

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 945**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2002 E 02803796 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1453857**

54 Título: **Purificación cromatográfica de eritropoyetina humana recombinante**

30 Prioridad:

28.11.2001 US 333839 P

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

02.01.2015

73 Titular/es:

**SANDOZ AG (100.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ALLIGER, PETER y
PALMA, NORBERT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 525 945 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 cromatográfica de eritropoyetina humana recombinante

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de eritropoyetina (EPO) humana recombinante con una composición definida de glicofomas en una forma altamente pura, es decir con una baja cantidad de proteínas de la célula huésped. Esto se logra mediante una secuencia específica de etapas de purificación en combinación con una herramienta analítica para cuantificar las isoformas separadas.

Antecedentes de la invención

10 La eritropoyetina es la principal hormona que regula la proliferación y diferenciación de células progenitoras eritroides y el mantenimiento de los niveles fisiológicos de glóbulos rojos circulantes. En el feto, se produce EPO principalmente en el hígado y aproximadamente el 90% de su producción cambia al riñón tras el nacimiento. Cuando los niveles de EPO caen debido a insuficiencia renal aguda o crónica, debe administrarse EPO externamente para prevenir la aparición de anemia. Una eritropoyetina humana activa terapéuticamente ha estado disponible desde el descubrimiento del gen de EPO y su expresión en células de roedores.

15 El gen de EPO humano codifica para un péptido señal de 27 aminoácidos y una proteína de 166 aminoácidos con un peso molecular calculado de 18396 Dalton. La proteína madura tiene habitualmente una delección N-terminal de un aminoácido, y tiene 165 aminoácidos de longitud. La secuencia señal dirige el péptido a los compartimentos celulares implicados en la glicosilación apropiada, conduciendo a una proteína madura con tres sitios de N-glicosilación y uno de O-glicosilación. El resto azúcar, que constituye aproximadamente el 40% del peso molecular total, es esencial para la actividad biológica completa de EPO. Varios estudios han mostrado que el número de residuos de ácido siálico terminales tiene un efecto positivo sobre la semivida *in vivo*, aunque la actividad *in vitro*, es decir la unión al receptor, es máxima en la forma no glicosilada o parcialmente glicosilada (Takeuchi y Kobata, 1991, *Glycobiology* 1 (4): 337-346). El grado de sialilación es directamente proporcional a la semivida, donde las isoformas con menos ácidos siálicos se aclaran del organismo mucho más rápido y por tanto muestran menos actividad.

25 El objetivo en la generación de una eritropoyetina recombinante altamente activa es crear un producto con un alto grado de residuos de ácido siálico terminales mediante una estrategia de fermentación bien optimizada y mediante un protocolo de purificación selectivo.

30 Hay numerosas publicaciones sobre la purificación de EPO a partir de diferentes fuentes. Antes de la clonación de la eritropoyetina y el uso de tecnología de ADN recombinante, la mayoría de las purificaciones descritas usaban orina humana como fuente natural. Todos los siguientes protocolos para la purificación de EPO acababan con un producto puro sin énfasis en la acumulación de isoformas definidas. T. Miyake *et al.*, 1977, *J. Biol. Chem* 252(15): 5558-5564 describen la purificación de EPO urinaria mediante un procedimiento de siete etapas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, precipitación con etanol, filtración en gel y cromatografía de adsorción. Se describe un procedimiento diferente por N. Inoue *et al.*, 1994, *Biol. Pharm. Bull.*, 17(2): 180-184 que usa cromatografía de intercambio aniónico, filtración en gel, cromatografía de lectina y cromatografía de fase inversa para purificar EPO a partir de orina humana. La orina es también la fuente para la purificación de cinco etapas de G. Krystal *et al.*, 1986, *Blood*, 67(1): 71-79 con Affi-Blue, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de lectina, cromatografía de fase inversa y SDS-PAGE preparativa. H. Yianagi *et al.*, 1987, *J. Chromatogr.* 417: 178-182 publican una combinación diferente de las etapas de purificación establecidas anteriormente. Su protocolo de procesamiento posterior (*downstream-processing*, DSP) comenzaba con orina purificada mediante precipitación con etanol, dos etapas de cromatografía de lectina, cromatografía de hidroxilapatita y de fase inversa.

40 V. Broudy *et al.*, 1988, *Arch. Biochem. Biophys.* 265(2): 329-336 usaron una línea celular BHK transfectada para purificar eritropoyetina mediante cromatografía Affi-Gel blue, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de fase inversa. La EPO purificada no está enriquecida en isoformas específicas.

45 A.B. Ghanem, 1994, *Prep. Biochem.* 24(2): 127-142 y A. Gokana *et al.*, 1997, *J. Chromatogr.* 791: 109-118 usaron DEAE-Sepharcel para separar isoformas de eritropoyetina generadas en una línea celular linfoblástide B tras una etapa de cromatografía de afinidad. Analizaron el producto purificado mediante isoelectroenfoque, pero no agruparon fracciones con una isoforma definida.

50 J. Burg *et al.*, documento WO99/28346 purificaron EPO hasta un alto grado sobre unidades de N-acetil-lactosamina y/o ramificaciones tetraanténicas en la estructura de hidrato de carbono. La secuencia de DSP comienza con un sobrenadante de cultivo celular, captura mediante cromatografía de afinidad, purificación mediante cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita y de fase inversa. Los inconvenientes de este procedimiento son una posible fuga del colorante-ligando Cibacron Blue 3G de la matriz de captura de Blue-Sepharose, una

separación bastante débil de proteínas de la célula huésped mediante la etapa de HIC y una resina de RPC a base de sílice que no es estable a la desinfección mediante NaOH.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método para recuperar y purificar eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) a partir de un medio de cultivo celular que comprende células huésped, método que comprende las etapas de:

10 (a) eliminar células huésped, constituyentes celulares y residuos del medio de cultivo celular realizando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en (i) centrifugación seguida por una etapa de filtración en profundidad, (ii) una etapa de filtración en profundidad y (iii) centrifugación, para obtener un sobrenadante de medio de cultivo clarificado;

(b) ajustar la conductividad del sobrenadante a 5 mS/cm o menos, y un pH de entre aproximadamente 7,0 y 8,0;

(c) aplicar el sobrenadante de la etapa (b) a una columna que comprende un medio cromatográfico de intercambio aniónico, lavar la columna, eluir la EPOhr de la columna y recoger la fracción/fracciones de picos que contienen EPOhr;

15 (d) someter las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) a una etapa de cromatografía de fase inversa usando una resina que puede ejecutarse a presión media (< 10 bar) y es resistente a altas concentraciones de NaOH, eluyéndose la EPOhr usando un gradiente lineal de un disolvente orgánico;

(e) aplicar una o más fracciones eluidas en la etapa (d) que contienen EPOhr a una columna que comprende medios cromatográficos de intercambio aniónico, lavar la columna y eluir la EPOhr usando un gradiente salino lineal;

20 (f) seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (e) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr; y

(g) someter una o más fracciones eluidas en la etapa (f) que contienen EPOhr a una o más etapas cromatográficas de exclusión molecular usando un medio de filtración en gel para eliminar posibles dímeros y agregados superiores; y recoger el eluato que contiene EPOhr.

25 Descripción detallada de la invención

Se ha desarrollado un nuevo protocolo de purificación que hace uso de resinas poliméricas, modernas, que son rígidas y resisten una limpieza rigurosa en lugar de procedimientos que incluyen NaOH 1 M o ácido acético. Además, estas resinas tienen altas capacidades de unión y permiten altas velocidades de flujo para un procedimiento eficaz a escala de producción. No se usan resinas con ligandos que puedan experimentar fugas potencialmente, tales como lectina o colorantes, lo que podría plantear problemas para los pacientes.

30 Las etapas de purificación implementadas tienen diferentes selectividades que conducen a un producto muy puro con bajas cantidades de proteínas o ADN de la célula huésped. Además, en el procedimiento de purificación según la presente invención tal como se explica resumidamente en el presente documento, varias, preferiblemente al menos tres, de las etapas cromatográficas tienen el potencial para separar las isoformas individuales. En particular, las fracciones de la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico (es decir, la etapa (e), véase a continuación), pueden analizarse mediante CZE [*capillary zone electrophoresis*, electroforesis capilar zonal] antes de agrupar y procesar adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel final. Como alternativa, o adicionalmente, las fracciones de la etapa de cromatografía de fase inversa (es decir, la etapa (d), véase a continuación) pueden analizarse mediante CZE y tratarse en consecuencia. Otra posibilidad es realizar (alternativa o adicionalmente) una CZE con las fracciones obtenidas al realizar la primera cromatografía de intercambio aniónico, es decir, la etapa (c), véase a continuación. Usando CZE, las proteínas o los polipéptidos glicosilados, que están contenidos como una mezcla o composición de isoformas en la fracción/fracciones que van a analizarse, se separan en las isoformas específicas. Mediante comparación con patrones de isoformas conocidos, en particular patrones con respecto al patrón de glicosilación, por ejemplo el patrón de sialilación, es posible asignar una estructura específica a cada isoforma separada mediante CZE. En el contexto de la presente invención, esto da como resultado una agrupación de fracciones con una composición definida de isoformas altamente glicosiladas independiente de la calidad de la fuente. En términos generales, en el transcurso de la presente invención se ha establecido que CZE es una herramienta valiosa en la producción de composiciones proteínicas que comprenden isoformas glicosiladas de una proteína o un polipéptido, independientemente de la naturaleza de la propia proteína o polipéptido. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de CZE como herramienta analítica en la producción de una composición definida de isoformas de una proteína o un polipéptido glicosilado. En particular, tal uso puede aplicarse favorablemente en la producción de una composición de isoformas definidas de eritropoyetina

humana recombinante. La presente invención comprende por tanto un método para la producción de una composición de isoformas definidas de una proteína o un polipéptido glicosilado, en particular de eritropoyetina humana recombinante, comprendiendo dicho método analizar muestras (que pueden ser fracciones de una etapa de purificación cromatográfica) que comprende una o más isoformas de una proteína o un polipéptido glicosilado usando CZE y, cuando se desee, agrupar tales muestras que contienen la(s) isoforma(s) deseada(s) de tal proteína o polipéptido glicosilado, en particular en el que dichas isoformas de la proteína o el polipéptido glicosilado son isoformas de eritropoyetina humana recombinante.

Además, este procedimiento está diseñado para liberar sólo cantidades muy bajas de proteasas celulares durante la separación primaria reduciendo la tensión de corte y la lisis celular, y usando condiciones en las que las proteasas residuales no son activas ni perjudiciales para el producto. Esto se logra en primer lugar mediante una separación celular con centrifugas de discos diseñadas de manera hermética para mantener las células intactas y en segundo lugar mediante una etapa de captura usando cromatografía de intercambio aniónico, que funciona a pH neutro. Un pH por debajo de 6 podría dar como resultado escisión por una proteasa activa a pH bajo endógena.

Finalmente, varias etapas en la secuencia de procesamiento posterior (DSP) son robustas en la eliminación y/o inactivación de virus. Éste es un requisito importante para productos terapéuticos derivados de células de mamífero, ya que no puede descartarse contaminación viral. La nanofiltración implementada ayuda especialmente a eliminar incluso virus muy pequeños y no envueltos, tales como parvovirus. La exposición al disolvente durante y/o después de la cromatografía de fase inversa es otra etapa robusta que conduce a inactivación de virus envueltos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para recuperar y purificar eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) a partir de un medio de cultivo celular que comprende células huésped, método que comprende las etapas de:

(a) eliminar células huésped, constituyentes celulares y residuos del medio de cultivo celular realizando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en (i) centrifugación seguida por una etapa de filtración en profundidad, (ii) una etapa de filtración en profundidad y (iii) centrifugación, para obtener un sobrenadante de medio de cultivo clarificado;

(b) ajustar la conductividad del sobrenadante a 5 mS/cm o menos, y un pH de entre aproximadamente 7,0 y 8,0;

(c) aplicar el sobrenadante de la etapa (b) a una columna que comprende un medio cromatográfico de intercambio aniónico, lavar la columna, eluir la EPOhr de la columna y recoger la fracción/fracciones de picos que contienen EPOhr;

(d) someter las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) a una etapa de cromatografía de fase inversa usando una resina que puede ejecutarse a presión media (< 10 bar) y es resistente a altas concentraciones de NaOH, eluyéndose la EPOhr usando un gradiente lineal de un disolvente orgánico;

(e) aplicar una o más fracciones eluidas en la etapa (d) que contienen EPOhr a una columna que comprende medios cromatográficos de intercambio aniónico, lavar la columna y eluir la EPOhr usando un gradiente salino lineal;

(f) seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (e) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr; y

(g) someter una o más fracciones eluidas en etapa (f) que contienen EPOhr a una o más etapas cromatográficas de exclusión molecular usando un medio de filtración en gel para eliminar posibles dímeros y agregados superiores; y recoger el eluato que contiene EPOhr.

Preferiblemente, la centrifugación en la etapa (a) se realiza usando un separador de discos.

En una realización preferida, la conductividad en la etapa (b) se ajusta a entre 2 y 5 mS/cm, preferiblemente a aproximadamente 3 mS/cm.

Ventajosamente, el medio de intercambio aniónico usado en la etapa (c) es el medio de intercambio iónico a base de material cerámico Q-HyperD FTM, que puede obtenerse de BioSeptra. La resina usada en la etapa (d) es ventajosamente una resina que es resistente a una concentración de NaOH de aproximadamente 0,5 M; preferiblemente es una resina de poliestireno, y ventajosamente es Source 30RPCTM (que puede obtenerse de Amersham Biosciences), mientras que el medio de intercambio aniónico usado en la etapa (e) es preferiblemente un medio cromatográfico de intercambio aniónico de Sepharose, y ventajosamente es Q Sepharose High PerformanceTM (que puede obtenerse de Amersham Biosciences). El medio de filtración en gel usado en la etapa (g) es preferiblemente Superdex 75 prep gradeTM (que puede obtenerse de Amersham Biosciences).

En una realización preferida, antes de la etapa (d), las fracciones de picos de la etapa (c), que preferiblemente pueden combinarse, se someten a una etapa de precipitación con sulfato de amonio para precipitar proteínas contaminantes de la célula huésped, ajustándose entonces la concentración de sulfato de amonio del sobrenadante a una concentración compatible con la etapa (d). Antes de cargar la columna de fase inversa de la etapa (d), tal concentración es preferiblemente inferior a sulfato de amonio 0,24 M.

