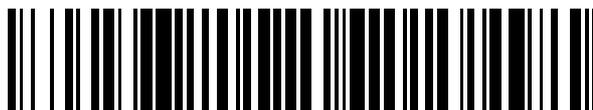


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 599**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.1998 E 98965756 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1037921**

54 Título: **Eritropoyetina de gran actividad específica**

30 Prioridad:

03.12.1997 DE 19753681

17.07.1998 EP 98113415

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

27.11.2014

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)

SANDHOFER STRASSE 122-132

68305 MANNHEIM, DE

72 Inventor/es:

BURG, JOSEF;

SELLINGER, KARL-HEINZ;

HASELBECK, ANTON y

KOLL, HANS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 523 599 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

Eritropoyetina de gran actividad específica

- 5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones de EPO con gran actividad específica, caracterizadas por un alto nivel de unidades de N-acetil-lactosamina o/y ramificaciones tetraantenarias en la estructura carbohidratada. Además la presente invención se refiere a un preparado farmacéutico que contiene una composición de EPO según la presente invención.
- 10 La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína humana que estimula la producción de glóbulos rojos. En el plasma sanguíneo de las personas sanas la EPO se encuentra en concentraciones muy pequeñas y por tanto no es posible proporcionarla de este modo en mayores cantidades.
- 15 Las patentes EP-B1-0 148 605 y EP-B1-0 205 564 describen la preparación de EPO recombinante humana en células CHO. La EPO descrita en la patente EP-B1-0 148 605 presenta un alto peso molecular como EPO urinaria y ninguna O-glicosilación. Por otra parte la EPO procedente de células CHO descrita en la patente EP-B1-0 205 564 está disponible en grandes cantidades y en forma pura.
- 20 Asimismo es conocida la obtención de EPO humana a partir de la orina de pacientes con anemia aplásica (Miyake y otros, J. Biol. Chem. 252 (1977), 5558-5564).
- 25 La EPO recombinante y la EPO urinaria se obtienen como mezcla de varias isoformas, de las cuales es sabido que se diferencian por su grado de sialización. Estas isoformas de EPO presentan distintos puntos isoeléctricos y se pueden separar por focalización isoeléctrica o electroforesis capilar (véase Tsao y otros, Biotech. Bioeng. 40 (1992), 1190-1196; Nieto y otros, Anal. Commun. 33 (1996), 425-427; Tran y otros, J. Chromatogr. 542 (1991), 459-471; Bietot y otros, J. Chromatogr. 759 (1997), 177-184; Watson y otros Anal. Biochem. 210 (1993), 389-393). Las isoformas con el mayor número de ácidos siálicos presentan la máxima actividad específica, mientras que las que llevan el menor número tienen la más baja actividad (véase p.ej. Imai y otros, Eur. J. Biochem. 194 (1990), 457-462; patente EP-A-0 428 267).
- 30 Takeuchi y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 7819-7822) describen una relación de la actividad biológica con el contenido de ácido siálico y la proporción de estructuras carbohidratadas bi- y tetraantenarias. Takeuchi y otros llegan asimismo a la conclusión de que las unidades de N-acetil-lactosamina presentes en las estructuras carbohidratadas de la EPO no tienen relación con la actividad biológica.
- 35 Fukuda y otros (Blood 73 (1989), 84-89) se ocupan de la velocidad de eliminación de la EPO del torrente sanguíneo, que contribuye esencialmente a la actividad biológica, y llegan a la conclusión de que la EPO con mayor número de unidades de N-acetil-lactosamina se elimina más rápidamente de la circulación que la EPO sin unidades de N-acetil-lactosamina. Morimoto y otros (Glycoconjugate J. 13 (1996), 1093-1120) describen la separación de isoformas de EPO mediante cromatografía mono-Q, en que las respectivas fracciones individuales constan de pocas isoformas. Los estudios realizados con estas fracciones muestran una distribución uniforme de todas las estructuras en todas las fracciones. Se encuentra una correlación del contenido de estructuras bi- y tetraantenarias o del contenido de unidades de N-acetil-lactosamina con la actividad específica.
- 40
- 45 Por tanto se desprende del estado técnico citado que existe una correlación general de la actividad biológica con la estructura de azúcar, en concreto respecto al contenido de ácidos siálicos. En cambio no se encuentra ningún indicio de que la cantidad de estructuras tetraantenarias o/y de N-acetil-lactosamina tenga una correlación directa con la actividad biológica.
- 50 Sorprendentemente, al purificar preparados de EPO se comprobó que un aumento de la proporción de estructuras carbohidratadas tetraantenarias o/y de unidades de N-acetil-lactosamina en la estructura carbohidratada producía una mejora importante de la actividad biológica específica. Esto ocurre especialmente durante la preparación de EPO en una línea celular humana, según la solicitud de patente europea 97 112 640.4.
- 55 Las investigaciones comparativas de actividad entre preparados o isoformas de EPO individuales cuya estructura carbohidratada solo se diferencia básicamente por el contenido de unidades de N-acetil-lactosamina (unidades LE) demuestran que - a igual contenido de ácido siálico y casi la misma antenaridad - los preparados o isoformas con mayor proporción de unidades de N-acetil-lactosamina tienen significativamente una actividad superior. En este contexto se entiende como antenaridad el contenido medio relativo (en %) de cadenas carbohidratadas bi-, tri- o tetraantenarias unidas a N en los preparados o isoformas aisladas de EPO, respecto al número total de cadenas carbohidratadas unidas a N. Además se encontró concretamente que en los preparados o isoformas con elevado contenido de estructuras triantenarias la cantidad total de unidades de lactosamina tenía considerable importancia para la actividad in vivo. Incrementando el contenido total de unidades de N-acetil-lactosamina, p.ej. en forma de alargamientos adicionales de la estructura principal con unidades LE (las llamadas repeticiones), se puede aumentar considerablemente la actividad biológica. Asimismo se comprobó que aumentando la proporción de estructuras tetraantenarias se puede mejorar la actividad biológica.
- 60
- 65

Por tanto si hay que producir un preparado de EPO con la mayor actividad específica posible y gran rendimiento, las operaciones de purificación, las células productoras o/y sus cultivos deben optimizarse para tener una proporción lo más alta posible de estructuras carbohidratadas tetraantenarias o/y un contenido lo más grande posible de unidades de N-acetil-lactosamina.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición de EPO que consta fundamentalmente de moléculas de EPO glicosiladas que llevan un número promedio de al menos 3,7, preferiblemente de al menos 4,0, con especial preferencia de al menos 4,3 y sobre todo de al menos 4,5 unidades de N-acetil-lactosamina respecto a la composición media por cadenas carbohidratadas unidas a N de la molécula de EPO o un número promedio de al menos 11,1, preferiblemente de al menos 12,0, con especial preferencia de al menos 13,0 y sobre todo de al menos 13,5 unidades de N-acetil-lactosamina respecto a todas las 3 estructuras carbohidratadas unidas a N (glicosilación total en N) de la molécula de EPO.

Las moléculas de EPO son el producto de una expresión de ADN endógeno en células humanas. La proporción de cadenas carbohidratadas con repeticiones de N-acetil-lactosamina respecto al número total de cadenas de hidrato de carbono es como mínimo del 10%. La composición de EPO tiene una actividad específica in vivo de al menos 175.000 UI/mg de proteína.

La composición de EPO consta básicamente, con preferencia, de moléculas de EPO glicosiladas que tienen un valor de al menos 130, preferiblemente de al menos 135, con especial preferencia de al menos 140 y sobre todo de al menos 160, igual al número total promedio de unidades de N-acetil-lactosamina por molécula de EPO multiplicado por el contenido medio de ácido siálico por molécula de EPO.

En este contexto la indicación "básicamente" significa que las moléculas de EPO deseadas se encuentran en una proporción preferente de al menos el 80%, con especial preferencia de al menos el 90% y sobre todo de al menos el 95% respecto a la cantidad total de moléculas de EPO en la composición.

El límite superior del contenido de estructuras tetraantenarias puede llegar hasta el 100% del total de cadenas carbohidratadas, de modo que cada estructura tetraantenaria contenga 4 unidades de N-acetil-lactosamina en la estructura principal del azúcar unido a N. El número de unidades de N-acetil-lactosamina, tanto en cada estructura carbohidratada como en la glicosilación, se puede aumentar con unidades adicionales de N-acetil-lactosamina como repeticiones de alargamiento de la estructura principal. El número de unidades de N-acetil-lactosamina por sitio de glicosilación (es decir, por estructura carbohidratada unida a N) puede llegar así hasta 6 (1 estructura tetraantenaria y 2 unidades adicionales de N-acetil-lactosamina en forma de repeticiones) (véase fig. 1) o – en estructuras con más de 2 unidades adicionales de N-acetil-lactosamina como repeticiones – incluso más. Respecto a la glicosilación total (3 estructuras carbohidratadas unidas a N) el número de unidades de N-acetil-lactosamina puede ser de 18 o más.

La composición según la presente invención puede constar de una o más isoformas, es decir moléculas de EPO con distintos puntos isoeléctricos en la focalización isoeléctrica. La composición según la presente invención incluye preferiblemente una mezcla de al menos 2, p.ej. 2 hasta 5 isoformas, sobre todo una mezcla de 3 o 4 isoformas.

La actividad específica de la composición según la presente invención es como mínimo de 175.000 UI/mg, sobre todo de al menos 200.000 UI/mg in vivo (ratón normocitémico). Se prefiere especialmente una actividad específica comprendida en el intervalo aproximado de 200.000 hasta 400.000 UI/mg o 450.000 UI/mg de proteína, sobre todo de 250.000 hasta 400.000 UI/mg o 450.000 UI/mg de proteína.

En la composición según la presente invención el contenido medio de ácido siálico o el número promedio de restos de ácido siálico por molécula de EPO es preferiblemente de 11 a 14, con especial preferencia de al menos 11,5 y sobre todo de al menos 12,5.

La composición según la presente invención consta de moléculas de EPO que son el producto de una expresión de ADN endógeno tras activación genética en células humanas, p.ej. en líneas celulares inmortalizadas como, por ejemplo, Namalwa (Nadkarni y otros, Cancer 23 (1969), 64-79), HT1080 (Rasheed y otros, Cancer 33 (1973), 1027-1033) o HeLa S3 (Puck y otros, J. Exp. Meth. 103 (1956), 273-284). Estos métodos están descritos en la solicitud de patente europea 97 112 640.4.

Otros parámetros importantes para la actividad biológica de la EPO son el porcentaje de cadenas carbohidratadas con repeticiones, es decir con unidades adicionales de N-acetil-lactosamina, respecto al número total de cadenas carbohidratadas unidas a N, así como el valor del producto de este porcentaje de repeticiones por el porcentaje de cadenas carbohidratadas tetraantenarias respecto al número total de cadenas carbohidratadas. En el caso de la EPO procedente de células CHO el porcentaje de repeticiones es preferiblemente de al menos un 30%, con especial preferencia de al menos un 35% y sobre todo de al menos un 40%. En el caso de la EPO procedente de células humanas, como por ejemplo células HeLa, el porcentaje de repeticiones es preferiblemente de al menos un 10%, con especial preferencia de al menos un 12% y sobre todo de al menos un 14%. Por lo tanto en la EPO de células CHO el valor del producto del porcentaje de cadenas carbohidratadas con repeticiones de N-acetil-lactosamina

respecto al número total de cadenas carbohidratadas por el porcentaje de estructuras tetraantenarias respecto al número total de cadenas carbohidratadas es preferiblemente de al menos 2400, con especial preferencia de al menos 2800 y sobre todo de al menos 3400. En la EPO de células humanas este valor es preferiblemente de al menos 800, con especial preferencia de al menos 960 y sobre todo de al menos 1100.

