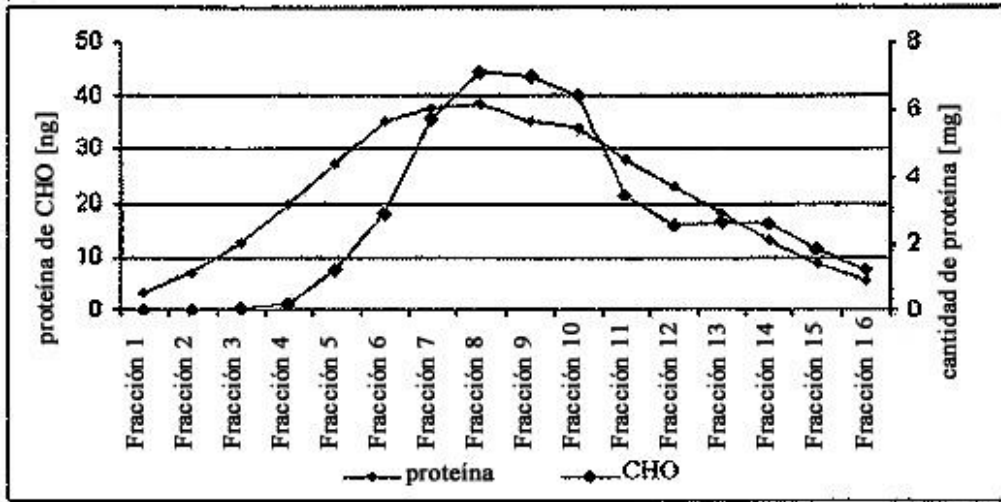


Fig. 6

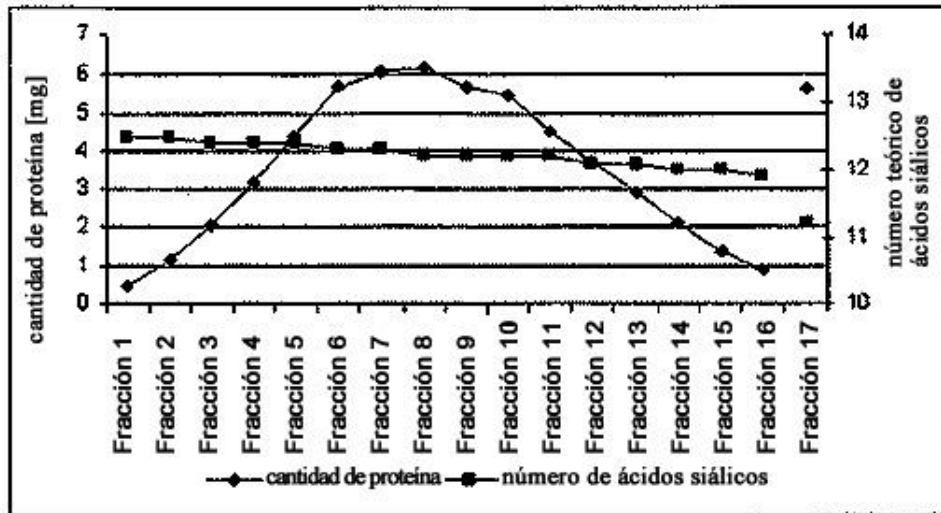


Fig. 7