Normalmente, el pH se ajusta en la etapa (b) a aproximadamente pH 7,5. Preferiblemente, el lavado en la etapa (c) se realiza con un tampón acuoso apropiado, por ejemplo un tampón Tris, que comprende una sal, como NaCl. En una realización preferida, se usa un tampón Tris 20 mM con un pH de 7,5, que comprende NaCl 50 mM. La elución se realiza asimismo con un tampón acuoso apropiado, por ejemplo un tampón Tris, que comprende una sal, como NaCl. La etapa de elución en la etapa (c) se realiza generalmente usando un tampón que tiene una concentración de sal de entre 100 mM y 1 M, en particular de más de 125 mM, preferiblemente 150 mM. En una realización preferida, se usa un tampón Tris 20 mM con un pH de 7,5, que comprende NaCl 150 mM, en esta etapa de elución. El disolvente orgánico en la etapa (d) se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en acetonitrilo, etanol y hexilenglicol (es decir 2-metil-2,4-pentanodiol), siendo el acetonitrilo el más preferido. Preferiblemente, antes de aplicar fracciones que comprenden eritropoyetina a la cromatografía de fase inversa, las fracciones se diluyen con un tampón acuoso, como Tris/HCl 20 mM, pH 7,0, que comprende el disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo. Tras aplicar las fracciones diluidas sobre la columna de fase inversa, preferiblemente se lava la columna con un tampón acuoso, como Tris/HCl 20 mM, pH 7,0, que comprende el disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo. Preferiblemente, en la etapa (d) el polipéptido de EPO se eluye empleando un gradiente lineal del disolvente orgánico de desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 100%. En una realización particularmente preferida de la misma, se emplea en la etapa (d) un gradiente lineal de acetonitrilo normalmente de desde aproximadamente el 25% hasta el 50% para la elución. El gradiente salino lineal en la etapa (e) es normalmente de desde 0 hasta 300 mM. Preferiblemente, la sal en las etapas (c) y (e) es NaCl.

En una realización de la presente invención, las fracciones eluidas en la etapa (d), que comprenden el disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo, se diluyen con un tampón acuoso apropiado, que es compatible con la siguiente etapa cromatográfica de intercambio aniónico. Con el fin de inactivar contaminantes virales, antes de la etapa (e) las fracciones diluidas se dejan durante un periodo de tiempo apropiado que es suficiente para lograr la inactivación deseada de tales contaminantes virales. Por ejemplo, la fracción puede diluirse con 0,5 de su volumen con el tampón acuoso (en particular Tris/HCl 20 mM, pH 7,0) e incubarse durante al menos aproximadamente 20 min hasta aproximadamente 40 min, o incluso más tiempo, y luego diluirse adicionalmente con 3,5 volúmenes del volumen original de la fracción con el tampón acuoso.

En una realización preferida de la presente invención, en la etapa (a) a cualquiera de los procedimientos (i), (ii) o (iii) le sigue una etapa de filtración estéril. Normalmente, ésta se realiza usando una unidad de filtración de 0,2 μm .

En una realización adicional de la presente invención, durante el procedimiento de la presente invención pueden someterse fracciones derivadas de una columna cromatográfica a una etapa de ultrafiltración, en particular para la concentración. Por consiguiente, en una realización preferida, en la etapa (g) las fracciones se someten a una etapa de ultrafiltración antes de la etapa de cromatografía de exclusión molecular. En otra realización preferida, en la etapa (d) las fracciones se someten a una etapa de ultrafiltración antes de la cromatografía de fase inversa. En una realización asimismo preferida, si el procedimiento de la presente invención comprende una etapa de precipitación con sulfato de amonio, tal como se describió anteriormente, las fracciones de picos de la etapa (c), solas o combinadas, se someten a una etapa de ultrafiltración antes de tal etapa de precipitación con sulfato de amonio. Preferiblemente, las tres etapas de ultrafiltración mencionadas en el presente documento se emplean en el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, puede usarse una membrana con un corte de entre 5 kDa y 10 kDa, por ejemplo 10 kDa, preferiblemente con un corte de 5 kDa, en tal procedimiento de ultrafiltración.

En una realización preferida, se incluye una etapa de nanofiltración de extremo cerrado para eliminar virus antes o, preferiblemente, después de la etapa (g). Los ejemplos de unidades incluyen los cartuchos o cápsulas Planova 15N (Asahi), PALL Ultipor VF Grade DV20 o Millipore Viresolve NFP.

Tal como se comentó anteriormente, es deseable poder seleccionar isoformas preferidas durante las etapas de purificación y esto puede lograrse usando el método de purificación de la invención. Específicamente, esto puede lograrse porque las diferentes isoformas se resuelven durante tanto la etapa de cromatografía de fase inversa como la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El contenido de diferentes fracciones puede determinarse mediante electroforesis capilar zonal como control en proceso, y combinarse o desecharse fracciones seleccionadas según sea apropiado. En realizaciones preferidas de la presente invención, se realizan uno o más del procedimiento de selección en la etapa (f) o del procedimiento de selección entre la etapa (d) y la etapa (e), tal como se describió anteriormente, usando electroforesis capilar zonal, tal como se explicó anteriormente de manera resumida.

En el contexto de la presente invención, las realizaciones preferidas o particulares tal como se describen en el presente documento pueden combinarse entre sí, dando como resultado de ese modo realizaciones adicionales

preferidas de la misma.

Por tanto en una realización preferida, la presente invención proporciona un método para recuperar y purificar eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) a partir de un cultivo celular recogido, método que comprende las etapas de:

- 5 (a) recoger el cultivo celular y eliminar las células huésped, los constituyentes celulares y los residuos del medio de cultivo realizando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en (i) centrifugación usando un separador de discos seguida por una etapa de filtración en profundidad, (ii) una etapa de filtración en profundidad y (iii) centrifugación, cada una seguida por una etapa de filtración por 0,2 μm para obtener un sobrenadante de cultivo clarificado; y
- 10 (b) ajustar la conductividad del sobrenadante a 5 mS/cm o menos, y un pH de entre aproximadamente 7,0 y 8,0; y
- (c) aplicar el sobrenadante de la etapa (b) a una columna de intercambio aniónico empaquetada con Q-HyperD F, lavar la columna, eluir la EPOhr de la columna y recoger la fracción/fracciones de picos que contienen EPOhr; y
- (d) someter las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) a una etapa de cromatografía de fase inversa usando una resina de poliestireno que puede ejecutarse a presión media (< 10 bar) y es resistente a condiciones de NaOH
- 15 CIP tales como Source 30RPC, eluyéndose la EPOhr usando un gradiente lineal de acetonitrilo; y
- (e) seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (d) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr, aplicar dichas fracciones a una columna de intercambio aniónico de alto rendimiento empaquetada con Q-Sepharose HP, lavar la columna y eluir la EPOhr usando un gradiente salino lineal;
- (f) seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (e) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr, someter dichas fracciones a cromatografía de exclusión molecular usando Superdex 75 prep
- 20 grade para eliminar posibles dímeros y agregados superiores; y recoger el eluato que contiene EPOhr.

Preferiblemente, la determinación respecto a cuál de la una o más fracciones que se obtienen en la etapa (d) y en la etapa (e), respectivamente, van a seleccionarse en la etapa (e) y/o etapa (f), respectivamente, para la purificación cromatográfica adicional se realiza mediante electroforesis capilar zonal. A modo de orientación, se ha mostrado que

25 las formas glicosiladas superiores de EPOhr están presentes en la primera mitad del pico de elución en la etapa de RPC, mientras que en la etapa de Q Sepharose HP las isoformas altamente glicosiladas y sialiladas están presentes en la segunda mitad del pico de elución. Tal como se explicó anteriormente de manera resumida, en una realización preferida antes de la etapa (d), las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) se someten a una etapa de precipitación con sulfato de amonio para precipitar proteínas contaminantes de la célula huésped, ajustándose la concentración de sulfato de amonio del sobrenadante a una concentración compatible con la etapa (d).

30 Preferiblemente, dicha concentración es inferior a sulfato de amonio 0,24 M. Asimismo de manera preferida en este contexto, el método preferido de la presente invención comprende además una etapa de nanofiltración de extremo cerrado para eliminar virus antes o, preferiblemente, después de la etapa (f).

En relación con el material fuente para el procedimiento de purificación, se prefiere que las células huésped se hayan cultivado en medio de cultivo libre de suero. También se prefiere que las células huésped se hayan cultivado usando un procedimiento de fermentación discontinuo de alimentación discontinua. En particular, las células huésped pueden expresar eritropoyetina humana recombinante y secretar la eritropoyetina al medio de cultivo. Las células huésped son generalmente células de mamífero. Células huésped preferidas son células CHO.

La presente invención también proporciona una composición que comprende eritropoyetina humana recombinante purificada producida mediante los métodos de la invención. La presente invención proporciona además eritropoyetina humana recombinante purificada que puede obtenerse mediante los métodos de la invención y una composición, en particular una composición farmacéutica, que comprende dicha eritropoyetina purificada.

Preferiblemente, la composición tiene un contenido definido de isoformas de glicosilación/sialilación de EPOhr. Esto puede lograrse porque las diferentes formas se resuelven durante tanto la etapa de cromatografía de fase inversa como la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El contenido de diferentes fracciones puede determinarse mediante electroforesis capilar zonal como control en proceso, y combinarse o desecharse fracciones seleccionadas según sea apropiado. En particular, la primera mitad del pico de elución se agrupa a partir de la etapa de RPC puesto que es donde están presentes las formas glicosiladas superiores. En cambio, la segunda mitad del pico de elución en la etapa de Q Sepharose HP contiene normalmente las isoformas altamente glicosiladas y sialiladas.

Preferiblemente, en una composición que comprende un polipéptido recombinante, particularmente EPO, expresado en y purificado usando el método de la invención, el polipéptido recombinante es sustancialmente puro, tal como al

menos el 90%, el 95%, el 99% o el 99,5% puro.

La actividad biológica de la proteína purificada puede determinarse *in vitro* y/o *in vivo*. Se describe una prueba *in vitro* adecuadas en Hammerling *et al.*, 1996, J Pharm Biomed Anal 14(11):1455-69, que implica someter a prueba la estimulación proliferativa de una línea celular eritroide. Se describe una prueba *in vivo* adecuada en Ghanem *et al.*, 1994, citado anteriormente, que implica determinar la incorporación de ⁵⁹Fe en glóbulos rojos de ratones policitémicos.

En un aspecto preferido la presente invención puede realizarse conjuntamente con vectores de ácido nucleico y células huésped en el que (a) un primer vector de polinucleótido que comprende (i) una primera secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido recombinante de interés; y (ii) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador seleccionable, segunda secuencia de nucleótidos que se amplifica cuando la célula huésped se pone en contacto con un agente de selección, y (b) un segundo vector de polinucleótido que tiene esencialmente la misma secuencia de nucleótidos que el primer vector de polinucleótido excepto porque la segunda secuencia de nucleótidos se reemplaza por una tercera secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador seleccionable diferente; estando integrados el primer vector de polinucleótido y el segundo vector de polinucleótido en el genoma de la célula huésped.

Preferiblemente la célula huésped es una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Preferiblemente, la segunda secuencia de nucleótidos codifica para un polipéptido de dihidrofolato reductasa y el agente de selección es metotrexato. Preferiblemente, el polipéptido recombinante de interés es eritropoyetina humana. Tales sistemas se describen en la sección de ejemplos de este documento.

Se cultivan células ventajosamente (a) proporcionando una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido recombinante de interés y que dirige la expresión del polipéptido recombinante de interés en la célula huésped; (b) proporcionando un medio de cultivo libre de suero que comprende (i) agua, una peptona derivada de plantas, un regulador de la osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, un precursor o una fuente de lípidos, una fuente de hierro, iones de metales no ferrosos y una o más vitaminas y cofactores; y (ii) no contiene ningún polipéptido de longitud completa; y (c) cultivando la célula huésped en el medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión del polipéptido recombinante de interés.

Preferiblemente, el polipéptido recombinante de interés es eritropoyetina humana. La célula huésped puede ser una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tales técnicas se describen en la sección de ejemplos de este documento.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª ed, John Wiley & Sons, Inc. - y la versión completa titulada Current Protocols in Molecular Biology, que se incorporan en el presente documento como referencia) y métodos químicos.

La presente invención se describe además con referencia a los siguientes ejemplos, que son sólo ilustrativos y no limitativos. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplos

Materiales

Línea de células huésped

Ovario de hámster chino (CHO) deficiente en dihidrofolato reductasa (ATCC CRL-9096). Se han depositado según el Tratado de Budapest con la designación de depósito n.º ATCC PTA-3672 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, Md. 20852, EE.UU., el 29 de agosto de 2001.

Medios de cultivo celular

Medio de cultivo: DMEM complementado con L-glutamina, 4 mM, FCS al 10%, HT (hipoxantina, timidina), 1x

ES 2 525 945 T3

(continuación)

Medio de selección:	DMEM complementado con L-glutamina, 4 mM, FCS dializado, al 10% y G418, 0,5 mg/ml
Medio de amplificación:	DMEM complementado con L-glutamina, 4 mM, FCS dializado, al 10%, G418, 0,5 mg/ml, y MTX (metotrexato), $4,8 \times 10^{-8}$ M - $1,54 \times 10^{-6}$ M
Medio de congelación:	DMEM complementado con L-glutamina, 4 mM, FCS, al 10% y DMSO, al 10%
Medio de adaptación libre de suero para líneas celulares recombinantes:	DMEM/F12 de Ham 1:1, complementado con: L-glutamina, 6 mM, soja-peptona/UF, al 0,25%, complemento de hibridoma, 1 x, Pluronic-F68, al 0,1%, G418, 0,5 mg/ml, MTX, $1,54 \times 10^{-6}$ M
Medio de producción libre de suero:	DMEM/F12 de Ham 1:1, complementado con: soja-peptona/UF, al 0,25%, complemento de hibridoma, 1x, Lutrol, al 0,1%, MTX, $1,54 \times 10^{-6}$ M, glucosa 1 g/l, NaHCO_3 , 2,5 g/l
Medio de congelación libre de suero para líneas celulares recombinantes:	PBS, PVP-10, al 20%, DMSO, al 5%, complemento de hibridoma, 100x etanolamina - $2,5 \times 10^{-3}$ M, citrato férrico - $2,5 \times 10^{-2}$ M, ácido L-ascórbico - $2,0 \times 10^{-3}$ M, selenito de sodio - $5,0 \times 10^{-6}$ M

Constructos de plásmidos

pEpo/neo

- 5 Este plásmido codifica para la región codificante de EPO y el gen de resistencia a neomicina como dos casetes de expresión diferentes cada uno bajo el control de secuencias promotoras/terminadoras tempranas de SV40. Los detalles de construcción se proporcionan en el ejemplo 1.

pEpo/dhfr

- 10 Este plásmido codifica para la región codificante de EPO y dhfr como dos casetes de expresión diferentes cada uno bajo del control de secuencias promotoras/terminadoras tempranas de SV40. Se proporcionan detalles de construcción en el ejemplo 2.

Métodos en cultivo celular

Crecimiento de CHO-dhfr

- 15 Se cultivan células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub *et al.*, 1980, PNAS 77(7):4216-4220) (denominadas CHO dhfr) en medio de cultivo DMEM con una razón de división 1:10 dos veces a la semana.