Con especial preferencia se usa una composición de EPO obtenida por cultivo de células productoras de EPO en un medio con bajo contenido de suero, p.ej. 1% (v/v) como máximo, o sobre todo en un medio de cultivo libre de suero (véase para este caso la patente WO 96/35718). Como ejemplos de medios de cultivo adecuados cabe mencionar el RPMI 1640 o el DMEM.

En otro aspecto la composición de EPO según la presente invención se formula como preparado farmacéutico, si es preciso junto con los diluyentes, excipientes y soportes farmacéuticos usuales. La composición de EPO según la presente invención utilizable para elaborar un preparado farmacéutico tiene preferiblemente una pureza mínima del 99% y con especial preferencia de al menos el 99,9%, determinada por HPLC de fase inversa (p.ej. en una columna Vydac C4) o/y por cromatografía de exclusión de tamaños (p.ej. en una columna TSK 2000SW Ultrapac).

Además la composición de la presente invención tiene un contenido de ADN preferiblemente < 10 pg, con especial preferencia < 5 pg y sobre todo < 1 pg de ADN por 10.000 UI de proteína. La composición de la presente invención está asimismo ampliamente libre de impurezas bacterianas (< 1 UFC/ml) y de endotoxinas (< 1 UE/10.000 UI de proteína).

El contenido de ADN se puede determinar mediante un ensayo de hibridación con ADN radiactivo o marcado con fluorescentes. Como sonda de ADN se usa p.ej. ADN humano purificado disponible comercialmente. Además el ADN humano se puede usar como patrón para el ensayo. El límite inferior de detección de un ensayo de hibridación de este tipo es de 0,3 pg/10.000 UI de EPO, aproximadamente. El contenido de gérmenes y endotoxinas en el preparado de EPO se puede determinar por métodos normalizados como los descritos en Pharm. Eu. O en USP.

Una composición de EPO que tenga preferentemente las características deseadas según la presente invención se puede obtener tomando al menos una de las siguientes medidas:

- (a) selección de una adecuada línea celular productora humana, capaz de generar cadenas carbohidratadas con un alto porcentaje de estructuras tetraantenarias o/y de unidades de N-acetil-lactosamina,
- (b) selección de condiciones adecuadas para el cultivo celular, a fin de generar cadenas carbohidratadas con un alto porcentaje de estructuras tetraantenarias o/y de unidades de N-acetil-lactosamina, y
- (c) separación de los componentes indeseados de una composición conocida de moléculas de EPO procedentes de células humanas, enriqueciendo el contenido de moléculas de EPO que llevan cadenas carbohidratadas con un alto porcentaje de estructuras tetraantenarias o/y de unidades de N-acetil-lactosamina.

La medida (a) consiste en elegir una célula productora apropiada. Por un lado se pueden usar células humanas, que como es sabido tienden a producir las cadenas carbohidratadas de estructura deseada con gran rendimiento. Como ejemplos cabe mencionar líneas celulares humanas como HeLa, Namalwa, HT1080 o derivadas de las mismas. Se prefieren especialmente las células HeLaS3.

Por otro lado también se pueden lograr células productoras adecuadas sobreexpresando en ellas ciertos enzimas de glicosilación, p.ej. mediante expresión recombinante o/y activación genética. Como ejemplos de estos enzimas de glicosilación cabe citar las sialiltransferasas, las N-acetil-glucosaminiltransferasas y las galactosiltransferasas.

La medida (b) consiste en elegir unas condiciones adecuadas para el cultivo celular. En una primera forma de ejecución de la presente invención la medida (b) comprende la adición al medio de cultivo de una mezcla formada por al menos dos y preferiblemente al menos tres hidratos de carbono. Los hidratos de carbono se seleccionan preferentemente entre mono- y disacáridos como glucosa, glucosamina, ribosa, fructosa, galactosa, manosa, sacarosa, lactosa, manosa-1-fosfato, manosa-1-sulfato y manosa-6-sulfato. Por ejemplo, son medios nutrientes adecuados los que contienen glucosa o/y manosa o/y galactosa. Se lograron resultados especialmente buenos con medios nutrientes que contienen una mezcla de glucosa, galactosa y manosa en relación molar 1:(0,5-3):(1-5) y sobre todo 1:(0,7-2,4):(1,8-4,0), usando con especial preferencia los respectivos hidratos de carbono en forma D(+). La concentración total de todos los azúcares durante la fermentación está comprendida preferentemente en un intervalo de 0,1 hasta 10 g/l, con especial preferencia de 2 a 6 g/l en el medio de cultivo. La mezcla de hidratos de carbono se añade preferiblemente en función de la respectiva demanda celular, tal como se explica a continuación.

Según otra forma de ejecución preferida de la presente invención la medida (b) comprende la adición controlada y preferiblemente adecuada a la demanda celular de nutrientes que incluyan al menos un aminoácido esencial para la línea celular cultivada o/y al menos un hidrato de carbono, en función de la respectiva demanda celular. De este modo se logra una glicosilación claramente mejorada, incluso con una fermentación de elevada densidad celular (densidad celular en la recolección > 10 x 10⁵ células/ml y preferiblemente > 20 x 10⁵ células/ml) en fermentadores grandes (de volumen > 1 l, p.ej. 50 - 10.000 l). Para ello se determina continuamente o a intervalos apropiados de tiempo, p.ej. una vez al día, la concentración de los parámetros relacionados con la demanda celular de nutrientes y

sus tasas de consumo. Así se pueden determinar cuantitativa o/y cualitativamente los nutrientes necesarios para el consumo de las células. Estos parámetros pueden ser nutrientes o productos metabólicos de las células, como por ejemplo la concentración de glutamina, de amonio, de glucosa o/y de lactato, sobre todo la concentración de glutamina.

5 Los nutrientes añadidos según este aspecto de la presente invención comprenden aminoácidos esenciales como p.ej. glutamina o/y triptófano, o/e hidratos de carbono, así como además, preferiblemente, otros aminoácidos no
10 esenciales vitaminas, oligoelementos, sales o/y factores de crecimiento, p.ej. insulina. Los nutrientes comprenden preferiblemente al menos un aminoácido esencial y al menos un hidrato de carbono. Estos nutrientes se dosifican al medio de cultivo preferentemente disueltos. Las soluciones nutrientes llevan, preferiblemente, al menos glutamina e hidratos de carbono, en concreto una mezcla de al menos 2 hidratos de carbono, tal como se ha dicho antes. Se
15 prefiere sobre todo el uso de una mezcla de glucosa, galactosa y manosa. Asimismo se prefiere añadir los nutrientes durante toda la fase de crecimiento celular en función de la demanda, es decir, dependiendo de la concentración de los parámetros escogidos medida en el medio de cultivo.

20 La relación cuantitativa de glutamina a hidratos de carbono en la solución nutriente se elige preferiblemente de modo que corresponda esencialmente a la relación de consumo en el fermentador. De este modo se puede conseguir una concentración bastante constante de cada substrato en el fermentador. La concentración de glutamina en el medio de cultivo se mantiene preferiblemente a un valor que es < 150 mg/l y evita la formación de una concentración de amonio $\geq 2,3$ mmoles/l en el medio. Como ya se dicho, la concentración total de azúcar durante la fermentación está comprendida preferiblemente en un intervalo de 0,1 hasta 10 g/l, con especial preferencia de 2 hasta 6 g/l de medio de cultivo.

25 En la solución nutriente utilizada, la relación másica entre glutamina y azúcares está comprendida preferiblemente en el intervalo de 1:3 hasta 20 y con especial preferencia de 1:5 hasta 15 respecto al azúcar total. Si se utiliza una solución nutriente que contenga glutamina y los tres azúcares glucosa, galactosa y manosa, la relación másica entre la glutamina y los azúcares es preferiblemente de 1:(1 hasta 3):(1 hasta 5):(2 hasta 8) y con especial preferencia de 1:(1,5 hasta 2,2):(1,5 hasta 3,6):(4 hasta 6).

30 El cultivo se efectúa preferiblemente por lotes repetidos, de manera que tras una fase de crecimiento se recolecta una parte del caldo de cultivo y el resto permanece en el fermentador, el cual se rellena a continuación con medio fresco hasta el volumen de trabajo. Con el proceso de la presente invención se puede recolectar EPO glicosilada con rendimientos muy elevados. Así, por ejemplo, la concentración en el momento de la recolección es de al menos 30 mg y sobre todo de al menos 40 mg de EPO por l de medio de cultivo.

35 Asimismo se revela un método para obtener EPO de células eucariotas, cultivándolas en un medio adecuado y extrayendo la EPO del sobrenadante del cultivo. El método se caracteriza porque el cultivo se lleva a cabo a una temperatura $\leq 36^\circ\text{C}$, preferiblemente entre 30 y $35,5^\circ\text{C}$ y sobre todo entre 33 y $35,0^\circ\text{C}$. Sorprendentemente se vio que al rebajar la temperatura del cultivo aumentaba claramente el porcentaje de EPO con la glicosilación deseada.

40 La medida (c) consiste en separar aquellos componentes no deseados de una composición de EPO conocida cuya estructura carbohidratada no cumpla las especificaciones de la presente exposición. Esto se puede realizar, por ejemplo, purificando los preparados de EPO por cromatografía, p.ej. mediante cromatografía de afinidad en geles de colorantes de triazina, preferiblemente en geles de colorante Cibacron azul. La separación de los componentes no
45 deseados también se puede efectuar por cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de fase inversa. Los ligandos adecuados para ello son radicales butilo, pentilo, octilo, octadecilo y fenilo. La etapa de cromatografía de fase inversa se realiza preferentemente a un pH comprendido en el intervalo de 6,0 hasta 8,5 y con especial preferencia de 7,0 hasta 8,0. Como eluyentes son apropiados por ejemplo el acetonitrilo, el etanol o el isopropanol, preferiblemente el acetonitrilo.

50 Mediante análisis por electroforesis capilar zonal (EZC) se pueden identificar, agrupar y por último reprocesar las fracciones adecuadas. Además, empleando lecitinas procedentes de tomates o patatas (Merkle, Cummings, J. Biol. Chem. 262 (1987), 8179-8189) se puede lograr un enriquecimiento directo de moléculas de EPO con un elevado porcentaje de unidades de N-acetil-lactosamina. Estas lecitinas se usan preferiblemente en forma inmovilizada, p.ej.

55 La presente invención se ilustra a continuación mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Las figuras representan:

60 Figura 1: una estructura tetraantenaria con unidades adicionales de N-acetil-lactosamina (repeticiones) y ácidos siálicos,

Figura 2: el porcentaje relativo de isoformas individuales de EPO en función de los hidratos de carbono añadidos al medio de cultivo,

65 Figura 3: la actividad biológica de los preparados de EPO en función de los hidratos de carbono añadidos al medio de cultivo, y

Figura 4: la actividad biológica de isoformas de EPO en función del porcentaje de unidades repetidas de N-acetil-lactosamina.