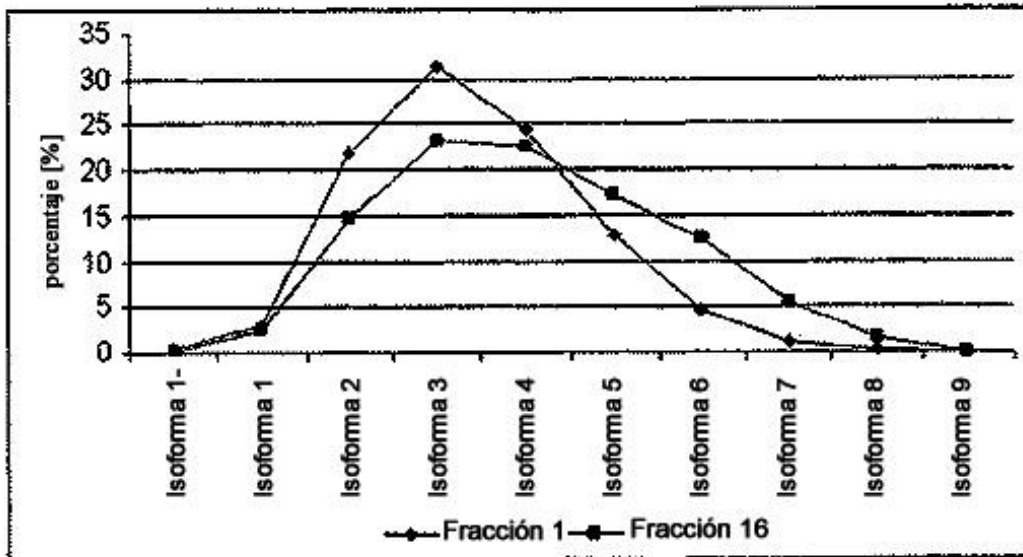


Fig. 8

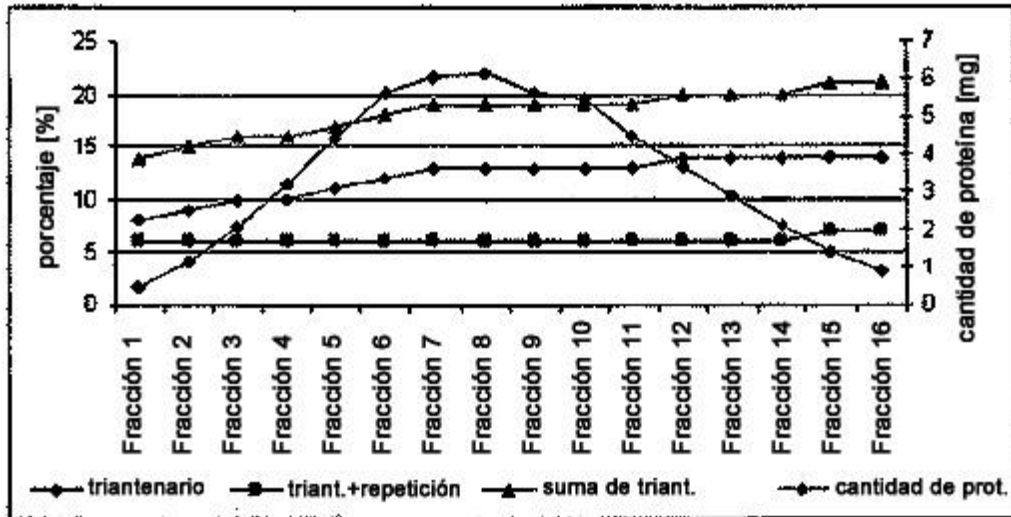


Fig. 9

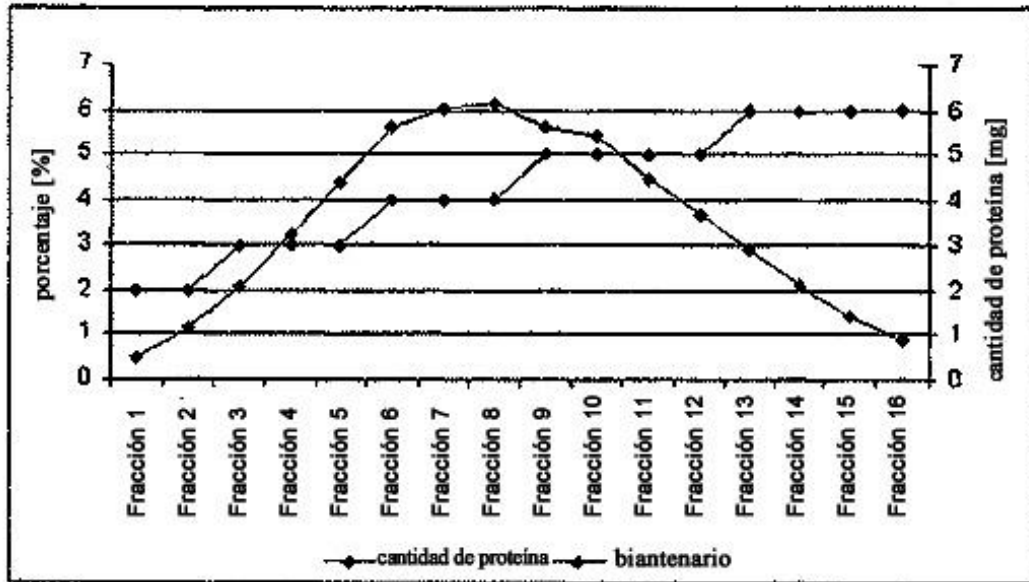