Transfección de células CHO

- 20 Se siembran $1-5 \times 10^4$ células por cm^2 en botellas de frascos T de 25 cm^2 o placas de 96 pocillos el día antes de que se realice la transfección con lipofectina. Se mezclan los plásmidos correspondientes en la razón apropiada, se añaden al reactivo lipofectina (GIBCO/BRL) según el protocolo del fabricante ($0,5-1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$). Entonces se recubren las células con el cóctel de transfección durante de cuatro a dieciséis horas en DMEM libre de suero, antes de reemplazarse el medio que contiene ADN por medio de cultivo. Tras el cultivo durante de 24 a 48 horas en el medio que contiene suero, se cambian las células a medio de selección. Se cultivan en primer lugar agrupaciones de células transfectadas en medio de selección hasta la confluencia y luego en medio de amplificación (MTX $4,8 \times 10^{-8}$ M) antes del examen de los sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA para determinar la producción de EPO. Se determinan los productores máximos, la concentración de MTX aumentó dos veces y se usan los mejores productores para el cultivo adicional.

Métodos analíticos

ELISA de detección de EPO en diferentes matrices

Anticuerpos

ES 2 525 945 T3

Suero policlonal: anti-EPO de conejo biotinilado (R&D Systems; n.º de catálogo AB-286-NA), anticuerpo monoclonal: anti-EPO de ratón (Genezyme; código de cat. AE7A5)

Tampones de ELISA

Tampón de recubrimiento: NaHCO_3 8,4 g/l, Na_2CO_3 4,2 g/l, pH 9,6-9,8

Tampón de lavado: KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,15 g/l x $2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 0,2 g/l, NaCl 8 g/l, Tween 20 al 0,1%

Tampón de dilución: PVP al 2% (n.º de cat. de Sigma PVP-4OT) en tampón de lavado

Tampón de muestra: alfa-mono-tio-glicerol al 0,5% en tampón de dilución

Tampón de tinción: Ácido cítrico 7,3 g/l x $2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 11,86 g/l x $2\text{H}_2\text{O}$, pH 4,8-5,0

Disolución de tinción: 100 μl de disolución de OPD/10 ml de tampón de tinción 5 μl de H_2O_2 /10 ml de tampón de tinción

Disolución madre de OPD: PP: L0017

5 Método

El método de ELISA usado detecta EPO en intervalos de concentración de ng/ml, en particular con un límite de detección en el intervalo de aproximadamente 10 ng/ml, partiendo de 500 ng/ml y ocho diluciones de dos veces. Un anticuerpo monoclonal contra los primeros 26 aminoácidos de EPO funciona como capa de recubrimiento, uniéndose a EPO. En la siguiente etapa, el anticuerpo de atrapamiento se une a EPO específicamente. La detección se realiza a través de un antisuero de conejo que reconoce EPO biotinilada. La visualización se realiza tiñendo con OPD tras el acoplamiento de estreptavidina-peroxidasa a la placa.

Inmunofluorescencia

Se inoculan células CHO que expresan EPO con 5×10^4 células/200 μl sobre un cubreobjetos en una placa de 6 pocillos y se incuban durante 24-72 horas. Se lavan las células adherentes dos veces con PBS y se fijan durante 5 minutos con metanol a -20°C , luego se secan al aire y después de eso se empapan de nuevo en PBS. Se saturan las proteínas no específicas mediante incubación con FCS al 20% en PBS durante 15 minutos y luego se incuban con anticuerpo anti-EPO durante una hora. Se visualiza la reacción con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Se detecta la fluorescencia mediante microscopía confocal a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de más de 515 nm.

20 Determinación del tamaño del núcleo

Materiales

Coulter Counter® modelo ZM (Coulter Electronics Inc.)

Coulter Channelizer® modelo 256

Disolución de incubación: Ácido cítrico, 0,1 M, Triton X 100, al 2%

25 Electrolyte Isoton II (n.º de cat. 844 8011; Coulter Euro Diagnostic GmbH)

El instrumento Coulter Counter cuantifica las partículas en tamaño y número, que se suspenden en un fluido conductor eléctrico. El fluido se absorbe mediante vacío a través de un capilar que porta electrodos en ambos lados. El cambio de la resistencia induce un impulso de voltaje que puede digitalizarse mediante el instrumento Coulter Channelizer. El tamaño del núcleo se correlaciona con el contenido en ADN de las células, de modo que es posible distinguir entre un conjunto diploide y poliploide de cromosomas.

Método

Se lavan aproximadamente 1×10^6 células CHO una vez en PBS, se resuspenden en 2 ml de disolución de incubación y se dejan en la misma durante 4-5 horas. Las siguientes etapas son específicas para el instrumento

Coulter Counter.

Electroforesis en SDS-poliacrilamida e inmunotransferencia de tipo Western

Materiales

Geles de SDS:	Tris-glicina de Novex al 4-20%
Tampón de muestra:	Tris glicina SDS 2x (Novex LC 2676)
Tampón de ejecución:	Tris glicina SDS (Novex LC 2675)
Tampón de inmunotransferencia:	Na ₂ B ₄ O ₇ ·x10H ₂ O, 50 mM, SDS, al 0,1%, metanol, al 20%
Matriz de inmunotransferencia:	PVDF Immobilon P 0,45 μM de Millipore; K8JM8238H
Tampón de lavado:	véase el tampón de lavado de ELISA
Tampón de dilución:	leche en polvo al 1% en tampón de lavado
Tampón de detección:	NaCl, 0,1 M Tris-HCl 0,1 M pH 9,5

5 Método

Se ajustan las muestras que contienen EPO a 30 ng/20 μl en 1x tampón de muestra con α-MTG al 1% y se aplican al gel de SDS. Al final de la ejecución, se transfieren las proteínas a una membrana PVDF Immobilon durante dos horas y entonces se tiñe la EPO específicamente con un anticuerpo monoclonal que detecta los primeros 26 aminoácidos de EPO. Se realiza la visualización con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y tinción con NBT/BCIP.

Isoelectroenfoque

Materiales

Sistema:	Multiphor II, Amersham Biosciences
Geles de IPG:	pH 2,5 -7
Tampón de rehinchamiento:	9 g de urea, 0,5 g de CHAPS, 0,04 g de DTE, 0,5 ml de Resolytes (pH 3,5-10), 10 μl de azul de bromofenol (0,1%), ajustado a 25 ml con H ₂ O
Tampón de muestra:	Tampón de muestra de IPG pH 3-10, 25 μl en 625 μl de H ₂ O
Tampón de inmunotransferencia:	2,93 g de glicina, 5,81 g de Tris, 20 ml de metanol, 0,375 g de SDS ajustado a 1000 ml con H ₂ O
Matriz de inmunotransferencia:	PVDF Immobilon P 0,45 mM de Millipore; K8JM8238H
Tampón de lavado:	véase el tampón de lavado de ELISA
Tampón de dilución:	leche en polvo al 1% en tampón de lavado
Tampón de detección:	NaCl, 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M pH 9,5

15 Método

Se ajustan las muestras que contienen EPO a 500-1000 ng/50 μl, se desalan, se diluyen 1:1 en tampón de muestra y se aplican al gel de IPG rehinchado. Las condiciones de ejecución son primero un minuto a 300 V, luego aumento lineal hasta 3500 V y al final 1 hora a 3500 V. Durante el procedimiento de enfoque completo, se fija un límite de 10 mA y 10 W. Después de eso, se transfieren las proteínas a una membrana PVDF Immobilon mediante difusión

durante la noche o mediante electrotransferencia y luego se tiñe la EPO específicamente con un anticuerpo monoclonal que detecta los primeros 26 aminoácidos de EPO. La visualización se realiza con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con AP y tinción con NBT/BCIP.

Determinación del contenido en ADN

- 5 Se compara el contenido en ADN de líneas celulares recombinantes con la línea de células huésped CHO-dhfr mediante análisis de FACS.

Materiales

Tampón de lavado: Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, MgCl₂ 2 mM, Triton X100 al 0,1%

Tampón de tinción: DAPI 0,3 µg/ml (Hoechst) en tampón de lavado

Método

- 10 Se lavan 5x10⁵ células en PBS y se fijan con etanol al 70% enfriado con hielo. Después de eso se lavan las células dos veces con tampón de lavado y entonces se incuban en tampón de tinción durante 30 minutos a TA. Se mide el contenido en ADN con el instrumento FACS Vantage (Becton and Dickinson) a 359 nm de excitación y 450 nm de emisión.

15 Prueba de especificidad *in vitro*

- El crecimiento de la línea celular eritroleucémica humana TF-1 (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) depende de IL3 o GM-CSFh. Estas citocinas desempeñan efectos sinérgicos sobre la proliferación, mientras que EPO puede mantener la viabilidad durante algún tiempo. Las células se hacen crecer de manera rutinaria en medio de cultivo que contiene GM-CSF y EPO.

Complementos de prueba

Medio de cultivo: RPMI 1640, complementado con Gln 4 mM, FCS al 10%, transferrina 20 µg/ml, betamercaptoetanol 10 µM, GM-CSFhr 12 ng/ml, 3 U/ml de EPOhr,

Medio de prueba: RPMI 1640, complementado con Gln 4 mM, transferrina 100 µg/ml, BSA 2 mg/ml

25 Métodos

- La prueba de funcionalidad se realiza como una prueba de viabilidad a MTT en placas de 96 pocillos (Hammerling *et al.*, 1996, J Pharm Biomed Anal 14(11):1455-69). Se diluyen las muestras 1:2 ocho veces, partiendo de 100 ng de EPO por ml en medio de prueba. Se transfieren 50 µl de cada dilución de muestra, dilución patrón o blanco a la placa de prueba de 96 pocillos. Se lavan células TF-1 tres veces con PBS frío y se adaptan a 2x10⁵ células por ml en medio de prueba. Se recubre cada pocillo de la placa de prueba de 96 pocillos con 50 µl de la suspensión celular y se dejan esas células durante 72 horas en el incubador de CO₂. Después de eso, se añaden 10 µl de disolución de MTT (6 mg/ml en PBS) y se incuba a 37°C durante 4 horas. Se disuelve el colorante con 100 µl de SDS/HCl (SDS al 10% en HCl 0,1 M) durante otras 4 horas en la oscuridad y se determina fotométricamente la viabilidad dependiente de EPO a 550/690 nm.

Ejemplo 1 - Construcción del plásmido EPO/neo

1. Construcción de p2-neo

1.1 Preparación del fragmento de vector a partir de pSV2neo que contiene el promotor temprano de SV40

- 40 La base de la construcción del vector es la estructura principal del plásmido pBR322 contenida en pSV2neo. El fragmento de restricción de *EcoRI* - *PvuII* más pequeño incluye esta estructura principal de pBR322 y el fragmento de *PvuII* - *HindIII* vecino de SV40 lleva el fragmento relevante del promotor temprano de SV40.

Se corta el plásmido pSV2neo (ATCC 37149) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los dos fragmentos resultantes tienen unos tamaños de 3092 pb y 2637 pb. El fragmento de 2637 pb consiste en un fragmento de restricción de *EcoRI* - *PvuII* que incluye una estructura principal de pBR322 y un fragmento de *PvuII* - *HindIII* vecino

ES 2 525 945 T3

que contiene un fragmento del promotor temprano de SV40. Las 2637 pb se preparan y purifican por medio de electroforesis en gel.

1.2 Preparación del gen de resistencia a neomicina

5 Se toma el gen neo del transposón Tn5 de pSV2neo. Se amplifica como fragmento que contiene únicamente la región codificante del gen. Como parte de la estrategia de clonación, se introducen sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción en ambos extremos. Se construye un sitio *HindIII* en el cebador de amplificación en el sentido de 5', un sitio *EcoRI* y *SpeI* en el cebador en el sentido de 3'. La región amplificada corresponde a los nucleótidos 2846 a 1938 en la secuencia de pSV2neo (n.º de registro de Genbank U02434). Los oligonucleótidos están diseñados tal como sigue:

10 *Oligo 2004-01*: longitud: 38 meros

5'- ggg gga agc ttg ttg gga agc cct gca aag taa act gg -3' SEQ ID No. 1

5' *HindIII*: aagctt - g (= pos. 2846 en pSV2neo) ttgggaagccctg..... SEQ ID No. 2

Oligo 2004-02: longitud: 42 meros

5'- ggg gaa ttc act agt gag tcc cgc tca gaa gaa ctc gtc aag -3' SEQ ID No. 3

15 5' *EcoRI/SpeI*:

gaa ttc actagt - g (= pos. 1938 en pSV2neo) agtcccgcctcagaa..... SEQ ID No. 4

20 El producto de amplificación de los cebadores 2004-01 y 2004-02 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics). Los parámetros para el procedimiento son: 20 ng de pSV2neo, 10 pmol de cada cebador, dNTP 10 mmol, 2,5 U de *Pwo* polimerasa en el tampón suministrado hasta un volumen total de 50 µl; perfil de temperatura: 5 min a 95°C, 35 veces (30 s a 95°C, 20 s a 65°C, 90 s a 72°C), 3 min a 72°C, enfriamiento a 4°C hasta su uso adicional.

El fragmento de ADN resultante de 935 pb se purifica mediante columnas de aislamiento de ADN (Mini, Wizard Promega GmbH), se digiere con *EcoRI* y *HindIII*, y se purifica por medio de un gel de agarosa y se eluye usando columnas Spin (Supelco).

25 1.3 Construcción de p1-neo

Se liga el fragmento de gen neo de *EcoRI-HindIII* amplificado en el fragmento de vector de *EcoRI-HindIII* de pSV2-neo usando Ligation Express (Clontech) y se transforma en un huésped de *E. coli* (*E. coli* SURE (Stratagene)). Se seleccionan transformantes mediante crecimiento en medio LB complementado con ampicilina 50 mg/l.

30 Se aísla ADN de plásmido a partir de clones y se comprueba mediante análisis de restricción usando *EcoRI* más *NcoI* (3 fragmentos de 2527 pb, 780 pb y 251 pb, respectivamente). Se comprueban adicionalmente ADN de plásmido que muestran los fragmentos esperados mediante secuenciación de partes relevantes de los constructos. Un ADN de plásmido que contiene un gen de resistencia a neomicina y un promotor temprano de SV40 verificado se designa como p1-neo.

1.4 Preparación de la región de terminación de SV40 SV40LTpoliA/IVS

35 Se diseñan cebadores de PCR para amplificar un fragmento (nucleótidos 751 a 1598) de la región de terminación de SV40 presente en pSV2neo. El cebador en el sentido de 5' también contiene un sitio de restricción para *SpeI*. Además del sitio *BamHI* ya incluido en la posición 751 de pSV2-neo, se introduce un sitio *EcoRI* en el cebador en el sentido de 3' separado por una región espaciadora de 6 nucleótidos de *BamHI*. Las secuencias de los dos cebadores son tal como sigue:

40 *Oligo 2004_05*: longitud: 40 meros

5'- ggg gac tag ttt gtg aag gaa cct tac ttc tgt ggt gtg a -3' SEQ ID No. 5

5' *SpeI*: actag - t (= pos. 1598 en pSV2neo) ttgtgaagga..... SEQ ID No. 6

Oligo 2004-06: longitud: 46 meros

ES 2 525 945 T3

5'- ggg gga att cgg agg ggg atc cag aca tga taa gat aca ttg atg a -3' SEQ ID No. 7

5' *EcoRI/BamHI*: gaattc - g (= pos. 751 en pSV2neo) gatcc agacatgataag.....SEQ ID No. 8

5 El producto de amplificación de los cebadores 2004-05 + 2004-06 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics) tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 873 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN, se digiere con *EcoRI* y *SpeI* y se purifica en gel.