Ejemplo 1: purificación de la EPO de los sobrenadantes de cultivo de líneas celulares

Para purificar la EPO de los sobrenadantes del cultivo de células humanas o de células CHO se emplearon sobre todo dos métodos que se diferencian en el número y principio de etapas cromatográficas y se utilizaron en función de la composición del medio y de la concentración de EPO:

- Método 1: 1ª etapa: columna de azul-sefarosa
2ª etapa: columna de butil-sefarosa
3ª etapa: columna de hidroxapatito
4ª etapa: concentración
- Método 2: 1ª etapa: columna de azul-sefarosa
2ª etapa: columna de hidroxapatito
3ª etapa: concentración
(3ª etapa alternativa: RP-HPLC)

Ejemplo de purificación de un sobrenadante de cultivo de células Hela S3 con 2% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) según el método 1:

1. Columna de azul-sefarosa:

Una columna de 5 ml Hi-Trap-azul (columna de azul-sefarosa fabricada por Pharmacia) se equilibró con al menos 5 volúmenes de columna (VC) de tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM). A continuación se aplicaron 70 ml de un sobrenadante de células Hela (que contenía aprox. 245 µg de EPO y 70-100 mg de proteína total) durante la noche a un caudal de 0,5 ml/min en circulación.

La columna se lavó con al menos 5 VC de tampón B (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 250 mM) y al menos 5 VC de tampón C (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 0,2 mM; NaCl 250 mM) a 0,5 ml/min. El resultado del lavado se controló midiendo el contenido de proteína por DO280.

La EPO se eluyó con tampón D (Tris-HCl 100 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 0,2 mM; NaCl 2 M) a un caudal de 0,5 ml/min. La solución eluida se recogió en fracciones de 1-2 ml.

El contenido en EPO de las fracciones, de las soluciones de lavado y de la pasada se determinó por cromatografía líquida de fase inversa (RP-HPLC), aplicando un alícuota sobre una columna POROS R2/H (Boehringer Mannheim). Alternativamente se llevó a cabo un ensayo "dot blot" inmunológico para identificar cualitativamente las fracciones que contenían EPO.

Las fracciones eluidas que contenían EPO (8-12 ml) se agruparon y se aplicaron a una columna de butil-sefarosa.

El rendimiento tras la columna de azul-sefarosa fue de aprox. 175 µg de EPO (correspondiente aprox. al 70%). En general el rendimiento tras la columna de azul-sefarosa fue del 50-75%.

2. Columna de butil-sefarosa (cromatografía de interacción hidrófoba)

Una columna de butil-sefarosa de elaboración propia (material: Toyopearl Butyl S650), de 2-3 ml, se equilibró con al menos 5 VC de tampón D (Tris-HCl 100 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 0,2 mM; NaCl 2 M) y a continuación se aplicaron sobre ella las fracciones agrupadas tras la columna de azul-sefarosa de 1. que contenían EPO (aprox. 150 µg de EPO) a un caudal de 0,5 ml/min.

La columna se lavó con al menos 5 VC de tampón E (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; NaCl 2 M y 10% de isopropanol) a 0,5 ml/min. El resultado del lavado se controló midiendo el contenido de proteína por DO280.

La EPO se eluyó con tampón F (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; NaCl 2 M y 20% de isopropanol) a temperatura ambiente y a un caudal de 0,5 ml/min. La solución eluida se recogió en fracciones de 1-2 ml.

El contenido en EPO de las fracciones, de las soluciones de lavado y de la pasada se determinó por RP-HPLC, aplicando un alícuota sobre una columna POROS R2/H. Alternativamente se llevó a cabo un ensayo "dot blot" inmunológico para identificar cualitativamente las fracciones que contenían EPO. Las fracciones eluidas que contenían EPO (10-15 ml) se agruparon y se aplicaron a una columna de hidroxapatito.

El rendimiento tras la columna de butil-sefarosa fue de aprox. 130 µg de EPO (correspondiente aprox. al 85%). En general el rendimiento de la columna de butil-sefarosa fue del 60-85% respecto a la aplicación de las fracciones agrupadas tras la columna de azul-sefarosa.

3. Columna de hidroxiapatito

Una columna de hidroxiapatito (Econo-Pac CHT II fabricada por BioRAD) de 5 ml se equilibró con al menos 5 VC de tampón F (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; NaCl 2 M, 20% de isopropanol) y a continuación se aplicaron las fracciones agrupadas tras la columna de butil-sefarosa de 2. que contenían EPO (aprox. 125 µg de EPO) a un caudal de 0,5 ml/min.

La columna se lavó con al menos 5 VC de tampón G (Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; NaCl 2 M) a 0,5 ml/min. El resultado del lavado se controló midiendo el contenido de proteína por DO280.

La EPO se eluyó con tampón H (Na-fosfato 10 mM, pH 7,0; NaCl 80 mM) a un caudal de 0,5 ml/min. La solución eluida se recogió en fracciones de 1-2 ml.

El contenido en EPO de las fracciones, de las soluciones de lavado y de la pasada se determinó por RP-HPLC, aplicando un alícuota sobre una columna POROS R2/H.

Se agruparon las fracciones eluidas que contenían EPO (3-6 ml). El rendimiento de la columna de hidroxiapatito fue de aprox. 80 µg de EPO (correspondiente aprox. al 60%). En general el rendimiento de la columna de hidroxiapatito fue del 50-65% respecto a la aplicación de las fracciones agrupadas tras la columna de butil-sefarosa.

4. Concentración

Las fracciones de EPO agrupadas procedentes de la etapa de hidroxiapatito se concentraron en centrifugadoras con un tamaño de exclusión de 10 kD (p.ej. Microsep von Filtron) hasta 0,1-0,5 mg/ml, se mezclaron con Tween 20 al 0,01% y se almacenaron en alícuotas a -20°C.

Tabla de rendimientos:

	EPO (µg)	Rendimiento (%)
Inicio	245	100
Columna de azul-sefarosa	175	70
Columna de butil-sefarosa	130	53
Columna de hidroxiapatito	80	33
Concentración	60	25

La pureza de la EPO aislada fue aprox. > 90% y en general incluso > 95%.

Para aumentar el rendimiento de EPO también se empleó el método 2, en el cual falta la etapa de butil-sefarosa. Este método es aplicable ante todo a sobrenadantes de cultivo con o sin adición de 1% (v/v) de SBF y produce la EPO aislada con una pureza prácticamente igual (90-95%). En este método la presencia de CaCl₂ 5 mM en el tampón equilibrador (tampón F) de la columna de hidroxiapatito mejoró la fijación y por tanto la reproducibilidad de la elución en la etapa de hidroxiapatito. Por consiguiente en el método 2 se siguió en principio el mismo proceso que en el método 1 con los siguientes tampones:

1. Columna de azul-sefarosa

Tampón equilibrador (tampón A): Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM
 Tampón de lavado 1 (tampón B): Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 250 mM
 Tampón de lavado 2 (tampón C): Tris-HCl 20 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 250 mM
 Tampón de elución (tampón D): Tris-HCl 100 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 2 M

2. Columna de hidroxiapatito

Tampón equilibrador (tampón F): Tris-HCl 50 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 1 M
 Tampón de lavado (tampón G): Tris-HCl 10 mM, pH, 7,0; CaCl₂ 5 mM; NaCl 80 mM
 Tampón de elución (tampón H): Na-fosfato 10 mM, pH 7,0; CaCl₂ 0,5 mM; NaCl 80 mM

Tabla de rendimientos:

	EPO (µg)	Rendimiento (%)
Inicio	600	100
Columna de azul-sefarosa	450	75
Columna de hidroxiapatito	335	55
Concentración	310	52

En el método 1 la adición de CaCl₂ 5 mM a los tampones C hasta G también produjo una mejor fijación y una elución más definida de la columna de hidroxiapatito.

Alternativa o adicionalmente también se pueden llevar a cabo estas otras etapas de purificación de la EPO:

- RP-HPLC, p.ej. con material Vydac C4
- Cromatografía de flujo rápido en DEAE- sefarosa
- Diafiltración

Ejemplo 2: purificación de EPO de sobrenadantes de cultivo, manteniendo las isoformas 1 - 8 (comparativo)

1. Material de partida

Se fermentó EPO de células de mamíferos, p.ej. de células CHO o células humanas, mediante un proceso repetido por lotes. Se inoculó un fermentador de 1000 l con un precultivo y al cabo de unos 3 a 5 días se recolectó su contenido. Después de la recolección las células del caldo de fermentación se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante libre de células se ajustó a pH 5,0 – 5,2 con ácido acético 1 M y se filtró a 1 – 9°C.

2. Cromatografía en columna de azul-sefarosa

Una columna cromatográfica (Amicon P440 x 500, Amicon, GB) se llenó con 60 - 80 l de azul-sefarosa y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación se equilibró con aprox. 3 volúmenes de columna (VC) de tampón de acetato.

El sobrenadante del cultivo libre de células, ajustado a pH 5, se aplicó a la columna a una temperatura de $10 \pm 5^\circ\text{C}$ y a un caudal de 800 - 1400 ml/min. Después se lavó la columna al mismo caudal y a $5 \pm 4^\circ\text{C}$ con aprox. 1 VC de tampón de lavado 1 y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado 2. A continuación se eluyó la columna con aprox. 3 VC de tampón de elución. El pico de proteína total (aprox. 30 - 60 l) se recogió, se ajustó a pH 6,9 con HCl y se conservó a $5 \pm 4^\circ\text{C}$ hasta su reprocesamiento. En esta etapa cromatográfica se concentró la solución del producto y se alcanzó una pureza de aprox. el 40 - 50%.

Tampón equilibrador:	Na-acetato 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,2$
Tampón de lavado 1:	Na-acetato 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,25 M, pH $5,0 \pm 0,2$
Tampón de lavado 2:	Tris HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH $6,5 \pm 0,3$
Tampón de elución:	Tris HCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 1 M, pH $9,0 \pm 0,2$

3. Cromatografía sobre Butil-Toyopearl (cromatografía hidrófoba)

Una columna cromatográfica (Pharmacia BPG 300/500) se llenó con 30 - 40 l de Butil-Toyopearl y se regeneró con guanidina-HCl 4 M y NaOH 0,5 N. A continuación la columna se equilibró con al menos 3 VC de tampón equilibrador.

El producto eluido de la columna de azul-sefarosa se ajustó a 10% de isopropanol y se aplicó sobre la columna a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un caudal de 800 - 1200 ml/min. Después la columna se lavó a igual temperatura y caudal con aprox. 1 VC de tampón equilibrador y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado. A continuación se eluyó con aprox. 3 VC de tampón de elución. El pico de proteína total (aprox. 10 - 18 l) se recogió, se diluyó enseguida 3 veces con tampón de dilución y se conservó a 15°C hasta su reprocesamiento. En esta cromatografía se alcanzó una pureza de aprox. el 90%.

Tampón equilibrador:	Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,75 M, 10% de isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Tampón de lavado:	Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,75 M, 19% de isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Tampón de elución:	Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,75 M, 27% de isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Tampón de dilución:	Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH $6,9 \pm 0,2$

4. Cromatografía sobre hidroxapatito Ultrogel

Una columna cromatográfica (Amicon P440 x 500 o equivalente) se cargó con 30 - 40 l de hidroxapatito Ultrogel y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación la columna se equilibró con al menos 4 VC de tampón equilibrador.