Fig. 10

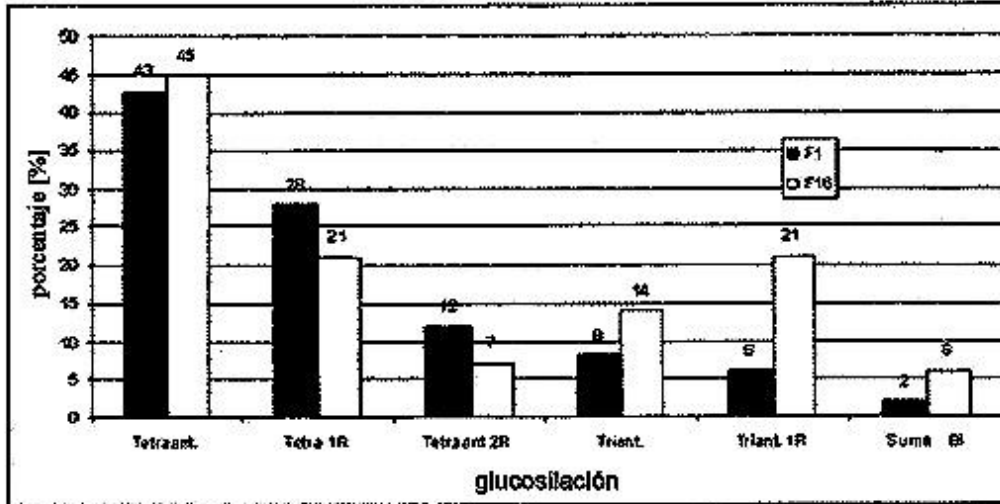


Fig. 11

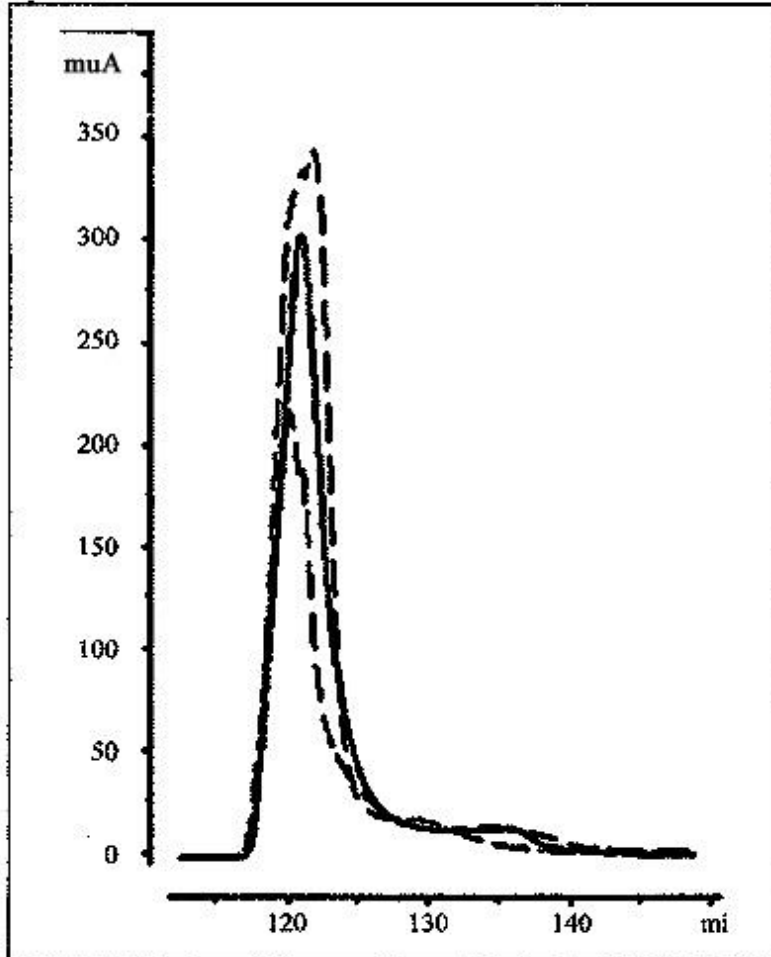