1.5 Preparación de p2-neo

Se digiere ADN de plásmido p1-neo usando *EcoRI* + *SpeI*. Se purifica el fragmento linealizado resultante, se liga con el fragmento amplificado que contiene SV40LTpoliA/IVS y se transforma en un huésped de *E. coli*. Se seleccionan transformantes mediante crecimiento sobre medio LB complementado con ampicilina 50 mg/l.

10 Se aísla ADN de plásmido de clones y se comprueba mediante análisis de restricción usando *EcoRI* (1 fragmento de 4411 pb) y *NcoI* (2 fragmentos de tamaño de 3631 pb y 780 pb) y *SphI* (3 fragmentos de tamaño de 3499 pb, 840 pb y 72 pb). Se comprueban adicionalmente los ADN de plásmido que muestran los fragmentos esperados mediante secuenciación de partes relevantes de los constructos. Un ADN de plásmido que contiene un SV40LTpoliA/IVS verificado se designa como p2-neo.

15 2. Construcción del plásmido p3

2.1 Preparación del fragmento de promotor temprano de SV40

20 Se usa el plásmido pSV2neo como fuente para el fragmento de promotor temprano de SV40. El tamaño del fragmento es casi idéntico al usado en la construcción de los plásmidos p2. Sin embargo, los extremos del fragmento se modifican para introducir sitios de reconocimiento para *BamHI* y *NotI*. Los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar el promotor están diseñados tal como sigue:

Oligo 2004-07: Longitud: 38 meros

5'- ggg ggg atc ctg tgg aat gtg tgt cag tta ggg tgt gg -3' SEQ ID No. 9

5' *BamHI*: gaattc - t (= pos. 3435 en pSV2neo) gtggaat..... SEQ ID No. 10

Oligo 2004-08: Longitud: 46 meros

25 5'- ggg ggc ggc cgc agc ttt ttg caa aag cct agg cct cca aaa aag c -3' SEQ ID No. 11

5' *NotI*: gctgttgcgcaag - a (= pos. 3093 en pSV2neo) gctttttgcaaaag..... SEQ ID No. 12

El producto de amplificación de los cebadores 2004-07 + 2004-08 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 365 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN, se digiere con *BamHI* y *NotI*, y se purifica en gel.

30 2.2 Preparación de la parte de vector pBluescript

Se somete a restricción secuencialmente ADN de pBluescript II SK+ usando *BamHI* y *NotI*, respectivamente. Se desfosforila el ADN usando fosfatasa alcalina. Se purifica el fragmento de *BamHI/NotI* a partir del fragmento pequeño mediante electroforesis en gel de agarosa antes del ligamiento.

2.3 Preparación y verificación del plásmido p3

35 Se liga el fragmento de *BamHI-NotI* amplificado que contiene el promotor temprano de SV40 en el vector pBluescript II SK+ preparado usando ADN ligasa de T4 (Promega GmbH). Se aísla ADN de plásmido de transformantes de *E. coli* SURE (Stratagene) y se purifica a partir de colonias en medio LB complementado con ampicilina 100 mg/l.

Se comprueban los ADN resultantes mediante análisis de restricción usando *EcoRI* más *NcoI* (2 fragmentos de tamaño de 3039 pb y 253 pb).

40 Se comprueban adicionalmente dos ADN de plásmido que muestran los fragmentos esperados mediante secuenciación. Se secuencian ambas hebras del promotor temprano de SV40 de modo que pueda verificarse cada

posición. El plásmido se designa como p3.

3. Aislamiento de ADNc de EPO humana

3.1 Aislamiento de ARN total con reactivo TRIzol®

- 5 El reactivo TRIzol®, usado para el aislamiento de ARN de EPO de tejidos de riñón humano (obtenidos del hospital Lainzer Krankenhaus) es una disolución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante la lisis celular el isotiocianato de guanidina forma un complejo soluble en agua con ARN al mismo tiempo que se rompen las células. La adición de cloroformo, seguida por centrifugación, separa la disolución en una fase acuosa, que contiene ARN y una fase orgánica. Tras la separación de la fase acuosa el ARN se precipita con alcohol isopropílico, se lava con etanol, se seca al aire y se resuspende en agua libre de ARNasa.
- 10 Se cortan fragmentos de tejido de riñón humano en pequeños trozos, se fuerzan a través de un tamiz de células de 100 µm, se centrifugan (179xg/10 min) y se lava el sedimento resultante tres veces con PBS. Entonces se resuspende el sedimento en PBS, se toma una alícuota en tubos estériles, se congela hasta -196°C y se almacena a -80°C hasta su uso adicional.
- 15 Se lisa el tejido congelado mediante la adición de 1 ml de reactivo TRIzol®, se homogeneiza y se incuba a 15-30°C durante 5 minutos para garantizar una disociación completa. Tras la adición de 200 µl de cloroformo, la agitación del tubo y la incubación durante 2-3 minutos a 15-30°C, se centrifuga el tubo a 12000xg durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se transfiere cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo mezclada con 500 µl de alcohol isopropílico y se incuba a 15-30°C durante 10 min. Se centrifuga el ARN precipitado (12000xg, 10 min), se lava el sedimento con etanol, se centrifuga de nuevo, se seca al aire y se disuelve en agua DEPC libre de ARNasa.
- 20 Se mide fotométricamente el contenido en ARN total a 260 nm.

$$1 \text{ DO}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ µg de ARN/ml}$$

Evaluando la razón de $\text{DO}_{260 \text{ nm}}$ y $\text{DO}_{280 \text{ nm}}$ (absorbancia máxima de proteínas) puede estimarse la pureza del aislamiento de ARN. Debe oscilar entre 1,6 y 1,8.

3.2 Aislamiento de ARNm con Dynabeads Oligo (dT)25

- 25 El kit directo de ARNm Dynabeads Oligo (dT)₂₅ emplea la hibridación del ARN de cola de poliadenosina de ARNm eucariota con partículas de poliestireno supermagnéticas que contienen cadenas de 25 nucleótidos de largo de desoxitimidilato unido covalentemente a su superficie. El ARNm unido a las perlas magnéticas puede separarse usando un concentrador de partículas magnéticas Dynal (Dynal MPC®).

Tampón de lavado	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; LiCl 0,15 mM; EDTA 1 mM
2 x tampón de unión	Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; LiCl 1 mM; EDTA 2 mM

- 30 Para 10 µg de ARN total, se separan 100 µl de Dynabeads oligo (dT)₂₅ en el instrumento Dynal MPC® y se lavan dos veces con 2x tampón de lavado. Mientras tanto se ajusta el ARN total a un volumen de 200 µl con 1 x tampón de lavado y se desnaturaliza mediante incubación a 65°C durante 4 minutos. Entonces se mezcla el ARN con las perlas, se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos y se separan en el instrumento Dynal MPC®. Se lavan las perlas dos veces con 1x tampón de lavado. Se eluye el ARN poliadenilado de Dynalbeads Oligo (dT)₂₅ mediante incubación con tampón de elución (2 x 10 µl) durante 4 minutos a 65°C. Se separan Dynabeads en el instrumento Dynal MPC® y se transfiere inmediatamente el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga libre de ARNasa. Se usa el eluato directamente para la transcripción inversa.

3.3 Transcripción inversa

- 40 El cebador específico para EPO se desnaturaliza mediante incubación de 4 min a 80°C y el ARNm se desnaturaliza mediante incubación de 5 min a 65°C. Se añaden los siguientes componentes a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril sobre hielo:

Reactivo	Concentración final
ARNm	10 µl

(continuación)

Reactivo	Concentración final
MMLV (200 U/ml)	0,25 µl
Tampón de PCR de Boehringer (10 x)	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
EPO directo (100 pmol/µl)	1 µl
DTT (0,1 M)	0,25 µl
Inhibidor de ARNasa (40 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	3,25 µl

5

Incubación: 60 min 37°C
Inactivación: 5 min 100°C

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa

10

Se añaden los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril a 4°C. Las condiciones de PCR se enumeran a continuación.

Reactivo	EPO
Molde	ADNc de Epo, 5 µl
Polimerasa	Vent 1 U (0,5 µl)
Tampón de polimerasa (10x)	Tampón Vent 1 x (10 µl)
dNTP (10 mM)	200 µM (2 µl)
MgCl ₂ (50 mM)	/
Cebador directo (10 pM)	30 pM (3 µl)
Cebador inverso (10 pM)	30 pM (3 µl)
DMSO	/
H ₂ O	76,5 µl

Ciclo de PCR

1 Desnaturalización	95°C	2 min
2 Desnaturalización	94°C	45 s
3 Apareamiento del cebador	58°C	30 s

ES 2 525 945 T3

(continuación)

Ciclo de PCR		
4 Extensión	72°C	1 min
5 Finalización de la extensión	72°C	10 min
6 Ciclos	30	

Se analizan los productos de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

5 3.5 Electroforesis en gel de agarosa

Tampón 6 x BX	Azul de bromofenol al 0,25 %; xilenocianol al 0,25%, glicerol al 30%
Tampón TAE	Base de Tris, 242 g; ácido acético glacial, 57,1 ml; EDTA (0,5 M, pH 8,0), 100 ml; ajustado a 1000 ml de H ₂ O
Marcador Lambda III	10 µg de bacteriófago Lambda-de tipo natural-Dann (2,5 µl de Hind III + 2,5 µl de Eco R I + 20 µl de tampón R (Fermentas) relleno con H ₂ O hasta 200 µl; digerido 1 h a 37°C, inactivado 20 min a 65°C; complementado con 40 µl de tampón de carga BX)

10 Se funden 1 g de agarosa y 99 g de tampón 1xTAE en el horno microondas, se enfrían hasta aproximadamente 60°C y se complementan con 3 µl de disolución madre de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se ejecutan los geles en tampón 1xTAE a 100-300 V durante aproximadamente 30 min, dependiendo de la longitud de los fragmentos de ADN que van a separarse. Cada carril contiene 10 µl de muestra mezclados con 2 µl tampón 6 x BX. La identificación de los fragmentos de ADN se basa en la comparación con un patrón de peso molecular de digesto de Lamba/Hind III.

15 3.6 Preparación de productos de PCR y vectores para ligamiento

3.6.1 Restricción de ADN de vector e inserto para la clonación de extremos cohesivos

20 Se mezclan 10 u de enzima de restricción y tampones de restricción apropiados con 1 µg de ADN de vector e inserto según las instrucciones del fabricante. Se incuba la mezcla a 37°C (30°C para SmaI) entre 30 y 60 min, dependiendo de las enzimas usadas, el vector y el inserto. Entonces se inactiva la enzima calentando hasta 65°C durante 10 min y se analiza la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.6.2 Ligamiento

Vector pIRESneoSV40

25 El vector pIRESneo (Clontech laboratories) contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (VECM), que permite la traducción de dos marcos de lectura abiertos a partir de un ARN mensajero. El casete de expresión de pIRESneo contiene promotor/potenciador temprano inmediato principal de citomegalovirus (CMV) humano seguido por un sitio de clonación múltiple (MCS), el IRES de VECM seguido por el gen de neomicina fosfotransferasa y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. En este vector el promotor de CMV se reemplaza por el promotor temprano de SV40.

30 El vector y el producto de PCR se ligan con ADN ligasa de T4. Para lograr un ligamiento óptimo, se usan aproximadamente 20 ng de vector y 200 ng de inserto (dependiendo de la longitud) en una razón molar de aproximadamente 1:10 y se mezclan con los siguientes reactivos en un volumen total de 10 µl de H₂O. Se realiza la incubación durante la noche a 15°C y 3 h a TA. Entonces se inactiva por calor la ligasa mediante incubación a 65°C durante 10 minutos.

Reactivo	Cantidad final
Vector (pIRESneoSV40)	~ 20 ng

(continuación)

Reactivo	Cantidad final
Inserto (EPO)	~ 200 ng
ADN ligasa de T4	1U (1 µl)
Tampón (5x)	1x (2 µl)
H ₂ O	hasta 10 µl

3.6.3 Bacterias y medios de cultivo

JM109	(Promega, EE.UU.)
Medio LB	peptona de caseína, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g, ajustado a 1000 ml con H ₂ O y fijado a pH 7,0 con NaOH 5 M
Agar LB	15 g de agar en 1000 ml de medio LB
LB-Amp	100 µl de ampicilina (100 mg/ml) en 1000 ml de medio LB
Medio SOC	Bacto-triptona, 20 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl 10 mM; KCl 3 mM; MgCl ₂ 10 mM; glucosa 20 mM, MgSO ₄ 10 mM

5 3.6.4 Transformación usando CaCl₂Preparación de bacterias competentes (JM109)

Se inoculan 10 ml de medio LB con *E. coli* (JM109) y se hace crecer durante la noche a 37°C. Se diluyen 4 ml de cultivo bacteriano 1:100 en medio LB y se hace crecer hasta que alcanza DO_{260 nm} de 0,8. Se centrifugan las bacterias a 4500 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspende el sedimento celular en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M (4°C)/50 ml de suspensión bacteriana usada. Se centrifugan las células, se resuspende el sedimento en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y se toma una alícuota hasta un volumen total de 100 µl, se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80°C.

Transformación

En tubos de cultivo de polipropileno de 17x100 mm enfriados previamente se añaden 5-10 ng de ADN de plásmido a bacterias competentes JM109, se mezclan suavemente y se ponen sobre hielo durante 30 min. Entonces se someten las células a choque térmico durante 45 segundos en un baño de agua a exactamente 42°C sin agitación y se colocan inmediatamente sobre hielo durante 2 minutos. Entonces se añaden 900 µl de medio SOC al tubo y se incuba durante 30 min a 37°C antes de sembrar en placa 100 µl de suspensión de bacterias sobre placas de LB-Amp.

20 3.6.5 Examen y establecimiento de cultivos en glicerina

Se examinan colonias resistentes a ampicilina para detectar el fragmento de ADN insertado mediante la técnica de PCR. Se mezclan porciones de colonias resistentes a ampicilina con la mezcla de reacción de PCR y con cebadores específicos contra el fragmento de ADN clonado (véase a continuación). Las colonias positivas muestran bandas de ADN amplificado por PCR en electroforesis en gel de agarosa. Entonces se propagan estas colonias en medio LB-Amp para su análisis adicional y la purificación de plásmidos. Para su uso y almacenamiento adicionales, se mezcla 1 ml de cultivo bacteriano deseado con 500 µl de glicerina (87%) y se almacena a -80°C.

3.6.6 Sistema de purificación de ADN Wizard® Plus SV Minipreps

ES 2 525 945 T3

Disolución de resuspensión celular	Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml
Disolución de lisis celular	NaOH 0,2 M, SDS al 1%
Disolución de neutralización	Clorhidrato de guanidina 4,09 M, acetato de potasio 0,759 M; ácido acético glacial 2,12 M, pH 4,2
Disolución de lavado de la columna	acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; etanol al 60%

5 Se inoculan 2-3 ml de medio LB-Amp con una única colonia y se incuba a 37°C durante la noche. Se centrifuga la disolución (12000xg, 5 min) y se resuspende concienzudamente el sedimento resultante en 250 µl de disolución de resuspensión y luego 250 µl de disolución de lisis celular, se mezcla invirtiendo los tubos 4 veces y se incuba a TA durante 1-5 min. Después de eso se añaden 10 µl de disolución de proteasa alcalina (incubada a TA durante 5 min) y se añaden 350 µl de disolución de neutralización. Se mezcla el tubo inmediatamente invirtiéndolo 4 veces y se centrifuga el lisado bacteriano a 12000xg durante 10 min a TA. Se transfiere el lisado con aristas a columnas Spin y se centrifuga (12000xg, 5 min) y se lava la columna dos veces con disolución de lavado (750 µl/250 µl). Se eluye el ADN con 100 µl de agua libre de nucleasa.