El producto eluido de la columna de Butil-Toyopearl se aplicó sobre la columna a una temperatura de aprox. 15°C y a un caudal de 500-1200 ml/min. La columna se lavó a igual temperatura y caudal con aprox. 1 VC de tampón equilibrador y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado. A continuación se eluyó con aprox. 3 VC de tampón de elución. El pico de proteína total (aprox. 10 - 18 l) se recogió y se conservó a 15°C hasta su reprocesamiento. En esta cromatografía se alcanzó una pureza superior al 95%.

Tampón equilibrador:	Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,25 M, 9% de isopropanol, pH $6,9 \pm 0,2$
Tampón de lavado:	Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 5 mM, pH $6,8 \pm 0,2$
Tampón de elución:	Tris-HCl 10 mM, K-fosfato 10 mM, CaCl_2 0,5 mM, pH $6,8 \pm 0,2$

5. HPLC de fase inversa HPLC (RP-HPLC)

Se efectuó una HPLC preparativa con una unidad separadora Merck Prepbar 100 (o equivalente) a una temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$. La columna de separación (100 mm x 400 mm, 3,2 l) estaba cargada con material Vydac C4. Antes de usarla, la columna se regeneró aplicando varias veces un gradiente de tampón A hasta 100% de disolvente y luego se equilibró con tampón A.

El producto eluido de la columna de hidroxipatito se acidificó a pH 2,5 aprox. con ácido trifluoroacético y se filtró en condiciones de esterilidad. A continuación se aplicó sobre la columna a una temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$ y a un caudal de 250-310 ml/min. La columna se eluyó a igual temperatura y caudal con un gradiente lineal de tampón A hacia tampón B. El pico de elución se recogió en fracciones. El producto eluido se neutralizó inmediatamente poniendo antes 4 volúmenes de tampón de dilución HPLC.

Se reunieron las fracciones que dieron una pureza mínima del 99% en la HPLC analítica (aprox. un volumen total de 4 - 6 l). En esta cromatografía se separaron las trazas de impurezas y se alcanzó una pureza superior al 99%.

Tampón A:	ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
Tampón B:	80% de acetonitrilo, ácido trifluoroacético al 0,1% en agua
Tampón de dilución HPLC:	Na/K-fosfato 10 mM, pH $7,5 \pm 0,2$

6. Cromatografía de flujo rápido en DEAE- sefarosa

Una columna cromatográfica (Amicon P90 x 250 o equivalente) se relleno por encargo con 100 - 200 ml de gel por g de EPO y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación la columna se equilibró primero con tampón de Na/K-fosfato 100 mM, pH 7,5, y luego con al menos 12 VC de tampón equilibrador.

El producto eluido de la columna de HPLC se aplicó a una temperatura de $5 \pm 4^\circ\text{C}$ y a un caudal de 150 ml/min aproximadamente. La columna se equilibró a igual temperatura y caudal con al menos 5 VC de tampón equilibrador y después se lavó con aprox. 10 VC de tampón de lavado. A continuación se lavó de nuevo con aprox. 10 VC de tampón equilibrador y luego se eluyó con aprox. 7 VC de tampón de elución. El pico de proteína total (aprox. 2 - 5 l) se recogió, se filtró en condiciones de esterilidad y se envasó.

En esta cromatografía se separó el disolvente de la etapa de HPLC y se eliminaron trazas de impurezas. La pureza fue superior al 99%.

Tampón equilibrador:	Na/K-fosfato 10 mM, pH $7,5, \pm 0,2$
Tampón de lavado:	Na-acetato 30 mM, pH $4,5, \pm 0,1$
Tampón de elución:	Na/K-fosfato 10 mM, NaCl 80 mM, pH $7,5 \pm 0,2$

Ejemplo 3: purificación de EPO de sobrenadantes de cultivo, manteniendo las isoformas 1 - 4 (presente invención)

1. Material de partida

Se fermentó EPO de células de mamíferos, p.ej. de células CHO o células humanas, mediante el proceso repetido por lotes. Se inoculó un fermentador de 10 l con un precultivo y al cabo de unos 5 días se recolectó su contenido. Después de la recolección las células del caldo de fermentación se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante libre de células se ajustó a pH 5,0 - 5,2 con ácido acético 1 M y se filtró a $1 - 9^\circ\text{C}$.

2. Cromatografía en columna de azul-sefarosa

Una columna cromatográfica apropiada se llenó con 150 - 250 ml de azul-sefarosa y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación se equilibró con aprox. 3 volúmenes de columna (VC) de tampón de acetato.

El sobrenadante del cultivo libre de células, ajustado a pH 5, se aplicó a la columna a una temperatura de $10 \pm 5^\circ\text{C}$ y a un caudal de 1 - 2 VC/h. Después se lavó la columna al mismo caudal y a $5 \pm 4^\circ\text{C}$ con aprox. 1 VC de tampón de lavado 1 y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado 2. A continuación se eluyó la columna con aprox. 3 - 6 VC de tampón de elución. El pico de proteína se recogió en fracciones. Tras el análisis por EC se agruparon las fracciones adecuadas, se ajustaron a pH 6,9 con HCl y se conservaron a $5 \pm 4^\circ\text{C}$ hasta su reprocesamiento. En esta etapa cromatográfica se concentró la solución del producto y se separaron impurezas e isoformas básicas.

Tampón equilibrador:	Na-acetato 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,1 M, pH $5,0 \pm 0,2$
Tampón de lavado 1:	Na-acetato 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,25 M, pH $5,0 \pm 0,2$
Tampón de lavado 2:	Tris HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, pH $6,5 \pm 0,3$
Tampón de elución:	Tris HCl 50 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,25 M, pH $8,0 \pm 0,2$

3. Cromatografía sobre Butil-Toyopearl (cromatografía hidrófoba)

Una columna cromatográfica adecuada se llenó con 200 - 300 ml de Butil-Toyopearl y se regeneró con guanidina-HCl 4 M y NaOH 0,5 N. A continuación la columna se equilibró con al menos 3 VC de tampón equilibrador.

El producto eluido de la columna de azul-sefarosa se ajustó a 10% de isopropanol y se aplicó sobre la columna a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un caudal de 1 - 2 VC/h. La columna se lavó a igual temperatura y caudal con aprox. 1 VC de tampón equilibrador y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado. A continuación se eluyó con aprox. 5 - 10 VC de tampón de elución. Se recogieron fracciones del pico de proteína y se diluyeron enseguida 3 veces con tampón de dilución. Tras el análisis por EC se agruparon las fracciones adecuadas y se conservaron a 15°C hasta su reprocesamiento. En esta cromatografía se separaron más isoformas básicas y se consiguió una pureza $> 80\%$.

Tampón equilibrador: Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,2 M, 10% de isopropanol, $\text{pH } 6,9 \pm 0,2$

Tampón de lavado: Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,2 M, 17% de isopropanol, $\text{pH } 6,9 \pm 0,2$

Tampón de elución: Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,2 M, 23% de isopropanol, $\text{pH } 6,9 \pm 0,2$

Tampón de dilución: Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, $\text{pH } 6,9 \pm 0,2$

4. Cromatografía sobre hidroxiapatito Ultrogel

Una columna cromatográfica adecuada se cargó con 150 - 200 ml de hidroxiapatito Ultrogel y se regeneró con NaOH 0,5 N. A continuación la columna se equilibró con al menos 4 VC de tampón equilibrador.

El producto eluido de la columna de Butil-Toyopearl se aplicó sobre la columna a una temperatura de aprox. 15°C y a un caudal de 1-2 VC/h. La columna se lavó a igual temperatura y caudal con aprox. 1 VC de tampón equilibrador y luego con aprox. 2 VC de tampón de lavado. A continuación se eluyó con aprox. 3 VC de tampón de elución. El pico de proteína total se recogió y se conservó a 15°C hasta su reprocesamiento. En esta cromatografía se alcanzó una pureza superior al 95%.

Tampón equilibrador: Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 0,06 M, 7,5% de isopropanol, $\text{pH } 6,9 \pm 0,2$

Tampón de lavado: Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 5 mM, $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$

Tampón de elución: Tris-HCl 10 mM, K-fosfato 10 mM, CaCl_2 0,5 mM, $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$

5. HPLC de fase inversa HPLC (RP-HPLC)

Se efectuó una HPLC semipreparativa con una columna separadora Vydac C4 (20 mm x 250 mm, aprox. 80 ml) a una temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$. Antes de usarla, la columna se regeneró aplicando varias veces un gradiente de tampón A hasta 100% de disolvente y a continuación se equilibró con tampón A.

El producto eluido de la columna de hidroxiapatito se aplicó a una temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$ y a un caudal de 8 - 15 ml/min. La columna se eluyó a igual temperatura y caudal con un gradiente lineal de tampón A hacia tampón B según el siguiente protocolo de HPLC. El pico de elución se recogió en fracciones. El producto eluido se diluyó enseguida poniendo previamente 4 volúmenes de tampón de dilución de HPLC.

Protocolo de HPLC:

Tiempo (min)	Etapas	% de tampón A	% de tampón B
	Inicio		
0,0		100	0
	Lavado 1		
10,0		100	0
	Lavado 2		
20,0		50	50
	Lavado 3 y elución (*)		
160,0		0	100
	Lavado posterior		
170,0		0	100
	Reajuste a las condiciones iniciales		
171,0		100	0
(*) Lavado 3 y condiciones de elución: gradiente de 50% de tampón B hacia 100% de tampón B en 50 hasta 200 min, preferiblemente 140 min.			

Se reunieron las fracciones que dieron una pureza mínima del 99% en la HPLC analítica y resultaron adecuadas tras el análisis por EC. En esta cromatografía se separaron trazas de impurezas, así como restos de isoformas básicas y se alcanzó una pureza superior al 99%.

Tampón A: Na/K-fosfato 10 mM, pH 7,0 ± 0,2
 Tampón B: Na/K-fosfato 10 mM, 80% de acetonitrilo, pH 7,0 ± 0,2
 Tampón de dilución HPLC: Na/K-fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 ± 0,2

6. Diafiltración

Un aparato de diafiltración de tamaño adecuado se cargó con un cartucho de 10 kD y se regeneró con NaOH 1 N. A continuación se barrió el aparato con tampón de proceso exento de álcali.

El producto eluido de la columna de HPLC se concentró a una temperatura de 5 ± 4°C y se diafiltró contra 10 volúmenes de tampón de proceso. La concentración final debía estar comprendida entre 1 y 3 mg/ml.

Esta etapa sirve para eliminar restos de disolvente de la etapa de HPLC, para regular las condiciones que requiere el tampón de proceso y la concentración de la sustancia activa libre.

Tampón de proceso: Na/K-fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 ± 0,2

Ejemplo 4: determinación de la actividad específica de la EPO in vivo (bioensayo en ratón normocitémico)

La acción de la EPO dependiente de la dosis sobre la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eritrocitos se determinó in vivo en ratones mediante el aumento de los reticulocitos en sangre tras la administración de EPO.

Para ello se administraron respectivamente por vía parenteral a ocho ratones diversas dosis de la muestra de EPO objeto del análisis y de una EPO estándar (calibrada contra la EPO-WHO estándar). A continuación los ratones se mantuvieron en condiciones constantes y definidas. A los 4 días de la administración de la EPO se extrajo sangre de los ratones y los reticulocitos se tiñeron con naranja de acridina. El número de reticulocitos por 30.000 eritrocitos se determinó por microfluorimetría en un citómetro de flujo, analizando el histograma de fluorescencia roja.