Fig. 12

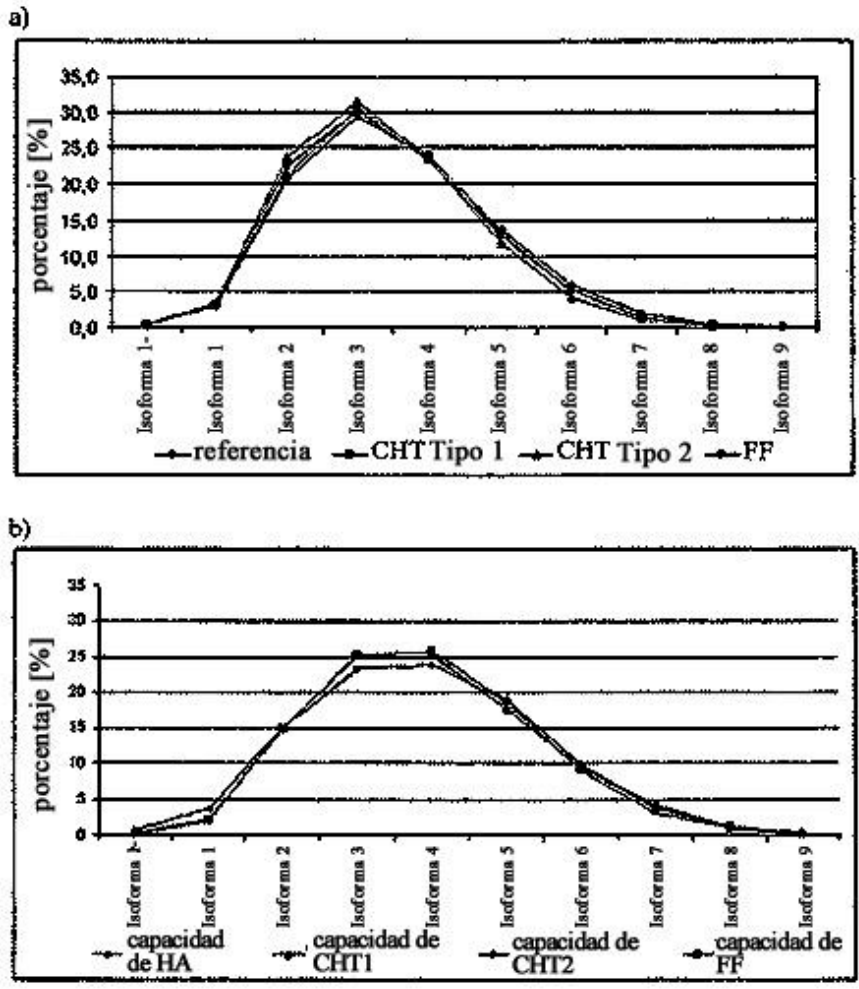


Fig. 13

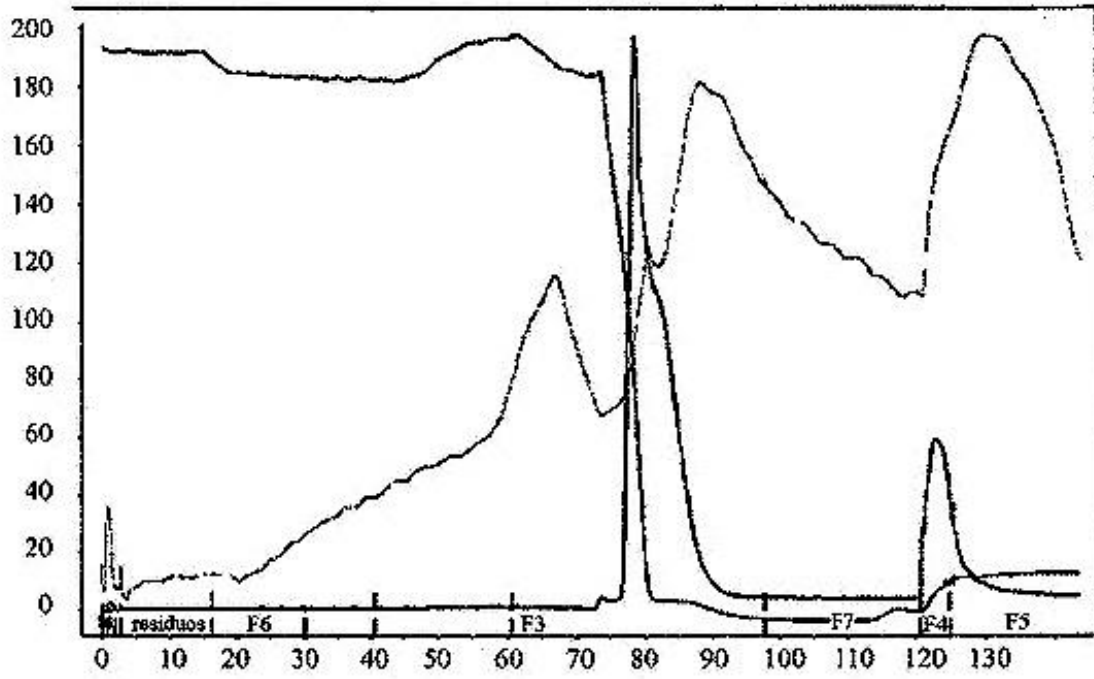


Fig. 14