10 3.6.7 Secuenciación de plásmidos

Se secuencian las secuencias insertadas mediante IBL (Gerasdorf, Austria) y mediante GenXpress (Maria Wörth, Austria) con cebadores específicos. Se enumeran a continuación cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de EPO y el promotor temprano de SV40 y para el análisis de secuencias.

Cebador oligonucleotídico	Secuencia	
<i>Promotor temprano de SV40</i>		
SV40 temprano Clal directo	5'-aga tcg atc aag ctt ttt gca aaa gcc tag-3	SEQ ID No. 13
SV40 temprano Nrul inverso	5'-agt cgc gag cgc agc acc atg gcc tg-3'	SEQ ID No. 14
SV40 temprano 281 inverso	5'-gcc cag ttc cgc cca ttc-3'	SEQ ID No. 15
<i>EPO</i>		
Epo BamHI directo	5'-tag gat cct cat ctg tcc cct gtc ctg c-3'	SEQ ID No. 16
Epo EcoRI inverso	5'-tag aat tcc gcc atg ggg gtg cac gaa tgt cc-3'	SEQ ID No. 17
Epo 221 directo	5'-taa ctt tgg tgt ctg gga-3'	SEQ ID No. 18
Epo 204 inverso	5'-tcc cag aca cca aag tt-3'	SEQ ID No. 19
<i>pIRESneo</i>		
pIRESneo 181 inverso	5'-tta ggg tta ggc gtt ttg cg-3'	SEQ ID No. 20
piRESneo 1016 directo	5'-act cac ccc aac agc cg-3'	SEQ ID No. 21
pIRESneo 2786 directo	5'-ggcc aaa caa cag atg gct-3'	SEQ ID No. 22
pIRES-200 inverso	5'-tgg aaa gag tca aat ggc-3'	SEQ ID No. 23

15 4. Construcción del plásmido p5

4.1 Preparación del fragmento génico de EPO

ES 2 525 945 T3

Se amplifica el gen estructural para EPO (eritropoyetina humana) mediante PCR usando pSVGPIRNEO como ADN molde. La secuencia de EPO se facilita en el N.º de registro de GenBank M 11319.1. Se introducen sitios de reconocimiento para *NotI* y *KspI* en el cebador en el sentido de 5' y en el sentido de 3', respectivamente. Los cebadores están diseñados tal como sigue:

5 *Oligo 2004-09*: Longitud: 45 meros

5'- ggg ggc ggc cgc atg ggg gtg cac gaa tgt cct gcc tgg ctg tgg -3' SEQ ID No. 24

5' *NotI*: acaaccgc a(= pos. 665 en PSVGPIRNEO) tgggggtg..... SEQ ID No. 25

Oligo 2004-10: Longitud: 44 meros

5'- ggg gcc gcg gtc atc tgt ccc ctg tcc tgc agg cct ccc ctg tg -3' SEQ ID No. 26

10 5' *KspI*: ccgcgg - t (= pos. 1246 en PSVGPIRNEO) catctgtccct..... SEQ ID No. 27

El producto de amplificación de los cebadores 2004-09 + 2004-10 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 604 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN, se digiere con *KspI* y *NotI*, y se purifica en gel. El fragmento de *KspI/NotI* de 592 pb resultante se usa en el ligamiento triple descrito a continuación.

15 4.2 Preparación de la región de terminación SV40LTpoliA/IVS

Se vuelve a clonar la región de terminación de SV40LTpoliA/IVS a partir de pSV2neo mediante PCR de una manera similar a la descrita anteriormente en la sección 1.4 para la construcción de p2-neo excepto porque los cebadores están diseñados con sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción diferentes: se incluye el sitio para *KspI* (=SaclI) en el cebador en el sentido de 5' y los sitios para *SacI* y *EcoRI* en el cebador en el sentido de 3'.

20 *Oligo 2004-11*: longitud: 42 meros

5'- ggg gcc gcg gtt tgt gaa gga acc tta ctt ctg tgg tgt gac -3' SEQ ID No. 28

5' *KspI*: ccgcgg - t (= pos. 1598 en pSV2neo) ttgtgaaggaa..... SEQ ID No. 29

Oligo 2004-12: longitud: 46 meros

5'- ggg gga gct cga att cga tcc aga cat gat aag ata cat tga g - 3' SEQ ID No. 30

25 5' *SacI/EcoRI*: gagctc gaattc - g (= pos. 752 en pSV2neo) atccagacatg.....SEQ ID No. 31

El producto de amplificación de los cebadores 2004-11 + 2004-12 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 873 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN y se digiere con *KspI* y *SacI*. Entonces el fragmento de ADN resultante de 858 pb se purifica en gel.

30 4.3 Preparación de la parte de vector p3

Se digiere secuencialmente ADN de plásmido p3 usando *NotI* y *Sad*, respectivamente. Se trata el ADN con fosfatasa alcalina y el fragmento de vector se purifica en gel.

4.4 Ligamiento triple y aislamiento de plásmido p5

35 Se ligan la parte de vector *NotI/SacI* del plásmido p3, el gen de EPO *KspI/NotI* y la región de terminación de *KspI/SacI* SV40LTpoliA/IVS en una reacción de ligamiento (Ligation Express, Clontech). Se seleccionan transformantes en medio LB complementado con ampicilina 100 mg/l.

40 Se examinan transformantes positivos que contienen ambos fragmentos insertados mediante hibridación de colonias usando ambos fragmentos amplificados 2004-09/2004-10 y 2004-11/2004-12, como sondas marcadas. Se eligen diez clones que dieron una señal de hibridación positiva con ambas sondas para una preparación de plásmidos a escala "midi" (Qiagen).

ES 2 525 945 T3

5 Se realiza análisis de restricción usando las enzimas *Bam*HI (1 fragmento de 4723 pb), *Eco*RI (2 fragmentos, 2913, 1810 pb) y *Pvu*II (4 fragmentos de 2513, 1204, 903, 103 pb). Se seleccionan dos clones que muestran los fragmentos de restricción correctos y se comprueban mediante secuenciación. Se secuencia el casete completo clonado en pBluescript II SK+ y se compara con la secuencia de nucleótidos esperada. Podía verificarse satisfactoriamente cada nucleótido individual. Se designan los plásmidos p5.

5. Construcción de pEpo/neo

5.1 Construcción de pEpo/neo 12-1

Se digiere ADN de plásmido p5 con *Bam*HI y *Eco*RI y se purifica en gel el fragmento de 1792 pb resultante que representa el casete de promotor de SV40-gen de EPO-terminador de SV40.

10 También se digiere el plásmido p2-neo con *Bam*HI y *Eco*RI y se purifica en gel el vector linealizado. Adicionalmente se desfosforila el ADN usando fosfatasa alcalina y se purifica con eliminadores de enzimas Micropure de Amicon.

15 Ambos fragmentos, el vector p2-neo de 4411 pb y el casete de 1792 pb de p5, se ligan (Ligation Express, Clontech) y se transforman en *E. coli* SURE. Se aísla ADN de plásmido de diversos transformantes hechos crecer en medio LB complementado con ampicilina 70 mg/l y se analiza mediante digestión usando las endonucleasas de restricción *Pvu*II, *Eco*RI y *Nco*I.

Se selecciona un clon que muestra los fragmentos esperados (*Eco*RI: 6191 pb, *Nco*I: 4085, 1326 y 780 pb, *Pvu*II: 3273, 2130, 685 y 103 pb) y se designa como pEpo/neo-12.

20 Para la purificación adicional se vuelve a transformar el ADN en *E. coli* SURE (véase anteriormente) y se prepara ADN de plásmido usando un procedimiento "Midi-prep" (Qiagen) a partir de un cultivo inoculado mediante una única colonia (pEpo/neo-12-1). Se realiza análisis de restricción usando las siguientes enzimas: *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Pudieron encontrarse los fragmentos y tamaños esperados, verificando el clon como un clon pEpo/neo correcto.

5.2 Construcción final de pEpo/neo

25 La región en el sentido de 5' del gen de EPO en pEpo/neo-12-1 se cambia en la posición menos-3 con respecto al ATG de iniciación. Se introduce un nucleótido A adicional para dar como resultado la base de purina G en la posición -3 con respecto al ATG de iniciación. Una purina en esa posición puede mejorar el nivel de expresión del gen. Para ese fin, se vuelve a amplificar el gen de EPO usando un cebador en el sentido de 5' adaptado 2004-09-a:

Oligo 2004-09-a: longitud: 46 meros

5'- gggggcggccgcaatgggggtgcacgaatgtcctgctgctggctgtgg -3' SEQ ID No. 32

30 El producto de amplificación de los cebadores 2004-09a + 2004-10 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 605 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN y se digiere usando *Ksp*I y *Not*I. Entonces el fragmento de ADN resultante de 593 pb se purifica en gel.

35 Se digiere ADN de plásmido pEpo/neo-12-1 con *Ksp*I y *Not*I, respectivamente, para eliminar el gen de EPO. Entonces se purifica en gel el fragmento de 5599 pb. Se ligan entre sí ambos ADN preparados (Ligation Express, Clontech). Se aísla ADN de plásmido de transformantes y se purifica a partir de colonias en medio LB complementado con ampicilina 70 mg/l. Se analizan los ADN mediante restricción usando *Nco*I en un primer examen.

40 Se selecciona un clon positivo para aislar ADN usando un procedimiento "Midi prep" (Qiagen). Se realiza un análisis de restricción extendido usando *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Pudieron encontrarse los fragmentos y tamaños esperados, verificando el clon como un pEpo/neo correcto. También se confirma cada nucleótido individual del casete completo (promotor temprano de SV40-gen de neo-SV40LTpoliA/IVS-promotor temprano de SV40-gen de EPO-SV40LTpoliA/IVS) insertado en la parte de vector pBR322 mediante secuenciación.

45 Ejemplo 2 - Construcción del plásmido EPO/dhfr

1. Construcción de p2-dhfr-CDS

ES 2 525 945 T3

1.1 Preparación del gen de dhfr

El gen de dhfr usando para la construcción del vector se toma de un ADNc de ratón, presente en el plásmido pLTRdhfr26 (ATCC 37295). La secuencia de nucleótidos del ADNc de dhfr de ratón (MUSDHFR) está disponible como n.º de registro de GenBank L26316.

- 5 La dhfr se amplifica a partir de pLTRdhfr26 usando cebadores diseñados para producir un fragmento que contiene la región codificante desde el ATG de iniciación en la posición 56 hasta el codón de terminación TAA en la posición 619. Como para la amplificación del gen de resistencia a neomicina descrita anteriormente, se introducen los sitios *HindIII* y *SpeI* en los cebadores de amplificación en el sentido de 5' y en el sentido de 3', respectivamente. También se introduce un sitio *EcoRI* en el cebador inverso además del sitio *SpeI*. La secuencia de los oligonucleótidos es tal como sigue:

Oligo 2004-13: longitud: 39 meros

5'- ggg gaa act tat ggt tgc acc att gaa ctg cat cgt cgc -3' SEQ ID No. 33

5' *HindIII*: aagctt - A (= pos. 56 en MUSDHFR) TGgttcgaccattg..... SEQ ID No. 34

Oligo 2004-14: longitud: 42 meros

- 15 5'- ggg gaa ttc act agt tag tct ttc ttc tgc tag act tca aac -3' SEQ ID No. 35

5' *EcoRI SpeI*:

gaattc actag - t (= pos. 619 en MUSDHFR) tagtcttctctcgtagactcaaact.... SEQ ID No. 36

- 20 El producto de amplificación de los cebadores 2004-13 + 2004-14 se prepara mediante PCR usando *Pwo* polimerasa (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. El fragmento de ADN resultante de 588 pb se purifica usando columnas de aislamiento de ADN, se digiere con *HindIII* y *EcoRI* y se purifica en gel.

1.2 Preparación de p7-dhfr-CDS

- 25 Se liga el fragmento génico de dhfr de *EcoRI-HindIII* amplificado al fragmento de vector de *EcoRI-HindIII* a partir de pSV2-neo usando Ligation Express (Clontech), y se transforma en un huésped de *E. coli*. Se seleccionan transformantes mediante crecimiento en medio LB complementado con ampicilina 50 mg/l. Se aísla ADN de plásmido de transformantes y se purifica a partir de colonias en medio LB complementado con ampicilina 50 mg/l.

Se aísla ADN de plásmido a partir de clones y se comprueba mediante análisis de restricción usando *EcoRI* más *ScaI* (3 fragmentos de tamaño de 2225 pb, 514 pb y 473 pb).

- 30 Se comprueban adicionalmente ADN de plásmido que muestran los fragmentos esperados mediante secuenciación de partes relevantes de los constructos. Un ADN de plásmido que contiene un gen de dihidrofolato reductasa y un promotor temprano de SV40 verificado se designa como p1-dhfr-CDS. El análisis de las secuencias reveló una desviación dentro del gen de dhfr con respecto a la secuencia publicada en MUSDHFR, específicamente un cambio de T a C en la posición 451 de la secuencia de MUSDHFR. La secuenciación posterior mostró que este cambio también está presente en el plásmido fuente. Sin embargo, el cambio resultante no provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos puesto que CTT y CTC codifican ambos para leucina.

1.3 Preparación de p2-dhfr-CDS

- 40 Se digiere ADN de plásmido p1-dhfr-CDS usando *EcoRI* + *SpeI*. Se purifica el fragmento linealizado resultante y se liga con el fragmento amplificado que contiene SV40LTpoliA/IVS (descrito anteriormente). Tras la transformación y selección, se analizan los plásmidos resultantes mediante análisis de restricción usando *AclI* (3 fragmentos de 2994, 855 y 216 pb). Se seleccionan unos cuantos y se analizan adicionalmente usando *HincII* (2 fragmentos de 3466 pb y 599 pb, respectivamente), *AflIII* (2 fragmentos de 2872 pb y 1193 pb, respectivamente) y *BglI* (2 fragmentos de 2371 pb y 1694 pb, respectivamente).

Se comprueba adicionalmente un ADN de plásmido que muestra todos los fragmentos esperados en los tamaños correctos mediante secuenciación. Se designa un plásmido verificado como p2-dhfr-CDS.

- 45 2. Construcción de pEpo/dhfr

2.1 Preparación de pEpo/dhfr 21

Se digiere ADN de plásmido p5 con *Bam*HI y *Eco*RI y se purifica en gel el fragmento de 1792 pb resultante que representa el casete de promotor de SV40-gen de EPO-terminador de SV40.