La actividad biológica se calculó a partir de los valores del número de reticulocitos de la muestra y del estándar para distintas dosis, según el método de determinación del contenido por pares con rectas paralelas descrito por Linder (Linder, Planificación y evaluación de ensayos, 3ª edición, editorial Birkenhäuser, Basilea).

Al purificar la EPO de los sobrenadantes de células CHO cultivadas en medio exento de suero se obtuvieron los preparados de EPO CHO 1, CHO 2 y CHO 3, los cuales tenían una actividad biológica de 248.000 (CHO 1), 225.000 (CHO 2) y 186.000 UI/mg (CHO 3). En cinco preparados de EPO purificada a partir de sobrenadantes de células humanas se obtuvieron productos con actividades específicas de 220.000 (HeLa 1), 198.000 (HeLa 2), 204.000 (HeLa 3), 176.000 (HeLa 4) y 100.000 IU/mg (HeLa 5). En el ejemplo 11 se indica la correlación de los valores de la actividad específica con parámetros de la estructura del azúcar.

Ejemplo 5: determinación del contenido de ésteres de ácido siálico

El contenido de ácido siálico se determinó cromatográficamente por HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada) en un sistema Dionex tras la separación enzimática de los ácidos siálicos con neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (A. ureaf., de Boehringer Mannheim).

Unas preparaciones con respectivamente 22 µg de EPO procedente de varias líneas celulares CHO y humanas (p.ej. HeLa S3) se ajustaron a una concentración de 0,2 mg/ml de EPO en tampón de Na-fosfato 5 mM a pH 7,2. Una mitad de cada preparación se utilizó para la determinar exactamente la cantidad de EPO por RP-HPLC. A la 2ª mitad de las preparaciones se añadieron respectivamente 5 mM/U de neuraminidasa de A. ureaf. y se incubaron durante la noche (aprox. 18 h) a 37°C. A continuación las preparaciones digeridas se dividieron en dos mitades, se diluyeron 20 veces a 500 µl con H₂O y 50 µl de cada (correspondientes aprox. a 27 pmoles de EPO) se aplicaron sobre el sistema Dionex. Para ello se usaron los siguientes parámetros cromatográficos:

Columna: CarboPac PA 100
 Caudal: 1,0 ml/min
 Sensibilidad del detector: 300 nA

Gradiente:	t (min)	% de tampón B
	0	17
	7	17
	9	100
	12	100
	13	0
	20	0

Tampón A: NaOH 0,1 M
 Tampón B: NaOH 0,1 M; Na-acetato 0,5 M

5 La cantidad de ácidos siálicos en la muestra aplicada se calculó con la ayuda de una recta de calibración obtenida a partir de valores de un patrón de ácido siálico (de Boehringer Mannheim) analizado en paralelo con la muestra. El contenido de ácido siálico (moles de ácido siálico/mol de EPO) se calculó a partir del resultado de la determinación de ácidos siálicos (sistema Dionex) y de la determinación de la cantidad de EPO por RP-HPLC.

10 La EPO de células CHO tenía un contenido promedio de 12,9 moles (CHO 1), 11,8 moles (CHO 2) y 11,7 moles (CHO 3) de ácido siálico por mol de EPO. Las preparaciones de EPO procedente de células humanas tenían un contenido de 13,1 moles (HeLa 1), 13,2 moles (HeLa 2), 13,3 moles (HeLa 3), 11,6 moles (HeLa 4) y 10,8 moles (HeLa 5) de ácido siálico por mol de EPO (véase también el ejemplo 11).

15 **Ejemplo 6: determinación de los porcentajes de estructuras carbohidratadas bi-, tri- y tetraantenarias**

Las estructuras carbohidratadas unidas a N se analizaron por cromatografía HPAEC-PAD sobre un sistema Dionex. Los asialo-oligosacáridos de preparados de EPO procedentes de líneas celulares CHO y humanas (p.ej. HeLa S3) se obtuvieron por separación enzimática con N-glicosidasa F (de Boehringer Mannheim) y neuraminidasa de A. ureaf. (de Boehringer Mannheim).

20 De cada preparado se desalinizaron 10 o 30 µg de EPO mediante unidades MicroCon de ultracentrifugación (de Amicon, tamaño de exclusión 10 kD) y se ajustaron con tampón de Na-fosfato 10 mM de pH 7,2 a una concentración de 0,2 o 0,3 mg/ml. A continuación cada preparado se mezcló con 1 U de N-glicosidasa F y 10 mU de neuraminidasa y se incubó por la noche (aprox. 18 h) a 37°C. Para separar la parte polipeptídica de la EPO de los oligosacáridos disociados, los preparados se centrifugaron tras la incubación con unidades de centrifugación Ultrafree (de Millipore, tamaño de exclusión 10 kD) y luego el dispositivo Ultrafree se lavó dos veces con 20 ml de H₂O. Los oligosacáridos contenidos en el circuito se completaron con H₂O hasta 150 ml y de ahí 100 ml se analizaron en el sistema Dionex. Para ello se usaron los siguientes parámetros cromatográficos:

30 Columna: CarboPac PA 100
 Caudal: 1,0 ml/min
 Sensibilidad del detector: 300 nA

35 Gradiente: t (min) % de tampón B
 0 0
 2 0
 60 10
 62 10
 67 0

40 t (min) % de tampón B
 69 0
 80 0

45 Tampón A: NaOH 0,1 M
 Tampón B: NaOH 0,1 M; Na-acetato 0,5 M

50 En un cromatograma de N-azúcares complejos los picos se identificaron mediante oligosacáridos patrón (de Oxford Glyco Systems) y se verificaron mediante la digestión enzimática de oligosacáridos de EPO con el enzima endo-β-galactosidasa o fucosidasa, seguida de análisis en el sistema Dionex. Los porcentajes de estructuras bi-, tri- y tetraantenarias se calcularon por las áreas de los picos representativos de la correspondiente estructura de N-azúcar con respecto al área total de los mismos (suma de las áreas de los picos de las estructuras bi-, tri- y tetraantenarias).

55 La EPO procedente de las células CHO contenía 4,2% de estructuras carbohidratadas biantenarias, 22,3% de estructuras carbohidratadas triantenarias y 73,5% de estructuras carbohidratadas tetraantenarias (CHO3), así como 86,7% de estructuras carbohidratadas tetraantenarias en el preparado CHO 1 y 78,6% en el preparado CHO 2. En los preparados de EPO procedentes de líneas celulares humanas los porcentajes de estructuras biantenarias/triantenarias/tetraantenarias fueron de 5,8/8,8/85,4% para HeLa 1; 5,1/12,7/82,2% para HeLa 2; 4,1/17,7/78,2% para HeLa 3; 10,1/19,2/70,6% para HeLa 4 y 12,6/25,4/62% para HeLa 5 (véase también el ejemplo 11).

60 **Ejemplo 7: determinación del contenido medio de unidades de N-acetil-lactosamina y del porcentaje medio de unidades adicionales de N-acetil-lactosamina (repeticiones)**

65 El número total de unidades de N-acetil-lactosamina en las estructuras carbohidratadas de EPO unidas a N (es decir, en las estructuras carbohidratadas principales más las repeticiones) se calculó a partir de las áreas de los picos del cromatograma del ensayo del ejemplo 6.

El contenido medio (n) de unidades de N-acetil-lactosamina por cadena carbohidratada se calculó como sigue.

$$n = \frac{\Sigma \% (bi) \times 2 + \% (tri) \times 3 + \% (tetra) \times 4 + \% (tri + 1r) \times 4 + \% (tetra + 1r) \times 5 + \% (tri + 2r) \times 5 + \% (tetra + 2r) \times 6}{5}$$

donde

% (bi) = porcentaje de estructuras biantenarias respecto a la cantidad total (100%) de estructuras carbohidratadas unidas a N

% (tri) = porcentaje de estructuras triantenarias sin unidades adicionales de N-acetil-lactosamina

% (tetra) = porcentaje de estructuras tetraantenarias sin unidades adicionales de N-acetil-lactosamina

% (tri + 1r) = porcentaje de estructuras triantenarias más 1 unidad adicional de N-acetil-lactosamina

% (tetra + 1r) = porcentaje de estructuras tetraantenarias más 1 unidad adicional de N-acetil-lactosamina

% (tri + 2r) = porcentaje de estructuras triantenarias más 2 unidades adicionales de N-acetil-lactosamina

% (tetra + 2r) = porcentaje de estructuras tetraantenarias más 2 unidades adicionales de N-acetil-lactosamina

En la EPO de células CHO se encontró un número promedio de 4,3 (CHO 1), 4,4 (CHO 2) y 4,2 (CHO 3) unidades de N-acetil-lactosamina por cadena carbohidratada. En los preparados de EPO de células humanas se encontró un número promedio de 4,0 (HeLa 1), 4,0 (HeLa 2), 3,9 (HeLa 3), 3,75 (HeLa 4) y 3,6 (HeLa 5) unidades de N-acetil-lactosamina (véase también el ejemplo 11).

Como la EPO contiene 3 estructuras de azúcar unidas a N, el número total de unidades de N-acetil-lactosamina es 3 veces mayor. Por lo tanto, referido a la glicosilación total de la EPO, el número de unidades de N-acetil-lactosamina en la EPO de células CHO es de 12,9 (CHO 1), 13,2 (CHO 2) y 12,6 (CHO 3). Los valores correspondientes en los preparados de EPO de células humanas fueron 12,0 (HeLa 1), 11,9 (HeLa 2), 11,7 (HeLa 3), 11,25 (HeLa 4) y 10,8 (HeLa 5).

En la EPO de células CHO el producto del número de unidades de N-acetil-lactosamina por cadena carbohidratada por el contenido respectivo de ácidos siálicos dio valores de von 55,5 (CHO 1), 52 (CHO 2) y 49,3 (CHO 3).

En los preparados de EPO de células humanas los respectivos valores fueron de 52,4 (HeLa 1), 52,5 (HeLa 2), 51,3 (HeLa 3), 43,5 (HeLa 4) y 38,9 (HeLa 5).

Referido a la glicosilación total de la EPO (3 estructuras carbohidratadas unidas a N), el producto del número de unidades de N-acetil-lactosamina por el contenido respectivo de ácidos siálicos en la EPO de células CHO es de 166,5 (CHO 1), 156 (CHO 2) y 147,9 (CHO 3). En los preparados de EPO de células humanas los respectivos valores fueron de 157,2 (HeLa 1), 157,5 (HeLa 2), 153,9 (HeLa 3), 130,5 (HeLa 4) y 116,7 (HeLa 5) (véase también el ejemplo 11).

Otro parámetro importante es el porcentaje de unidades de N-acetil-lactosamina que, en forma de las llamadas repeticiones, pueden estar unidas a las estructuras carbohidratadas principales (véase p.ej. la fig. 1). El contenido de repeticiones se indica como el porcentaje de estructuras carbohidratadas repetidas respecto a la suma de todas las estructuras carbohidratadas unidas a N (bi + tri + tetra = 100%).

Este porcentaje de repeticiones puede ser diferente en los preparados de células CHO y de células humanas. En los preparados de células CHO se hallaron porcentajes de repeticiones del 39,6% (CHO 1), 51% (CHO 2) y 36,8% (CHO 3). En los preparados de células humanas los porcentajes de repeticiones fueron del 18% (HeLa 1), 16,5% (HeLa 2), 14,0% (HeLa 3), 12,2% (HeLa 4) y 9,8% (HeLa 5) (véase el ejemplo 11).

Ejemplo 8: influencia en la actividad biológica de la EPO mediante realimentación controlada en función de la demanda

Los cultivos se realizaron por lotes repetidos con alimentación en función de la demanda (lotes de alimentación repetida) a una temperatura de 36,5°C. Para ello se introdujo un medio de cultivo libre de suero y con poca proteína en un fermentador agitado (volumen total: 10 l) y se inoculó una vez con un cultivo de inóculos. La densidad celular tras la inoculación fue de $3 \pm 1 \times 10^5$ células vivas/ml.

Tras una fase de crecimiento de 144 ± 24 horas se recolectó una parte del caldo de cultivo. El resto permaneció en el fermentador como inóculo para la siguiente fase de crecimiento; para ello se rellenó el fermentador con medio fresco hasta el volumen de trabajo.

El sobrenadante de cultivo que contenía EPO se obtuvo por centrifugación del cultivo del fermentador.

Durante la fase de crecimiento el cultivo se alimentó continuamente con solución nutriente. Para ello se acopló al fermentador un depósito de reserva de solución nutriente que contenía aminoácidos, vitaminas, insulina, oligoelementos, sales, glutamina e hidratos de carbono. Se llevaron a cabo 2 fermentaciones del modo siguiente:

5 En la fermentación A la solución nutriente contenía como azúcar D-(+)-glucosa y en la fermentación B los azúcares D-(+)-glucosa, D-(+)-galactosa y D-(+)-manosa. La relación másica de glutamina a los azúcares fue de 1:2,2:3,6:6 en la fermentación B. La concentración de cada azúcar en la solución nutriente estaba comprendida entre 7,2 y 18 g/l.

10 La concentración de glutamina en el cultivo se analizó periódicamente durante la fermentación B y se calculó su consumo. El volumen momentáneo de solución nutriente dosificada se adaptó a la demanda celular de nutrientes. En la fermentación A no se usó la concentración de glutamina como magnitud reguladora. En la fermentación B la solución nutriente contenía una mezcla de los azúcares D-(+)-glucosa, D-(+)-galactosa y D-(+)-manosa en relación másica 2:3:5. Durante el cultivo la concentración de todos los azúcares en el fermentador se mantuvo en un intervalo de 2 hasta 6 g/l mediante la correspondiente realimentación.

15 Debido al crecimiento la densidad celular subió a más de 20×10^5 células/ml, normalmente a 30×10^5 células/ml en el momento de la recolección. En este momento la concentración de EPO fue típicamente de 40 ± 10 mg/l.

20 De los caldos de cultivo recogidos se determinó la concentración de eritropoyetina humana, p.ej. mediante ELISA. La distribución porcentual de las isoformas presentes de esta proteína se determinó, p.ej., mediante separación por electroforesis capilar zonal (ECZ).

25 La tabla 1 compara la distribución de isoformas de EPO entre una fermentación A realimentada con una solución nutriente de glucosa y una fermentación B realimentada de manera controlada en función de la demanda con una solución nutriente de glucosa, manosa y galactosa. El contenido de isoformas de EPO en la fermentación B se calculó como porcentaje de las correspondientes isoformas de la fermentación A. Estas últimas se normalizaron a 100% respectivamente. Los datos demuestran que las isoformas de EPO 2-4 con más alto grado de glicosilación esperadas durante la fermentación se hallan en mucha mayor proporción que en la fermentación A.

30 Tabla 1:

Designación de la isoforma en la ECZ	1	2	3	4	5	6	7	8
Distribución relativa de las isoformas	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Fermentación A: realimentación con glucosa	n.d.	100	100	100	100	100	100	100
Fermentación B: realimentación en función de la demanda con glucosa, manosa y galactosa	n.d.	136	140	115	102	91	76	55
n.d. = no determinable, porque el valor es inferior al límite de detección								

35 El patrón de isoformas obtenido con la realimentación fue reproducible en cuatro recolecciones sucesivas de una fermentación realimentada con la solución nutriente de manera controlada en función de la demanda.

Ejemplo 9: influencia en la actividad biológica de la EPO variando la temperatura de cultivo

40 El proceso fue el mismo que el descrito en el ejemplo 8 (fermentación B), es decir lotes separados alimentados de manera controlada en función de la demanda, pero la fermentación se realizó a una temperatura de 35,0°C en vez de 36,5°C y a una escala de 1000 l.

45 La tabla 2 compara la distribución de isoformas de EPO entre una fermentación C a 36,5°C y una fermentación D a 35,0°C, en ambos casos con realimentación controlada en función de la demanda. El contenido de isoformas de EPO en la fermentación D se calculó como porcentaje de las correspondientes isoformas de la fermentación C. Estas últimas se normalizaron a 100% respectivamente. Los datos demuestran que las isoformas ácidas de la EPO 2 a 4 se pueden aumentar considerablemente rebajando la temperatura.

Tabla 2:

Designación de la isoforma en la ECZ	1	2	3	4	5	6	7	8
Distribución relativa de las isoformas	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Fermentación C: temperatura 36,5°C	n.d.	100	100	100	100	100	100	100
Fermentación D: temperatura 35,0°C	n.d.	131	116	110	94	100	88	86
n.d. = no determinable, porque el valor es inferior al límite de detección								

50 **Ejemplo 10: influencia en la actividad biológica de la EPO variando la composición de hidratos de carbono en el medio**

El proceso expuesto a continuación demuestra la posibilidad de modificar la calidad de la eritropoyetina humana variando la provisión de hidratos de carbono en el medio de realimentación.

5 Se indican dos variantes del proceso arriba descrito (llamadas en lo sucesivo fermentación E y fermentación F), las cuales se distinguen por la composición de los medios empleados.

10 La receta del medio de cultivo para ambas preparaciones se basó en medio eRDF modificado. No se usó ningún suero, sino insulina recombinante (la única adición de proteína) y otros suplementos (p.ej. selenita, putresceína, hidrocortisona, sulfato de hierro) habitualmente utilizados en los medios exentos de suero o de proteínas.

15 La solución nutriente de realimentación también se basa en un medio eRDF modificado, pero no contiene las sales KCl, Na₂HPO₄ y NaCl.

La diferencia importante entre las fermentaciones E y F reside en la adición de distintos monosacáridos al medio de realimentación.

Fermentación E:

20 En la fermentación E se utilizó el azúcar D-(+)-glucosa, normalmente empleado. La concentración inicial fue de 3 g/l. Mediante una realimentación adecuada con solución nutriente que contenía glucosa, su concentración en el caldo de cultivo se mantuvo constante a 3 ± 0,5 g/l durante todo el cultivo.

25 El cultivo duró normalmente 100 ± 20 h. La concentración de EPO en el momento de la recolección fue típicamente de 40 ± 10 mg/l.

Fermentación F:

30 En la fermentación F, junto a la D-(+)-glucosa, se utilizaron los azúcares D-(+)-galactosa y D-(+)-manosa en relación másica 1:2:3 para el medio de realimentación. Durante el cultivo la concentración de todos los azúcares se mantuvo en un intervalo entre 0,25 g/l y 3,5 g/l mediante una realimentación adecuada.

35 El cultivo duró normalmente 100 ± 20 h. La concentración de EPO en el momento de la recolección fue típicamente de 40 ± 10 mg/l.

Se purificó la eritropoyetina de los sobrenadantes del cultivo. El proceso de purificación se diseñó de forma que no alterase la distribución de las isoformas relevantes de la glicoproteína (véase el ejemplo 2).

La distribución de las isoformas de la eritropoyetina purificada se determinó del modo anteriormente descrito.

40 Las estructuras carbohidratadas de las isoformas de la eritropoyetina humana y su distribución son diferentes en los sobrenadantes de cultivo recogidos de las fermentaciones E y F. La fermentación E presenta un porcentaje de las isoformas 2, 3 y 4 claramente superior en comparación con la fermentación F. Estas diferencias son debidas a una realimentación con los monosacáridos manosa y galactosa (véase la fig. 2).

45 La actividad biológica determinada mediante el ensayo de ratón normocitémico (ejemplo 4) se correlaciona con la distribución y las estructuras carbohidratadas de las isoformas de EPO (fig. 3). Las estructuras carbohidratadas de los preparados de EPO obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos E y F se analizaron por ECZ y HPAEC.

50 En la tabla 3 se indica la antenaridad (contenido de bi-, tri- y tetraestructuras), el contenido de unidades de N-acetil-lactosamina (LE), el contenido de ácido siálico (AS) y el producto de LE y AS de ambos preparados de EPO.

Tabla 3

	bi [%]	tri [%]	tetra [%]	Contenido de AS	Contenido de LE	LE x AS
Fermentación E	12,6	25,4	62,0	10,8	10,8	116,7
Fermentación F	10,1	19,2	70,6	11,6	11,25	130,5

55 **Ejemplo 11: correlación de la actividad específica con las estructuras de hidrato de carbono**

En este ejemplo se resumen unos estudios sobre la actividad biológica de isoformas individuales de EPO en función de las estructuras carbohidratadas. Para ello se aislaron y compararon isoformas (IF) de distintas fuentes de EPO (diferentes cargas de EPO procedentes de células CHO y de células humanas).

60 **11.1 Aislamiento de isoformas individuales de EPO mediante focalización isoelectrica (FIE) y Western Blot**

A) Realización de la electroforesis (FIE) en gel y del electroblotting en nitrocelulosa

Para aislar las isoformas individuales puras se desalinizó y concentró (5-10 mg/ml) en unidades de centrifugación Ultrafree una solución de EPO constituida por una mezcla de diversas isoformas. 350-1000 µg de esta solución se aplicaron (en 5-10 bandas con 70-100 µg de EPO por banda) sobre un gel de poliacrilamida-FIE fabricado por Serva (Servalyt Precotes, pH 3-5, 300 µm, 125 x 125 mm). La FIE se realizó a 2500 V durante 3,5 h a 5°C; a continuación se transfirió el gel sobre nitrocelulosa (transferencia húmeda en tampón de Tris/glicina con metanol, pero sin SDS, durante 3 h a 200 mA). Tras el proceso de transferencia se retiró el gel y la membrana de nitrocelulosa se tiñó con Ponceau S. Las isoformas teñidas se recortaron y se destiñeron completamente con H₂O o con tampón TBS (Tris 100 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM).

B) Extracción de las isoformas de la membrana

Las tiras de nitrocelulosa destañadas, con las respectivas isoformas, se introdujeron en tubos Eppendorf de 2 ml (correspondientes a 3-4 bandas del gel FIE), se añadieron 1,5 ml de acetona y se disolvió la nitrocelulosa agitando con vórtex. Para conseguir la precipitación óptima de la EPO se incubó por la noche a -20°C. A continuación el precipitado que contenía EPO se separó en una centrífuga de mesa a 14000 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó 2-3 veces con 1 ml de acetona y luego se secó a temperatura ambiente o a 37°C bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación el precipitado de EPO se disolvió en tampón de Na-fosfato 20 mM, pH 7,2 con 0,01% de Tween 20 y se conservó a -20°C hasta otro análisis.