5 También se digiere el plásmido p2-dhfr-CDS con *Bam*HI y *Eco*RI y se purifica en gel el vector linealizado y se eluye usando columnas Supelco spin. Adicionalmente se desfosforila el ADN usando fosfatasa alcalina y se purifica con eliminadores de enzimas Micropure de Amicon.

10 Ambos fragmentos, el vector p2-dhfr-CDS de 4053 pb y el casete de 1792 pb de p5, se ligan (Ligation Express, Clontech) y se transforman en *E. coli* SURE. Se hibridan colonias transformantes hechas crecer en medio LB complementado con ampicilina 70 mg/l usando gen de EPO (producto de PCR) como sonda. Se aísla ADN de plásmido de diversos clones positivos y se analiza mediante digestión usando la endonucleasa de restricción *Nco*I.

Se selecciona un clon que muestra los fragmentos esperados (*Nco*I: 4085 pb y 1760 pb) y se designa como pEpo/dhfr-21. Para la purificación adicional, se vuelve a transformar el ADN en *E. coli* SURE (véase anteriormente) y se prepara ADN de plásmido usando un procedimiento "Midi-prep" (Qiagen) a partir de un cultivo inoculado con una única colonia (pEpo/dhfr-21-1).

15 Se realiza análisis de restricción usando las siguientes enzimas: *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Pudieron encontrarse todos los fragmentos y tamaños esperados, verificando el clon como un pEpo/dhfr-21 correcto.

2.2 La construcción final de pEpo/dhfr

20 Del mismo modo que para pEpo/neo, se cambia la región en el sentido de 5' del gen de EPO en EPO/dhfr-21 en la posición -3 a la que se hace referencia con respecto al ATG de iniciación. Se introduce un nucleótido A adicional para dar como resultado la base de purina G en la posición -3 con respecto al ATG de iniciación. Se reamplifica el gen de EPO tal como se describe en el ejemplo 1, sección 4.2.

Se digiere ADN de plásmido pEpo/dhfr-21 con *Ksp*I y *Not*I, para eliminar el gen de EPO. Entonces se purifica en gel el fragmento de 5259 pb.

25 Se ligan entre sí ambos ADN preparados (Ligation Express, Clontech). Se aísla ADN de plásmido de transformantes y se purifica a partir de colonias en medio LB complementado con ampicilina 70 mg/l. Se analizan los ADN mediante restricción usando *Nco*I en un primer examen.

30 Se selecciona un clon positivo para aislar ADN usando un procedimiento "Midi prep" (Qiagen). Se realiza un análisis de restricción extendido usando *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Nco*I, *Not*I, *Pst*I, *Spe*I, *Sph*I, *Pvu*II, *Nar*I. Pudieron encontrarse los fragmentos y tamaños esperados, verificando el clon como un pEpo/dhfr correcto.

También se confirmó cada nucleótido individual del casete completo (promotor temprano de SV40-**gen de dhfr**-SV40LTpoliA/IVS-promotor temprano de SV40-**gen de EPO**-SV40LTpoliA/IVS) insertado en la parte de vector pBR322 mediante secuenciación.

Ejemplo 3 - Células CHO recombinantes generadas a partir de pEpo/neo y pEpo/dhfr

35 Se siembran $1-5 \times 10^4$ células por cm^2 en botellas de frascos T de 25 cm^2 o placas de 96 pocillos el día antes de que se realice la transfección con lipofectina. Se mezclan los dos plásmidos a la razón de 50:1 = EPO/neo:EPO/dhfr y se permite que se adsorban al reactivo lipofectina (GIBCO/BRL) según el protocolo del fabricante.

40 En resumen, se usaron $0,25 \mu\text{g}$ de ADN/ cm^2 y $1,5 \mu\text{l}$ de reactivo lipofectina/ cm^2 y se ajustó este cóctel de ADN/lípido a $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de capa celular. Entonces se recubren las células con el cóctel de transfección durante cuatro horas en DMEM libre de suero, antes de reemplazarse el medio que contiene ADN por medio de cultivo. Tras el cultivo durante 24 horas en el medio que contiene suero, se cambian a medio de selección. Se cultivan en primer lugar agrupaciones de células transfectadas en medio de selección hasta la confluencia y luego en medio de amplificación (MTX $4,8 \times 10^{-8}$ M) antes del examen de los sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA para determinar la producción de EPO. Se determinan los productores máximos, la concentración de MTX aumentó dos veces y se usan los mejores productores para el cultivo adicional. Se seleccionan 7 agrupaciones de células recombinantes y se realiza la comparación de las propiedades de crecimiento, la productividad de EPO, el patrón de proteínas (mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western), la funcionalidad de la EPO y la estabilidad cromosómica.

Se lleva a cabo la transfección en frascos T25 con $2,5 \mu\text{g}$ de pEpo/neo, $0,05 \mu\text{g}$ de pEpo/dhfr y $15 \mu\text{l}$ de lipofectina

(09/T25/1 y 09/T25/2) por frasco T25 y con 2 µg de pEpo/neo, 0,4 µg de pEpo/dhfr y 15 µl de lipofectina (09/T25/3 y 09/T25/4) por frasco T25.

5 Adicionalmente se transfectan cada una de cinco placas con 10 µg de pEpo/neo, 0,2 µg de pEpo/dhfr y 60 µl de lipofectina por placa (09/96/1 - 09/96/5), cinco placas con 8 µg de pEpo/neo, 1,6 µg de pEpo/dhfr y 60 µl de lipofectina por placa (09/96/6 - 09/96/10). Las placas 11 y 12 se transfectan con 6,25 µg de pEpo/neo, 0,08 µg de pEpo/dhfr y 37,5 µl de lipofectina cada una.

En resumen, se usan 0,25 µg de ADN/cm² y 1,5 µl de reactivo lipofectina/cm² y se ajusta este cóctel de ADN/lípido a 200 µl/cm² de capa celular.

10 La serie de transfecciones se realiza principalmente en placas de microtitulación puesto que diversos experimentos muestran que el número de clones en una unidad de cultivo es como máximo de tres a cinco. Esto significa un aislamiento más fácil de un transfectante monoclonal que el aislamiento de cientos de clones en los frascos T. La tabla 1 describe el número de clones por placa de 96 pocillos y los títulos de ELISA con y sin presión de amplificación. Se cultivan en primer lugar agrupaciones de células transfectadas en medio de selección hasta la confluencia y luego en medio de amplificación (MTX 4,8x10⁻⁸ M) antes del examen de sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA para determinar la producción de EPO. Se examinan aproximadamente 1000 pocillos en crecimiento, y se someten a prueba 50 de tales cultivos para determinar la productividad de EPO específica con aumento de la concentración de MTX. Se determinan los productores máximos, la concentración de MTX aumentó dos veces y se usan los mejores productores para el cultivo adicional.

20 Se realizan las etapas de selección y primera amplificación en la placa de 96 pocillos y tras examinar todos los clones, creciendo en MTX 4,8x10⁻⁸ M, se seleccionan 7 clones, designados 09/96/1 F5, 09/96/3D5, 09/96/3H5, 09/96/5D4, 09/96/5H1, 09/96/6C5 y 09/96/7E6, y se comparan sus propiedades de crecimiento, productividad de EPO, patrón de proteínas en inmunotransferencias de tipo Western, pruebas de funcionalidad de EPO y estabilidad cromosómica.

25 El tiempo de duplicación celular parece que es el mismo para todos los clones y pueden dividirse de 1:2 a 1:5 dos veces a la semana. La potenciación de la concentración de MTX desde 9,6x10⁻⁸ M hasta 1,9x10⁻⁷ M también mejora la productividad, mientras que la duplicación adicional de la concentración de MTX no influye en el valor de ELISA. De ese modo la subclonación se realiza a MTX 3,8x10⁻⁷ M. Se analiza la inmunofluorescencia a MTX 1,9x10⁻⁷ M donde los cultivos individuales no difieren significativamente.

30 Se compara la morfología celular mediante microscopía óptica y análisis de ADN mediante Coulter Counter. Los clones 09/96/7E9, 09/96/6C5, 09/96/5H1, 09/96/5D4 y 09/96/3D5 presentan la misma distribución de tamaño de núcleos que la línea celular huésped CHO-DHFR^r. En cambio, las líneas celulares 09/96/1 F5 y 09/96/3H5 tienen núcleos más grandes. Se sabe a partir de experimentos previos que esto resulta de un número extendido de cromosomas. Por tanto se decidió usar el clon 09/96/3D5 para la estabilización adicional.

35 La prueba de funcionalidad para EPO en células TF-1 proporciona la misma pendiente para los siete sobrenadantes de cultivo en comparación con el producto farmacéutico recombinante.

La proteína recombinante se somete a prueba mediante SDS PAGE e inmunotransferencia de tipo Western a cada concentración de MTX y sólo se encuentran cambios menores en cualquiera de los sobrenadantes de cultivo recombinantes. Los clones producen EPO.

Resumen y discusión

40 Se describe la selección de una línea celular CHO recombinante que expresa EPO desde la construcción de vectores de expresión eucariotas hasta la transfección de células de mamífero y el aislamiento de agrupaciones de células que expresan EPO policlonal. La base analítica se fija principalmente con ELISA, inmunofluorescencia, inmunotransferencia de tipo Western y pruebas de funcionalidad *in vitro*. Todos estos métodos se establecen en intervalos de concentración que pueden examinar sobrenadantes de cultivo de agrupaciones de células de baja producción con cantidades de sólo ng/ml así como células recombinantes más estabilizadas.

45 Se genera una agrupación CHO recombinante, en la que el número de copias de genes se amplifica gradualmente hasta MTX 3,8x10⁻⁷ M. Estas células pueden dividirse de 1:3 a 1:4 dos veces a la semana y cada vez se detectan niveles elevados de EPO en ELISA.

Ejemplo 4 - Selección adicional de una línea celular recombinante

50 Se usa la agrupación de células recombinantes 09/96/3D5 para la estabilización adicional. Se aumenta

5 gradualmente la concentración de MTX hasta MTX 0,38 μM . A este nivel de amplificación se subclonan células 3D5 recombinantes con 10 y 20 células por pocillo. Se realiza el examen de sobrenadantes de cultivo de pocillos con clones individuales mediante ELISA. La tabla 2 muestra las condiciones y eficacias de subclonación de la agrupación de células recombinantes 3D5 en presencia de MTX 0,38 μM . Se someten a prueba 300 sobrenadantes de clones individuales. Se seleccionan clones que tienen títulos de EPO elevados cuatro días tras el pase con MTX 0,77 μM en placas de 24 pocillos.

Se conservan siete de estos clones en nitrógeno líquido y se seleccionan para la amplificación adicional del número de copias de genes aumentando la concentración de MTX hasta 1,54 μM .

10 La tabla 3 compila las condiciones y eficacias de siembra en placa de la segunda ronda de estabilización. En este caso se subclonan los clones 09/96/3D5/1 H9 y 09/96/3D5/18E5 una última vez con MTX 1,54 μM . Se reducen los recuentos de células por pocillo a 4 células. Se examinan 260 clones individuales de los que más de veinte clones de cada subcultivo se transfieren a frascos T y se examinan para determinar la productividad específica. Se fijan los clones de producción finales mediante criterios tales como tasa de expresión específica, condiciones de crecimiento y distribución de tamaño del núcleo. Se desechan clones que muestran tetraploidía porque de la experiencia con tales células se desprende que tienden a mostrar patrones de crecimiento complicados en biorreactores. Tras el examen se eligen los siguientes seis subclones (cuatro subclones 1 H9 y dos 18E5), que se congelan en nitrógeno líquido.

09/96/3D5/1H9/4C2	09/96/3D5/1H9/6C2	09/96/3D5/1H9/6D4
09/96/3D5/1H9/15B4	09/96/3D5/18E5/7A6	09/96/3D5/18E5/15C3

Ejemplo 5 - Adaptación a medio de cultivo libre de suero

20 Se eligen las seis líneas celulares recombinantes finales del ejemplo 4 para su adaptación a condiciones de cultivo libres de suero tras la última etapa de subclonación.

25 Se siembran las células en el pase 7 - 12 tras la subclonación con aproximadamente 5×10^4 células/cm² en frascos T25 y se cultivan 3-4 días hasta la confluencia. En este punto de tiempo se reemplaza el medio completamente por medio de adaptación libre de suero y después de eso se renueva diariamente el 80% del medio. Se devuelven al cultivo todas las células suspendidas. Tras el tiempo de adaptación, cuando casi todas las células crecían en suspensión, se someten a pase los clones dos veces a la semana y se cultivan como cultivo en suspensión.

30 Se cultivan los clones durante 11 - 13 pases en medio de adaptación libre de suero antes de la crioconservación. Se congelan seis ampollas con 5×10^6 células cada una de cada línea celular en nitrógeno líquido con medio de congelación libre de suero. Tras descongelar, se cultivan los clones en medio de producción libre de suero. Se realiza la caracterización analítica para seleccionar el clon de producción con sobrenadantes en el segundo o tercer pase tras la descongelación.

Las pruebas analíticas incluían:

Tasa de crecimiento específico [μ] - ($\mu = \ln (X_2/X_1) / \text{días}$)

Productividad específica [q_p] - ($Q_p = \text{generación de producto} \times 10^6 / (\text{recuentos celulares} \times \text{días})$)

35 Inmunotransferencia de tipo Western

Isoelectroenfoque

Contenido en ADN y estabilidad

Estabilidad de los clones

40 Las seis líneas celulares pudieron hacerse crecer en medios de crecimiento libres de suero y se dividen dos veces a la semana. También se realiza crioconservación sin suero y tras descongelar el medio de cultivo se cambia a medio de producción libre de suero. Esta formulación está enriquecida en glucosa y aminoácidos. Tras 5 pases se determinan diferentes parámetros celulares y de proteínas y se seleccionan un clon de producción (09/96/3D5/1 H9/6C2; abreviado 6C2) y un clon de apoyo (09/96/3D5/1 H9/4C2; abreviado 4C2).

Ejemplo 6 - Comparación de las líneas celulares recombinantes

Se calculan las propiedades de crecimiento de las seis líneas celulares de los ejemplos 4 y 5 a lo largo de varias semanas determinando los recuentos celulares en cultivo así como las razones de división durante los pases. Se somete a prueba la productividad de EPO mediante ELISA. A partir de esos datos se calculan la productividad específica y la tasa de crecimiento específico tal como se describió anteriormente.

- 5 La tabla 4 resume los datos recibidos en condiciones de cultivo convencionales con una razón de división de 1:3 tras tres días de cultivo.

Se muestran los recuentos celulares (medidos mediante Coulter Counter) tras la división y tras tres días adicionales.

SDS-PAGE en condiciones reductoras

- 10 Se separan los sobrenadantes de las seis líneas celulares mediante SDS-PAGE y se comparan para detectar diferencias en el peso molecular. Los seis sobrenadantes indican patrones de SDS idénticos con una mancha observada comúnmente en tales proteínas altamente glicosiladas (datos no mostrados).

El producto disponible comercial comparable migra como una banda más distinta que surge probablemente de la separación de bandas distintas durante el procesamiento posterior.