C) Aislamiento de isoformas a partir de soluciones de EPO previamente fraccionadas

Las isoformas individuales se aislaron del modo descrito en A) y B), con la restricción de partir de soluciones de EPO que no contenían isoformas 7-8, sino solo isoformas 3-4. El material de partida fueron fracciones de EPO obtenidas mediante una cromatografía DE (de intercambio aniónico). Estas fracciones solo contenían 3-4 isoformas (p.ej. las isoformas 6-8 o 1-4). Para aislar el "paquete de isoformas" se llenó por encargo una columna cromatográfica idónea con 1-2 ml de DEAE-sefarosa ff por 10 mg de EPO y se regeneró con NaOH 0,5 M. A continuación la columna se equilibró primero con 2 VC de tampón neutralizador y después con al menos 5 VC de tampón equilibrador.

Una preparación de EPO purificada, constituida por 8 isoformas, se aplicó a una temperatura de $5 \pm 4^\circ\text{C}$ y a un caudal de hasta 15 VC/h. La columna se lavó luego con 2 hasta 3 VC de tampón equilibrador y a continuación se barrió con tampón de lavado hasta que el pH quedó a 5,0 (aprox. 5 VC).

Los distintos paquetes de isoformas se eluyeron aumentando la concentración de NaCl en el tampón de elución por incrementos de 10 mM, empezando con NaCl 20 mM. Las isoformas básicas se fijan más débilmente al material de intercambio iónico y por tanto se eluyen a fuerzas iónicas bajas; las isoformas ácidas se eluyen a concentraciones de NaCl más elevadas, hasta NaCl 70 mM. La cantidad de isoformas eluidas para una determinada concentración de NaCl depende mucho del material de partida y del volumen de elución.

En cada etapa, de manera general, se eluyó hasta que la DO280 disminuyó al 50% aprox. del valor máximo a esta concentración de NaCl, lo cual correspondió a un volumen comprendido entre 15 y 40 VC. Se logró otra separación de isoformas fraccionando adicionalmente los paquetes de isoformas eluidos a una determinada concentración de NaCl. La velocidad de paso por la columna fue de hasta 15 VC/h.

Tampón neutralizador:	Na/K-fosfato 100 mM, pH $7,5 \pm 0,2$
Tampón equilibrador:	Na/K-fosfato 10 mM, pH $7,5 \pm 0,2$
Tampón de lavado:	NaAc/HAc 30 mM, pH $5,0 \pm 0,2$
Tampón de elución:	NaAc/HAc 10 mM, pH $5,0 \pm 0,2$, NaCl 20 mM e incremento de la concentración por intervalos de 10 mM hasta NaCl 70 mM

De los paquetes de isoformas así obtenidos se prepararon isoformas puras del modo descrito en A) y B).

Las isoformas puras (IF) resultantes de A-C se numeraron según su punto isoeléctrico (PI), de ácidas hasta básicas. La isoforma 2 (IF2) es la isoforma aislada más ácida y tiene el menor PI, la isoforma 8 es la isoforma más básica y tiene el mayor PI. La isoforma 2 fue la de menor PI que se pudo aislar de la mezcla inicial en cantidad suficiente. De la isoforma 1 solo se obtuvo un 1-2% en la mezcla inicial y por tanto no se pudo preparar en cantidad suficiente para un análisis completo.

Para caracterizar las isoformas puras se realizaron los siguientes análisis:

- Determinación de la cantidad y del rendimiento mediante RP-HPLC
- Determinación de la pureza y de la identidad por electroforesis capilar y focalización isoeléctrica

El rendimiento de las isoformas individuales fue en general del 20% al 30% de la isoforma empleada en la mezcla inicial.

La pureza de las isoformas fue en general > 90%, en la mayor parte incluso > 94%.

11.2 Resultados

5 De las isoformas purificadas (IF) se obtuvieron los siguientes datos:

- Distribución relativa de las estructuras carbohidratadas unidas a N (porcentaje de las estructuras bi-, tri- y tetra-
anténarias en la glicosilación total) y del contenido de repeticiones
- Actividad biológica en el ensayo de ratón normocitémico
- 10 – Contenido de ácido siálico

Estas determinaciones se efectuaron sobre todo después de los métodos anteriormente descritos.

15 El contenido de ácido siálico de las isoformas aisladas no se determinó separadamente para cada preparación individual de isoformas, sino para cada una de las isoformas 2-8 de EPO de células CHO y de las isoformas 2-6 de EPO de células humanas, por ejemplo en 1-3 preparaciones.

20 Para calcular el producto del contenido de unidades de N-acetil-lactosamina (valor LE) por el contenido de ácido siálico (AS) se utilizaron los valores enteros, redondeados, de ácido siálico de cada isoforma.

Estos valores redondeados de AS para la EPO de células CHO y humanas fueron los siguientes: 14 (IF2), 13 (IF3), 12 (IF4), 11 (IF5), 10 (IF6), 9 (IF7) y 8 (IF8).

25 La tabla 4 contiene datos de la correlación entre la actividad específica y las estructuras carbohidratadas de distintos preparados de EPO de células CHO (CHO 1, CHO 2 y CHO 3) y de células humanas (HeLa 1 hasta 5). La tabla muestra la correlación entre la actividad biológica y el número total promedio de unidades de N-acetil-lactosamina (LE) en la molécula de EPO, el contenido medio de ácido siálico (AS) y el producto de LE x SA.

30 La tabla 5 contiene datos de la correlación entre la actividad biológica y el número total promedio de unidades de N-acetil-lactosamina (LE) en la molécula de EPO, el contenido medio de ácido siálico (AS) y el producto de LE x SA de las isoformas aisladas de una carga de EPO no fraccionada previamente, procedente de células CHO.

35 La tabla 6 contiene una comparación de distintas preparaciones (A y B) de una isoforma (IF2 o IF5) aislada de diferentes fracciones de una carga de EPO previamente fraccionada, procedente de células CHO; es decir, de cada isoforma 2 o 5 se analizaron 2 preparaciones (A y B). El fraccionamiento previo se efectuó en un intercambiador aniónico DE, tal como está descrito en el ejemplo 11.1.C. Ambas preparaciones A y B de la isoforma IF2 o IF5 se aislaron de diferentes fracciones de la columna DE (la IF2 de las fracciones 5 y 6 y la IF5 de las fracciones 2 y 3). La fracción 5 o 2, de la cual se aisló la isoforma IF2/A o IF5/A, se eluyó antes (a menor concentración salina) de la columna de sefarsa-DE que la fracción 6 o 3, de la cual se aisló la isoforma IF2/B o IF5/B. A pesar de ello las preparaciones A y B de la isoforma 2 y 5 no tienen un comportamiento diferente en la focalización isoelectrónica o en la electroforesis capilar subsiguiente, es decir, ambas preparaciones de IF2 o IF5 tienen el mismo contenido de ácido siálico. Sin embargo se comprobó sorprendentemente que las isoformas de la preparación A tienen una actividad biológica bastante mayor que las respectivas isoformas de la preparación B, debido a su valor LE más elevado y a la mayor proporción de estructuras repetidas. La dependencia de la actividad biológica de una isoforma en función del
40 número total de unidades de N-acetil-lactosamina en la molécula de EPO a igual contenido de ácido siálico, que muestra la tabla 6, no se observó solamente para la isoforma 2 o 5, sino también para otras isoformas.

50 La tabla 7 compara las correspondientes isoformas de diferentes fuentes de EPO (células CHO o células humanas HeLa S3). En este caso también se encuentra una correlación de la actividad biológica con el valor LE x AS.

Por consiguiente en todas las tablas se puede apreciar una correlación entre el producto del número de unidades de N-acetil-lactosamina (LE) por el contenido de ácido siálico (AS) y la actividad biológica. Un mayor valor del producto LE x AS siempre va asociado con una elevada actividad biológica.

55 Tabla 4:

Designación	tetraant. (en %)	repet. ¹ (en %)	LE	AS (mol/mol)	LE x AS	Act. esp. kU/mg
CHO 1	86,7	39,6	12,9	12,9	166,4	248
CHO 2	78,6	51	13,2	11,8	155,8	225
CHO 3	73,5	42,6	12,6	11,7	147,4	186
HeLa 1	85,4	18,0	11,0	13,1	157,2	220
HeLa 2	82,2	16,5	11,9	13,2	157,1	198
HeLa 3	78,2	14,0	11,7	13,3	155,6	204
HeLa 4	70,6	12,2	11,25	11,6	130,5	176
HeLa 5	62	9,8	10,8	10,8	116,7	100

LE: unidades de N-acetil-lactosamina
 AS: contenido de ácido siálico del preparado de EPO
¹: % de todas las estructuras de azúcar con prolongaciones adicionales de LE sobre el total de estructuras de azúcar ((bi + tri + tetra = 100%))

Tabla 5:

	tetraant. (en %)	repet. ¹ (en %)	LE	AS (mol/mol)	LE x AS	Act. esp. kU/mg
IF2	98	48	13,7	14	191,1	400
IF3	86	43	13,1	13	170,3	280
IF4	75	40	12,6	12	151,2	200
IF5	64	39	12,0	11	132	150
IF6	56	41	11,4	10	114	75
IF7	42	39	11,1	9,0	100	40
IF8	34	33	10,5	8,0	84	19

LE: unidades de N-acetil-lactosamina (calculado como en el ejemplo 7)
 AS: contenido de ácido siálico de la correspondiente isoforma
¹: % de todas las estructuras de azúcar con prolongaciones adicionales de LE sobre el total de estructuras de azúcar ((bi + tri + tetra = 100%))

5

Tabla 6:

	tetraant. (en %)	repet. ¹ (en %)	LE	AS (mol/mol)	LE x AS	Act. esp. kU/mg
IF2/A	99	54	14,1	14	197,4	396
IF2/B	97	31	12,9	14	180,6	330
IF5/A	64	58	13,2	11	145,2	206
IF5/B	55	32	11,4	11	125,4	112

LE: unidades de N-acetil-lactosamina (calculado como en el ejemplo 7)
 AS: contenido de ácido siálico de la correspondiente isoforma
¹: % de todas las estructuras de azúcar con prolongaciones adicionales de LE sobre el total de estructuras de azúcar ((bi + tri + tetra = 100%))

10

Tabla 7:

	tetraant. (en %)	repet. ¹ (en %)	LE	AS (mol/mol)	LE x AS	Act. esp. kU/mg
IF2 (CHO 2)	99	58	14,4	14	201,6	440
IF2 (CHO 3)	98	48	13,7	14	191,8	400
IF2 (HeLaS3)	99	24	12,9	14	118,8	240
IF5 (CHO 2)	68	48	12,9	11	141,9	175
IF5 (CHO 3)	64	39	12,0	11	132,0	150
IF5 (HeLaS3)	70	15	10,8	11	119,0	60

LE: unidades de N-acetil-lactosamina (calculado como en el ejemplo 7)
 AS: contenido de ácido siálico de la correspondiente isoforma
¹: % de todas las estructuras de azúcar con prolongaciones adicionales de LE sobre el total de estructuras de azúcar ((bi + tri + tetra = 100%))