IEF-inmunotransferencia de tipo Western

- 15 El análisis de IEF-inmunotransferencia de tipo Western debe reflejar posibles microheterogeneidades de las glicoproteínas. Según la cantidad de proteína que se carga sobre el gel se hacen visibles hasta catorce bandas. Se observa una doble banda característica en la inmunotransferencia de tipo Western aproximadamente en la mitad del gel; la siguiente banda por debajo de esta doble banda se define como banda número uno y son visibles de 9 a 10 bandas en esta parte ácida del gel. El producto comercial comparable dio cuatro bandas principales que se corresponden con el número de banda de seis a nueve en el producto heterogéneo.

Contenido en ADN de células recombinantes

El contenido en ADN es proporcional a los números de cromosomas de las líneas celulares. La estabilidad de una línea celular recombinante está influida en parte por el recuento de cromosomas y la identidad del contenido en ADN se verifica mediante comparación con la línea celular huésped (CHO dhfr).

- 25 Resumen y discusión

El aislamiento de líneas celulares CHO que expresan EPO, recombinante se describe en el presente documento. Tras dos rondas de subclonación se comparan seis líneas celulares para determinar diferentes propiedades como base para la designación de un clon de producción final. La base analítica son principalmente pruebas de ELISA, inmunotransferencia de tipo Western e IEF así como medición de ADN mediante análisis de FACS.

- 30 El patrón de inmunotransferencia de tipo Western de los sobrenadantes de cultivo recombinantes muestra varias bandas de peso molecular inferior adicionales en comparación con la proteína purificada comercial. Una explicación es que estas bandas adicionales representan isoformas que se eliminan durante el procesamiento posterior que conduce al producto comercial comparado. Otra posibilidad es que están detectándose bandas artificiales debido a una captación incompleta de SDS.

- 35 El isoelectroenfoco proporciona una distribución de isoformas idéntica para todos los sobrenadantes de cultivo celular, independientemente de su Qp.

El mejor clon de producción y de manipulación más fácil es el clon 6C2 que se elige como clon de producción. Como apoyo se elige el clon 4C2. Ambos clones pueden propagarse en botellas rotatorias.

Ejemplo 7 - Cultivo de células CHO en frascos T

- 40 Se produce eritropoyetina humana recombinante en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) en condiciones libres de suero en frascos T. Se siembra el cultivo con $2,67 \times 10^5$ células/ml. Tras un periodo de incubación de tres días se alcanza una densidad celular final de $9,35 \times 10^5$ células/ml ($\Rightarrow \mu = 0,42 \text{ días}^{-1}$).

- 45 Los ejemplos 1 a 6 describen la preparación de varios clones de CHO que expresan EPO. De los seis clones obtenidos en los ejemplos 4 y 5, se elige el clon 6C2 de CHO debido a su alta productividad específica celular superior y su alta tasa de crecimiento específico.

Ejemplo 8 - Cultivo de células CHO en un biorreactor

La línea celular CHO 6C2 se cultiva en modo de alimentación discontinua (T43C6C2) en un biorreactor de 150 l. Usando un medio de cultivo celular que consiste en DMEM/F12 de Ham 50:50 complementado con aminoácidos y que contiene un 0,25% de un péptido vegetal, Lutrol al 0,1%, metotrexato 1,54 μM (MTX), glucosa 4 g/l, NaHCO_3 2,5 g/l, etanolamina, citrato férrico, ácido ascórbico y selenito de sodio. El medio no contenía ninguna proteína funcional cara (recombinante o de fuentes naturales). Están presentes componentes derivados de un origen animal. Las células se siembran a alrededor de 5×10^5 células/ml en 56 l de medio. Se fija la pO_2 al 50% de saturación de aire, la temperatura a 37°C y el pH a 7,0 y se mantienen constantes durante el transcurso de la fermentación.

Se mantiene la concentración de glucosa por encima de 1 g/l. Tras 4 días se llena el reactor hasta 150 l con medio nuevo. Tras el día 9 se extiende el lote añadiendo 1875 ml de un concentrado de nutrientes que contiene aminoácidos, un hidrato de carbono y una peptona derivada de plantas. Tras 10 días se añaden otros 1875 ml del concentrado de nutrientes. Dos días más tarde (día 12) se recoge el sobrenadante que contiene eritropoyetina.

Ejemplo 9 - Producción de eritropoyetina en un biorreactor sin metotrexato

Se cultiva la línea celular CHO 6C2 en modo de alimentación discontinua (Kamp 4 B5-1 y 2) en un biorreactor de 5 l. El medio es como en el ejemplo 9. Se fija el primer biorreactor (Kamp 4 B5-1) con MTX 1,54 μm en el medio, y el segundo (Kamp 4 B5-2) sin MTX.

Se mantiene la concentración de glucosa por encima de 1 g/l. Se siembran las células a alrededor de 5×10^5 células/ml en 1250 ml de medio. Se fija la pO_2 al 50% de saturación de aire, la temperatura a 37°C y el pH a 7,0 y se mantienen constantes durante el transcurso de la fermentación. Tras 2 días se llena el reactor hasta 5 l con medio nuevo. Tras el día 6, 7, 8, 9 y 10 se extiende el lote añadiendo de 50 a 122 ml de un concentrado de nutrientes que contiene aminoácidos, un hidrato de carbono y una peptona derivada de plantas. En el día 11 se recoge el sobrenadante que contiene eritropoyetina.

Se encuentra que el cultivo sin metotrexato es superior debido al mejor patrón de glicosilación.

Ejemplo 10 - Producción de eritropoyetina en un biorreactor con medio enriquecido

Se cultiva la línea celular CHO 6C2 en modo de alimentación discontinua (Kamp 11 B5-1 y 2) en un biorreactor de 5 l. Se hace funcionar el biorreactor 1 como en el ejemplo 10 (Kamp 4 B5-2). En el biorreactor 2 se usa un medio de cultivo celular que consiste en DMEM/F12 de Ham 50:50 complementado con aminoácidos enriquecido y que contiene un 0,325% de un péptido vegetal, Lutrol al 0,1%, glucosa 6,4 g/l, NaHCO_3 2,5 g/l, etanolamina, citrato férrico, ácido ascórbico y selenito de sodio y fosfato 0,6 g/l. Se siembran las células a alrededor de 5×10^5 células/ml en 1250 ml de medio. Se fija la pO_2 al 50% de saturación de aire, la temperatura a 37°C. Se fija el pH a 7,1 al comienzo. Durante el transcurso de la fermentación se reduce gradualmente hasta 6,9.

A lo largo del transcurso del cultivo la concentración de glucosa en el biorreactor 2 se mantiene entre 3 y 4 g/l. Tras 2,5 días se llena el reactor hasta 5 l con medio nuevo. Tras el día 6, 7, 8, 9 y 10 se extiende el lote añadiendo un concentrado de nutrientes enriquecido que contiene aminoácidos, un hidrato de carbono y una peptona derivada de plantas. En el día 11 se recoge el sobrenadante que contiene EPO.

Se encuentra que el cultivo con un medio enriquecido en nutrientes (aminoácido, glucosa, peptona de plantas y fosfato) así como el desplazamiento del pH desde 7,1 hasta 6,9 aumenta hasta más del doble la concentración de EPO final a un perfil de glicosilación comparable.

Ejemplo 11 - Producción de eritropoyetina en un biorreactor que carece de componentes derivados de animales

Se cultiva la línea celular CHO 6C2 en modo de alimentación discontinua (Kamp 17 B5-1 y 3) en un biorreactor de 5 l. Se fijan todos los parámetros como en el ejemplo 10 (Kamp 4 B5-2) si no se indica otra cosa. En el biorreactor 2, se usa un medio de cultivo celular que no contiene ningún componente derivado de animales. Por ejemplo, el aminoácido tirosina o cisteína, que normalmente se derivan de un animal (como salmón o cabello humano) se han reemplazado por aminoácidos sintéticos.

Tras 2,5 días se llena el reactor hasta 5 l con medio nuevo. Tras el día 5, 6, 7, 8 y 9 se extiende el lote añadiendo un concentrado de nutrientes que contiene aminoácidos, un hidrato de carbono y una peptona derivada de plantas. En el día 9 a 10 se recoge el sobrenadante que contiene eritropoyetina.

Se encuentra que un medio que no contiene ningún componente de origen animal produce una concentración de

EPO final comparable. Sin embargo, el cultivo crece más lento y necesita una adición de concentrado de nutrientes adicional.

Ejemplo 12 - Producción de eritropoyetina en un biorreactor con medio enriquecido (vitaminas, oligoelementos)

5 Se cultiva la línea celular CHO 6C2 en modo de alimentación discontinua (Kamp 12 C) en un biorreactor de 10 l. Se hace funcionar el biorreactor como en el ejemplo 11 (Kamp 11 B5-2) con las siguientes excepciones:

10 Se usa un medio de cultivo celular que consiste en DMEM/F12 de Ham 50:50 complementado con aminoácidos enriquecido y que contiene un 0,325% de un péptido vegetal, Lutrol al 0,1%, glucosa 6,4 g/l, NaHCO₃ 2,5 g/l, etanolamina, citrato férrico, vitaminas, oligoelementos y selenito de sodio y fosfato 0,6 g/l. Se dobla el contenido del concentrado y se enriquece con vitaminas.

Se siembran las células a alrededor de 5×10^5 células/ml en 4500 ml de medio. Se fija la pO₂ al 50% de saturación de aire, la temperatura a 37°C. Se fija el pH a 7,1 al comienzo. Durante el transcurso de la fermentación se reduce gradualmente hasta 6,9.

15 A lo largo del transcurso del cultivo se mantiene la concentración de glucosa en el biorreactor entre 3 y 4 g/l. Tras 3 días se llena el reactor hasta 10 l con medio nuevo. Tras el día 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se extiende el lote añadiendo el concentrado de nutrientes enriquecido. En el día 13 se recoge el sobrenadante que contiene eritropoyetina.

Ejemplo 13 - Aislamiento de EPO

Separación de células

20 Se produce eritropoyetina humana recombinante en una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) en condiciones libres de suero mediante fermentación discontinua de alimentación discontinua. Tras la fermentación (4x aprox. 1+2 fases de expansión en modo discontinuo en 2 biorreactores diferentes) se enfría el caldo de cosecha con aproximadamente 200 - 300 mg de EPOhr por l hasta 2-8°C y sin ningún periodo de almacenamiento provisional clarificado en primer lugar mediante centrifugación por medio de un separador de discos, luego posteriormente mediante filtración en profundidad (PP Poligard 0,1 µm, Seitz Bio10 o Cuno A90M08, rendimiento de aprox. 300 l/m² de área de filtro) y por 0,2 µ (Sartobran P, Sartorius o Duropore 0,22 µ, Millipore). Para evitar una alta lisis celular y en consecuencia una alta contaminación del producto con HCP (proteínas de la célula huésped) es importante en primer lugar cosechar en un punto de tiempo óptimo (aprox. 12 días en el cultivo principal, consumo de oxígeno estancado) y en segundo lugar usar un equipo de separación de células especialmente diseñado para la separación de células eucariotas frágiles, por ejemplo CSC6 (ECA de 6000 m², 15500 xg, aprox. 200 Uh, Westfalia) con entrada de alimentación hidrohermética o BTPX 250 (ECA de 11000 m², 13000 xg, 300 Uh, Alfa Laval) con entrada de discos suave y salida en puercoespín. La comparación de diferentes técnicas de separación influyendo filtración en flujo tangencial y centrifugación revela diferencias en la lisis celular por la tensión de corte (medida mediante la liberación de la enzima marcadora intracelular LDH). La centrifugación proporciona la separación más suave (<3 U de LDH/mg de EPOhr) y va a preferirse.

35 Como alternativa, sólo se usa la centrifugación por medio de separador de discos (sin la etapa de filtración en profundidad) tal como se describió anteriormente para la etapa de separación de células. Como otra alternativa, se usa la etapa de filtración en profundidad (sin la etapa de centrifugación) tal como se describió anteriormente.

Captura mediante cromatografía de intercambio aniónico (AEX)

40 Tras la clarificación se diluye el sobrenadante bruto con aproximadamente 3 vol. de agua hasta alcanzar una conductividad final de menos de o igual a 5 mS/cm y se ajusta a pH 7,5 con base de Tris, antes de aplicar sobre la resina de captura de AEX.

45 La columna de AEX usada tiene una altura de lecho de aproximadamente 10 - 20 cm y se empaqueta con Q Ceramic HyperD F (Biosepra) con buenas características de flujo. Se equilibra con Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 50 mM. Entonces se carga el sobrenadante celular diluido (10 -15 mg de EPOhr por ml de resina) sobre la columna a una velocidad de flujo de 4 - 8 cm/min y se lava la columna con 10 - 15 volúmenes de columna (CV) con tampón de equilibrio. Se eluye el producto mediante elución por etapas lograda cambiando a un tampón de conductividad superior, Tris 20 mM pH 7,5 con NaCl 150 mM. Se agrupan las fracciones de pico y proporcionan un rendimiento de aproximadamente el 50-60%.

50 Como alternativa, se concentra la agrupación de fracciones mediante ultrafiltración para reducir el volumen intermedio y para normalizar las siguientes condiciones de precipitación. Se usa preferiblemente una membrana de corte de 5 a 10 kDa y se ajusta una concentración de producto diana de aproximadamente 20 mg/ml.

Precipitación con sulfato de amonio

La agrupación de captura de la etapa anterior se purifica normalmente mediante precipitación de las proteínas contaminantes de la célula huésped con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,4 M. A esta concentración AS casi no se encuentra producto en el precipitado dejando un sobrenadante libre de HCP puro que tiene que diluirse antes de la siguiente purificación de RPC hasta $< (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 240 mM en la carga de RPC.

Se realiza la precipitación añadiendo 1,5 volúmenes de una disolución madre de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4M, Tris 20 mM pH 7,5) a un volumen de agrupación de captura, incubación durante 30 min a 10-15°C y separación del precipitado mediante filtración en profundidad (Seitz Bio10 o Cuno A90M08) y por 0,2 μ (Sartobran P, Sartorius o Duro pore 0,22 μ , Millipore). En el caso de un alto volumen de elución = agrupación de elución de EPOhr diluida (< 5 mg de EPOhr/ml) la precipitación de HCP puede mejorarse mediante una etapa de concentración UF opcional (corte de 10 kDa).

La precipitación con sulfato de amonio es más eficaz que la cromatografía de interacción hidrófoba.

Para reducir el contenido en sulfato de amonio de la etapa de precipitación anterior el sobrenadante que contiene el producto tiene que diluirse tal como se mencionó anteriormente. Una alternativa es una etapa de ultrafiltración/diafiltración. Se usa preferiblemente una membrana de corte de 5 a 10 kDa y se ajusta una concentración de sulfato de amonio diana de menos de 240 mM y una concentración de producto de aproximadamente 30 mg/ml. El tampón usado para la etapa de diafiltración es Tris/HCl 20 mM pH 7,0.

Cromatografía de fase inversa

La siguiente etapa de purificación etapa es una cromatografía de fase inversa que es útil en varios sentidos: a) las diferentes isoformas se separan bien según su estructura principal de azúcar (las formas altamente glicosiladas/sialiladas se eluyen antes que las formas menos glicosiladas/sialiladas), b) se eliminan proteínas de la célula huésped residuales con esta cromatografía de alto rendimiento y c) la cromatografía es una etapa robusta para la eliminación de virus así como para la inactivación de virus mediante el disolvente orgánico. La 30RPC (Amersham Biosciences) fuente es una resina polimérica que puede a) ejecutarse a presión media (< 10 bar) y b) desinfectarse con altas concentraciones de NaOH. La altura de lecho preferida es de entre 10 y 15 cm, la carga recomendada oscila entre 8-12 mg de EPOhr por ml de resina empaquetada.

Antes de la etapa de RPC es necesario ajustar el sobrenadante que contiene producto a una concentración final de sulfato de amonio de menos de 0,24 M. Este condicionamiento puede realizarse a) mediante una etapa de dilución en línea posterior (1 vol. de sobrenadante de EPOhr + 4 vol. de Tris/HCl 20 mM pH 7,0 + 5 vol. de ACN al 50% en peso en Tris/HCl 20 mM pH 7,0 durante la carga de RPC o para ahorrar el disolvente orgánico caro preferentemente de nuevo mediante diafiltración/concentración (UF con corte de 10 kDa) frente a Tris/HCl 20 mM pH 7,0 antes de la etapa de carga. La columna se ha equilibrado antes y lavado después de la carga con acetonitrilo (ACN) al 25% en peso en Tris 20 mM pH 7,0. Se eluye el producto con un gradiente lineal de desde el 25% hasta el 50% de ACN y se recoge en fracciones pequeñas (en particular aproximadamente 0,2 CV, como alternativa aproximadamente 0,3-0,5 CV) precargadas con 4 volúmenes de tampón de dilución (Tris 50 mM pH 7,0) para reducir inmediatamente la concentración de disolvente, que puede inducir agregación y altera la siguiente cromatografía de AEX. Se agrupan las fracciones de aproximadamente la primera mitad del pico de elución para dar la agrupación de RPC, que se procesa adicionalmente. Esta agrupación contiene las isoformas con el grado de glicosilación superior favorecido. Mediante este régimen de fraccionamiento, se elimina producto de EPOhr des-O-glicosilado en el que el O-glicano falta en la posición Ser126, que está presente en el cultivo celular a niveles de hasta el 20%.

En un método alternativo, para inducir inactivación de virus mediante exposición a un disolvente orgánico, se precargan las fracciones con 0,5 volúmenes de Tris 20 mM pH 7,0 en lugar de 4 volúmenes del mismo tampón tal como se describió anteriormente y se incuban durante de 20 a 40 minutos o más. Tras esta etapa de incubación se añaden otros 3,5 volúmenes de Tris 20 mM pH 7,0 en referencia al volumen de fracción no diluida original y, por tanto, se detiene la inactivación de virus.

Se agrupan las fracciones con o sin inactivación de virus para su purificación adicional. La agrupación comienza habitualmente al 50 - 100% de la DO máxima en el sitio ascendente y acaba aproximadamente con fracciones por encima del 70-80% en el sitio descendente. Fracciones que se eluyen más pronto pueden contener proteínas de la célula huésped, mientras que fracciones que se eluyen más tarde contienen isoformas menos sialiladas, menos activas. Adicionalmente puede realizarse un análisis de CZE para ayudar a la agrupación de determinadas isoformas.

Cromatografía de intercambio aniónico

Entonces se carga la agrupación de RPC diluida sobre una columna de AEX de alto rendimiento, lo que ayuda de

nuevo a seleccionar isoformas específicas y eliminar proteínas de la célula huésped. Esta vez las isoformas se separan según el punto isoeléctrico, es decir según el número de ácidos siálicos que es proporcionar al grado de glicosilación. Se usa una resina de alto rendimiento, Q-Sepharose HP (Amersham Biosciences), que muestra una eficacia de separación excelente. La altura de lecho es de entre 15 y 20 cm. Todas las condiciones, tales como carga, gradiente y altura de lecho se definen para mantener una concentración de producto bastante baja, que por lo demás conduce a un pico posterior significativo durante la elución provocado por agregación inducida por disolvente del producto.

Se carga la agrupación de RPC con 2-4 mg de EPO por ml de resina en Q Sepharose HP equilibrada con Tris 20 mM pH 7,0. Tras una etapa de lavado con tampón de equilibrado, se eluye el producto en un gradiente salino lineal de 10 CV de NaCl de desde 0 hasta 300 mM en tampón de equilibrado. Se recoge el pico de elución en fracciones de 0,1 CV o 0,25 CV y se analizan agrupaciones analíticas mediante CZE para encontrar la agrupación de fracciones correcta, que contiene las isoformas de eritropoyetina deseadas. La agrupación de AEX consiste normalmente en la segunda mitad del pico de elución, donde se eluyen las isoformas altamente glicosiladas y sialiladas.

Usando electroforesis capilar zonal (CZE) como control en proceso, es posible producir una mezcla definida de manera precisa de isoformas de eritropoyetina incluso si la fuente contiene sólo unas cuantas isoformas altamente sialiladas, debido a diferentes condiciones de fermentación o sistemas de huésped.

La CZE es un método de alta resolución que puede separar isoformas de diferente carga. Proporciona resultados cuantitativos sobre cada isoforma individual en cada fracción. Esta información permite el agrupamiento de fracciones específicas que conducen a un perfil de isoformas constante de lote a lote. Normalmente se omiten las que se isoformas menos sialiladas, que se eluyen temprano agrupando sólo las fracciones que se eluyen más tarde.

Cromatografía de exclusión molecular

En una última etapa cromatográfica, se perfecciona la agrupación de AEX mediante exclusión molecular, que elimina posibles dímeros y agregados superiores, y realiza un intercambio de tampón para la formulación final. La Superdex 75 prep grade (Amersham Biosciences) usada en esta etapa tiene una buena resolución incluso a volúmenes de carga superiores hasta el 15% del volumen de la columna. La altura de lecho preferida es de entre 60 y 80 cm.

Puesto que no es posible ejecutar la cromatografía de AEX de la etapa anterior de un modo para lograr una alta concentración de producto en la agrupación de AEX, la agrupación tiene que concentrarse antes de la filtración en gel. Esto se realiza mediante una etapa de ultrafiltración usando una membrana de UF de 5 -10 kDa que conduce a un retentado de UF concentrado aproximadamente 10 veces con aproximadamente 10 mg de eritropoyetina por ml.

Se carga aproximadamente un 3-7% en CV de retentado de UF directamente sobre una columna Superdex de 75 pg equilibrada previamente con tampón Na 20 mM pH 7,0, NaCl 75 mM. Tras aproximadamente 1 - 1,5 CV el producto comienza a eluir de la columna y se recoge el pico de elución para dar la agrupación SEC.

Nanofiltración

Para eliminar una posible carga de virus se implementa una etapa de filtración de virus de extremo cerrado adicional. Esta filtración se realiza con una membrana especial, diseñada para eliminar partículas tan pequeñas como 15 nm, tales como la Planova 15N (Asahi). Unidades de nanofiltración de extremo cerrado alternativas son cartuchos o cápsulas PALL Ultipor VF Grade DV20 o Millipore Viresolve NFP. Especialmente para virus no envueltos pequeños, por ejemplo parvovirus, casi no hay ninguna otra herramienta de eliminación o inactivación de virus.

La agrupación SEC esterilizada por filtración se hace pasar sobre un filtro de extremo cerrado con una membrana adecuada y el filtrado representa el principio activo a granel final. Alternativamente, la nanofiltración puede insertarse entre la concentración por UF y la cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 1: Células CHO recombinantes: transfecciones con EPO/neo y EPO/dhfr

Transfecciones en T25

Transfección	Número de clones por T25	Qp, MTX $9,6 \times 10^{-8}$ M [$\mu\text{g}/10^6$ células/d]
09/T25/1 (50:1)	136	0,16
09/T25/2 (50:1)	107	2,6

ES 2 525 945 T3

(continuación)

Transfección	Número de clones por T25	Qp, MTX $9,6 \times 10^{-8}$ M [$\mu\text{g}/10^6$ células/d]
09/T25/3 (5:1)	459	0,14
09/T25/4 (5:1)	648	0,9

Transfecciones en 96 pocillos

Transfección	Número de clones por placa	Clon seleccionado
09/96/1 (50:1)	47	1F5
09/96/2 (50:1)	46	
09/96/3 (50:1)	50	5D5, 3H5
09/96/4 (50:1)	52	
09/96/5 (50:1)	49	5D4, 5H4
09/96/6 (5:1)	416	6C5
09/96/7 (5:1)	556	7E9
09/96/8 (5:1)	392	
09/96/9 (5:1)	427	
09/96/10 (5:1)	352	
09/96/11 (75:1)	49	
09/96/12 (75:1)	60	12A9

5 Amplificación de diferentes clones

Clon	Qp [$\mu\text{g}/10$ células/d]		
	MTX $9,6 \times 10^{-8}$ M	MTX $1,9 \times 10^{-7}$ M	MTX $3,8 \times 10^{-7}$ M
09/96/1F5	11	11,4	17,1
09/96/3D5	8,4	14,4	11,4
09/96/3H5	8,2	14,1	12,9
09/96/5D4	4,9	3,8	3,6
09/96/5H1	4,7	7,1	6,7
09/96/6C5	4,2	3,8	3,6

(continuación)

Clon	Qp [$\mu\text{g}/10$ células/d]		
	MTX $9,6 \times 10^{-8}$ M	MTX $1,9 \times 10^{-7}$ M	MTX $3,8 \times 10^{-7}$ M
09/96/7E9	5,5	8,8	8,9
09/96/12A9	6		

Tabla 2: Condiciones de subclonación y eficacias de siembra en placa de la agrupación de células 3D5 con MTX $0,38 \mu\text{M}$

5

Número de placas de 96 pocillos	Número de células sembradas/pocillo	% de células en crecimiento	% de clones individuales
25 (n.º 6-30)	10	13%	77%
5 (n.º 1-5)	20	24%	54%

Tabla 3: Condiciones de subclonación y eficacias de siembra en placa del subclón 3D5/1H9 y 3D5/18E5 con MTX $1,54 \mu\text{M}$ 3D5/1H9

Número de placas de 96 pocillos	Número de células sembradas/pocillo	% de células en crecimiento	% de clones individuales
8 (n.º 9-16)	10	6,4%	85%
8 (n.º 1-8)	30	19%	46%
3D5/18E5			
Número de placas de 96 pocillos	Número de células sembradas/pocillo	% de células en crecimiento	% de clones individuales
8 (n.º 9-16)	4	15%	56%
8 (n.º 1-8)	8	29%	44%

10

Tabla 4: Productividad específica y propiedades de crecimiento de clones de CHO recombinantes

	4C2	6C2	6D4	15B4	7A6	15C3
Número de células inoculadas [$\times 10^5$ células/ml]	2,17	2,67	2,89	0,71	2,38	2,16
Número de células finales [$\times 10^5$ células/ml]	7,27	9,35	8,8	2,61	6,41	6,15
Tasa de crecimiento específico μ [días ⁻¹]	0,4	0,42	0,37	0,43	0,33	0,35

REIVINDICACIONES

1. Método para recuperar y purificar eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) a partir de un medio de cultivo celular que comprende células huésped, método que comprende las etapas de:
- 5 (a) eliminar células huésped, constituyentes celulares y residuos del medio de cultivo celular realizando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en (i) centrifugación seguida por una etapa de filtración en profundidad, (ii) una etapa de filtración en profundidad y (iii) centrifugación, para obtener un sobrenadante de medio de cultivo clarificado;
- (b) ajustar la conductividad del sobrenadante a 5 mS/cm o menos, y un pH de entre aproximadamente 7,0 y 8,0;
- 10 (c) aplicar el sobrenadante de la etapa (b) a una columna que comprende un medio cromatográfico de intercambio aniónico, lavar la columna, eluir la EPOhr de la columna y recoger la fracción/fracciones de picos que contienen EPOhr;
- (d) someter las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) a una etapa de cromatografía de fase inversa usando una resina que puede ejecutarse a presión media (< 10 bar) y es resistente a altas concentraciones de NaOH, eluyéndose la EPOhr usando un gradiente lineal de un disolvente orgánico;
- 15 (e) aplicar una o más fracciones eluidas en la etapa (d) que contienen EPOhr a una columna que comprende medios cromatográficos de intercambio aniónico, lavar la columna y eluir la EPOhr usando un gradiente salino lineal;
- (f) seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (e) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr; y
- 20 (g) someter una o más fracciones eluidas en la etapa (f) que contienen EPOhr a una o más etapas cromatográficas de exclusión molecular usando un medio de filtración en gel para eliminar posibles dímeros y agregados superiores; y recoger el eluato que contiene EPOhr.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la centrifugación en la etapa (a) se realiza usando un separador de discos.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende además, entre la etapa (d) y la etapa (e), la etapa adicional de:
- 25 seleccionar una o más fracciones eluidas en la etapa (d) que contienen EPOhr basándose en el grado de sialilación de la EPOhr.
4. Método según la reivindicación 1, en el que antes de la etapa (d), se someten las fracciones de picos de la etapa (c) a una etapa de precipitación con sulfato de amonio para precipitar proteínas contaminantes de la célula huésped, ajustándose entonces la concentración de sulfato de amonio del sobrenadante a una concentración compatible con la etapa (d).
- 30 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha concentración es inferior a sulfato de amonio 0,24 M.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el pH en la etapa (b) es de aproximadamente pH 7,5.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de elución en la etapa (c) se realiza usando un tampón que tiene una concentración de sal de más de 125 mM.
- 35 8. Método según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico en la etapa (d) se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, etanol y hexilenglicol.
9. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de EPO en la etapa (d) se eluye empleando un gradiente lineal del disolvente orgánico de desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 100%.
- 40 10. Método según la reivindicación 8, en el que el disolvente orgánico en la etapa (d) es acetonitrilo y el polipéptido de EPO se eluye empleando un gradiente de desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 50%.
11. Método según la reivindicación 1, en el que antes de la etapa (e) las fracciones eluidas en la etapa (d) se diluyen con un tampón acuoso apropiado.
12. Método según la reivindicación 11, en el que antes de la etapa (e) las fracciones diluidas se dejan durante un

periodo de tiempo apropiado suficiente para inactivar contaminantes virales.

13. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (g) las fracciones se someten a una etapa de ultrafiltración antes de la etapa de cromatografía de exclusión molecular.

5 14. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en el que en la etapa (d) las fracciones se someten a una etapa de ultrafiltración antes de la cromatografía de fase inversa.

15. Método según la reivindicación 4, en el que las fracciones de picos combinadas de la etapa (c) se someten a una etapa de ultrafiltración antes de la etapa de precipitación con sulfato de amonio.

16. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de nanofiltración de extremo cerrado para eliminar virus antes o después de la etapa (g).

10 17. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (a) a cualquiera de los procedimientos (i), (ii) o (iii) le sigue una etapa de filtración por 0,2 μm .

18. Método según la reivindicación 1 ó 3, en el que uno o más de los procedimientos de selección en la etapa (f) o entre la etapa (d) y la etapa (e) se realiza usando electroforesis capilar zonal.