15

La figura 4 muestra la dependencia de la actividad biológica de la EPO en función del porcentaje de estructuras carbohidratadas unidas a N con unidades adicionales de N-acetil-lactosamina (repeticiones), tomando como ejemplo isoformas individuales. Las isoformas se aislaron de preparaciones de EPO con distinto porcentaje de estructuras carbohidratadas con repeticiones (EPO 1 con aprox. 50%, EPO 2 con aprox. 40% y EPO 3 con aprox. 15% de estructuras con repeticiones). La actividad biológica de las respectivas isoformas (a igual contenido de ácido siálico y aproximadamente igual antenaridad) es más baja cuanto menor es el porcentaje de estructuras carbohidratadas con repeticiones en las isoformas. Esta característica se puede observar en la isoforma 2 hasta, al menos, la isoforma 7.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de EPO caracterizada porque consta de moléculas de EPO glicosiladas que contienen una cantidad promedio de al menos 3,7 unidades de N-acetil-lactosamina respecto a una cadena de hidrato de carbono unida a N de una molécula de EPO o de al menos 11,1 unidades de N-acetil-lactosamina respecto a la glicosilación total en N de una molécula de EPO, en la cual las moléculas de EPO son el producto de una expresión de ADN endógeno en células humanas y la proporción de cadenas carbohidratadas con repeticiones de N-acetil-lactosamina respecto al número total de cadenas de hidrato de carbono es como mínimo del 10% y la composición de EPO tiene una actividad específica in vivo de al menos 175.000 UI/mg de proteína.
- 10 2. Composición de EPO según la reivindicación 1, caracterizada porque lleva moléculas de EPO glicosiladas en las cuales el valor del producto del número promedio de unidades de N-acetil-lactosamina respecto a una cadena carbohidratada unida a N multiplicado por el contenido medio de ácido siálico por molécula de EPO es como mínimo de 43,3 o bien de 130 respecto a la glicosilación total en N de una molécula de EPO.
- 15 3. Composición de EPO según la reivindicación 2, caracterizada porque el valor del producto es de al menos 46,7 respecto a una cadena carbohidratada unida a N o de al menos 140 respecto a la glicosilación total en N.
- 20 4. Composición de EPO según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque contiene una mezcla de las isoformas 2 hasta 5.
5. Composición de EPO según la reivindicación 4, caracterizada porque contiene una mezcla de las isoformas 3 hasta 4.
- 25 6. Composición de EPO según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque presenta una actividad específica in vivo de al menos 200.000 UI/mg de proteína.
- 30 7. Composición de EPO según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el contenido medio de ácido siálico por molécula es de al menos 11.
8. Composición de EPO según una de las reivindicaciones 1-7, caracterizada porque las células han sido cultivadas en un medio libre de suero.
- 35 9. Preparado farmacéutico caracterizada porque contiene como principio activo una composición de EPO según una de las reivindicaciones 1 a 8, si es preciso junto con los diluyentes, excipientes y soportes farmacéuticos usuales.

Figura 1: estructura carbohidratada tetraantenaria unida a N, con unidades adicionales de N-acetil-lactosamina (repeticiones) y ácidos siálicos

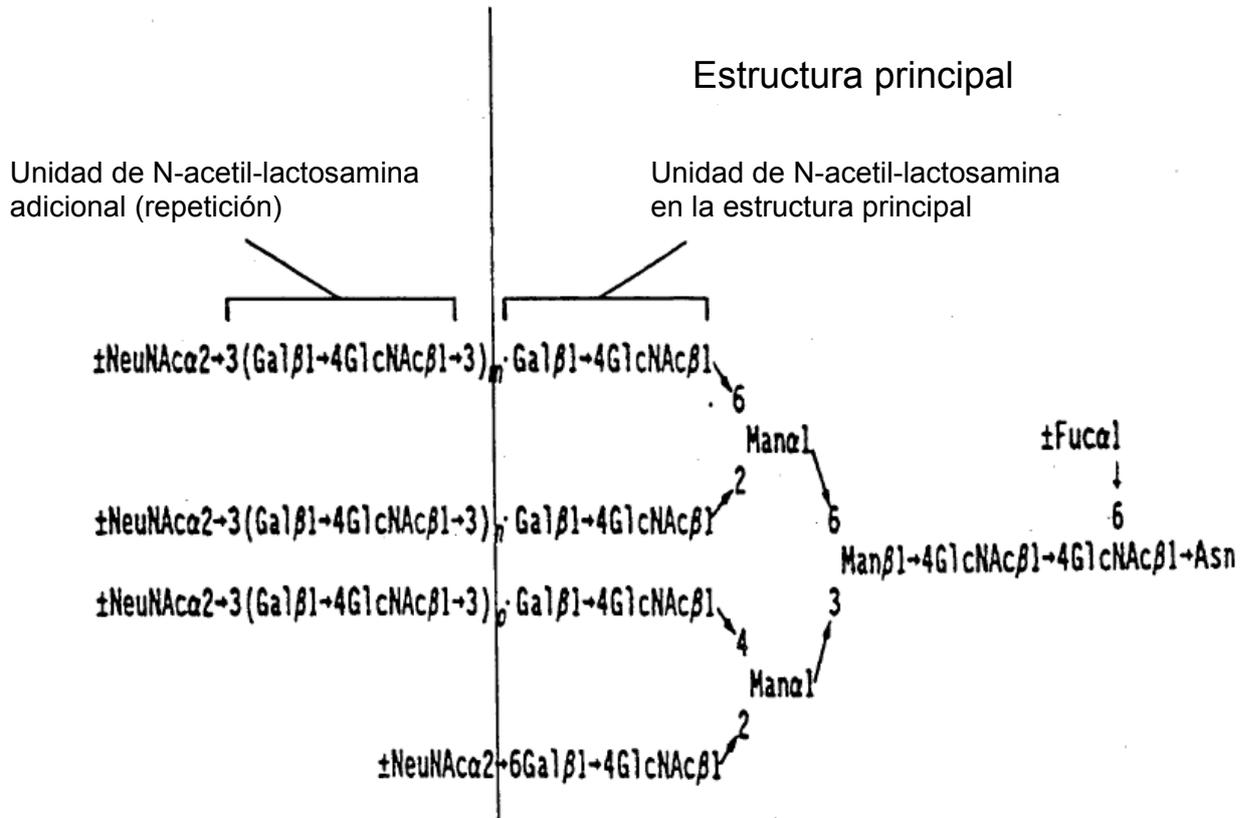


Figura 2

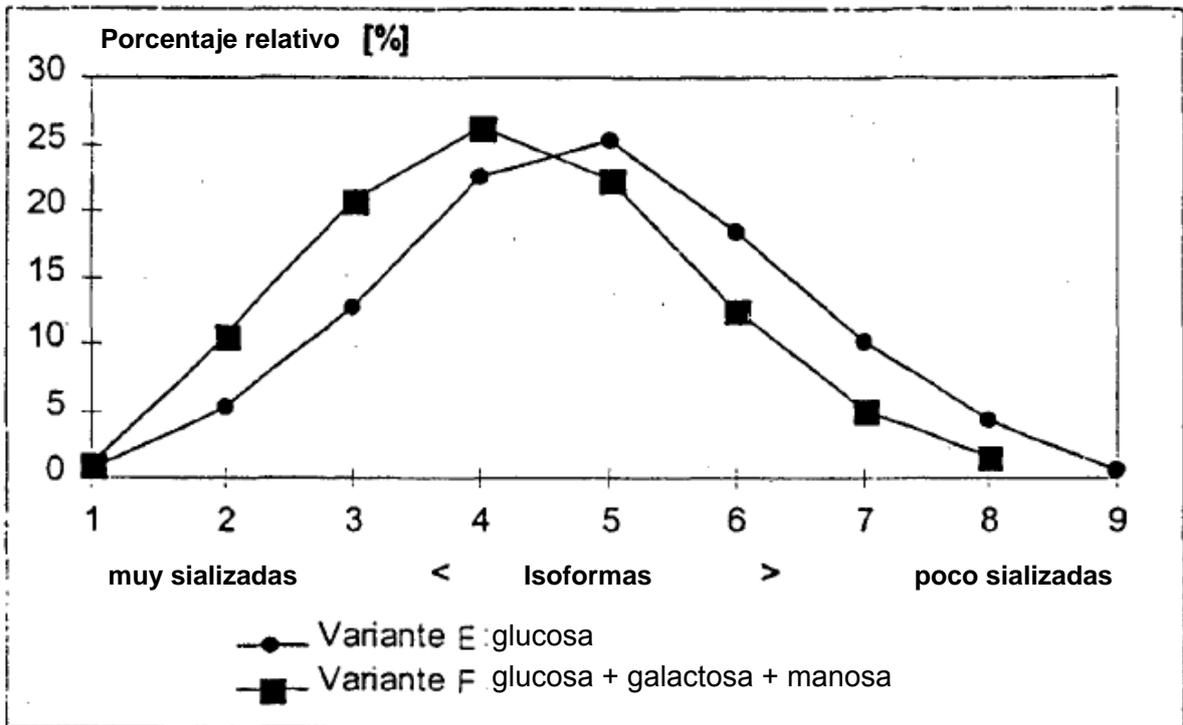


Figura 3

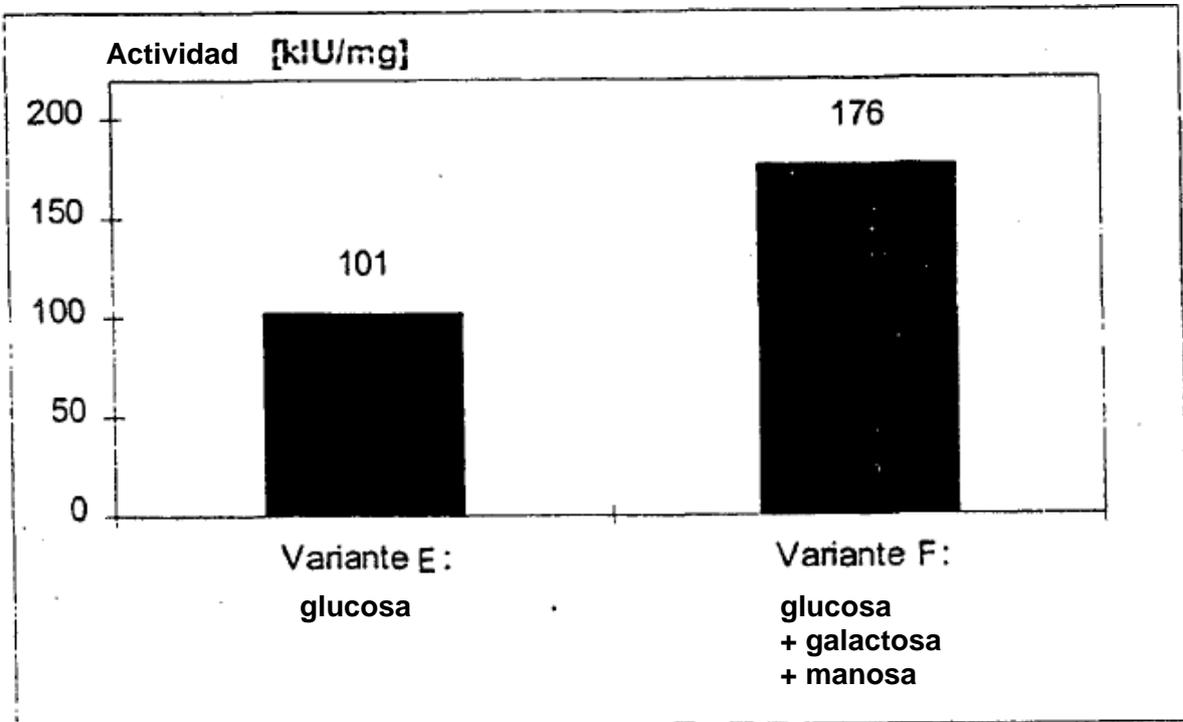


Figura 4:

