

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 936**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10171626 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2415779**

54 Título: **Método para producir y purificar una sialiltransferasa soluble activa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2015

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

**ANGERMANN, AXEL, DR.;
SCHECKERMANN, CHRISTIAN, DR. y
SCHMIDT, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 936 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

Método para producir y purificar una sialiltransferasa soluble activa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la producción y la purificación de un polipéptido de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc)-alfa-2,6-sialiltransferasa I (ST6GalNAcI). El método comprende las etapas de producir el polipéptido de la sialiltransferasa en células de ovario de hámser chino (CHO) y purificar el polipéptido con una combinación de etapas de cromatografía. El método produce un alto rendimiento del polipéptido de sialiltransferasa que es muy puro y enzimáticamente activo. La ST6GalNAcI obtenida puede emplearse para la glicosilación de proteínas terapéuticas, tales como G-CSF.

10 Antecedentes de la invención

En la naturaleza aparece una gran diversidad de estructuras de oligosacáridos y muchos tipos de glicopéptidos, y estos son sintetizados, en parte, por un gran número de glicosiltransferasas. Las glicosiltransferasas catalizan la síntesis de glicolípidos, glicopéptidos y polisacáridos transfiriendo un resto mono- u oligosacárido activado desde un donante a una molécula aceptora existente para iniciar o alargar una cadena de carbohidrato. Se cree que está implicada una reacción catalítica en el reconocimiento del donante y del aceptor por los dominios adecuados de la glicosiltransferasa, así como el sitio catalítico de la enzima.

Más del 30% de todas las proteínas terapéuticas y muchos compuestos terapéuticos peptídicos potenciales son péptidos glicosilados. En la técnica se sabe que la unión de la estructura de glicano correcta puede desempeñar un papel clave en el plegamiento, la actividad biológica, la biodistribución y la eficacia farmacológica de los péptidos terapéuticos. Además, la glicosilación es un factor críticamente importante que influye en la semivida *in vivo* y la inmunogenicidad de los péptidos terapéuticos. En efecto, los seres humanos generalmente solo toleran los productos bioterapéuticos que presentan tipos concretos de uniones de carbohidratos y a menudo rechazan a las glicoproteínas que incluyen uniones de oligosacáridos que no son típicas de mamíferos. Por ejemplo, los péptidos poco glicosilados son reconocidos por el hígado como "viejos" y, así, son eliminados con más rapidez del cuerpo que los péptidos glicosilados de modo adecuado. Por contraste, los péptidos hiperglicosilados o los péptidos glicosilados de modo incorrecto pueden ser inmunogénicos.

La producción de un glicopéptido recombinante, por contraste con un péptido no glicosilado recombinante, requiere que un péptido producido de modo recombinante se someta a etapas de procesamiento adicionales, *in vivo* dentro de la célula o *in vitro* después de que el péptido haya sido producido por la célula. El péptido puede tratarse de modo enzimático, empleando una glicosiltransferasa para introducir uno o más grupos glicosilo sobre el péptido mediante la unión covalente del grupo o grupos glicosilo al péptido.

La producción de un glicopéptido mediante etapas externas *in vitro* del procesamiento del péptido puede ser larga y costosa. Esto es debido, en parte, a la carga y al coste de producir glicosiltransferasas recombinantes para la glicosilación *in vitro* de péptidos y glicopéptidos para producir compuestos terapéuticos de glicopéptidos. A medida que aumenta la demanda y el uso de productos glicoterapéuticos recombinantes, son necesarios nuevos métodos para preparar glicopéptidos con más eficacia.

Además, a medida que se descubren más glicopéptidos útiles para el tratamiento de una diversidad de enfermedades, son necesarios métodos que disminuyan el coste de su producción. Además, en la técnica también es necesario desarrollar métodos para producir glicopéptidos recombinantes con más eficacia para su uso en el desarrollo y la mejora de los productos terapéuticos de glicopéptidos.

En el documento WO2003/031464A2 se describen glicosiltransferasas y su uso para la glicosilación de proteínas.

Las sialiltransferasas constituyen una familia de glicosiltransferasas que catalizan la transferencia postraduccional del ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) a los sustratos de oligosacáridos aceptores en las posiciones terminales sobre las glicoproteínas y los glicolípidos (Paulson et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264:17615-17618). Se calcula que el genoma humano codifica más de 20 sialiltransferasas diferentes necesarias para sintetizar todas las estructuras de sialooligosacáridos conocidas presentes en células de mamífero, pero solo se han clonado 16 ADNc de sialiltransferasas humanas diferenciadas (Tsuji S. et al., 1996, *Glycobiology*, 6:5-7; Tsuji S., 1996, *J. Biochem.*, 120:1-13; Weinstein J. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257:13835-13844). Originariamente, las sialiltransferasas se purificaron bioquímicamente y sus ADNc se clonaron empleando secuencias N-terminales. La comparación de las secuencias de ADNc obtenidas reveló dos regiones altamente conservadas, denominadas motivos *L*- y *S*-sialilo, que participan en la unión al sustrato. Después se han clonado varias sialiltransferasas mediante PCR empleando cebadores degenerados diseñados dentro de los motivos de sialilo o mediante clonación de expresión (Nara K. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7952-7956; Nakayama J. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:3684-3691; Nakayama J. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:7031-7035). La clonación de genes mediante presentación diferencial añade una estrategia totalmente diferente a la identificación de nuevas sialiltransferasas con importancia funcional putativa en procesos relacionados con enfermedades.

El documento US 6.280.989 describe la clonación de diferentes sialiltransferasas humanas y de ratón y diferentes métodos para purificar estas sialiltransferasas. Sticher et al. (1991), *Glyconjugate Journal*, 8(1):45-54, describen la purificación de una sialiltransferasa a partir de hígado humano.

5 Las sialiltransferasas se diferencian en su especificidad de sustrato y en la distribución tisular, y se clasifican en cuatro familias según los enlaces de carbohidratos que sintetizan: las familias ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc, y ST8Sia. Los miembros de cada familia muestran una fuerte actividad hacia ciertos grupos aceptores, aunque las especificidades de sustrato de estas enzimas se solapan; un enlace puede ser sintetizado por múltiples enzimas.

10 Una de estas sialiltransferasas concreta que tiene utilidad en el desarrollo y la producción de glicopéptidos terapéuticos es la *N*-acetilgalactosamina- α 2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAcI), que cataliza la transferencia del ácido siálico desde un donante de ácido siálico hasta un aceptor de ácido siálico. La enzima ST6GalNAcI de pollo de longitud completa se describe, por ejemplo, en Kurosawa et al. (1994, *J. Biol. Chem.*, 269:1402-1409).

En el pasado, se ha intentado aumentar la disponibilidad de sialiltransferasas recombinantes para la producción *in vitro* de glicopéptidos.

15 Los documentos EP 0 737 745 A1 y U.S. 5.032.519 de the Institute of Physical & Chemical Research se refieren al uso de *E. coli* para producir una versión segregada de una proteína que comprende una porción, concretamente un dominio activo, que se deriva de ST6GalNAcI y que es responsable de su actividad.

20 El documento WO 2007/056524 A2 de Neose Technologies Inc. describe métodos para producir un polipéptido de ST6GalNAcI modificado, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedante procarionta recombinante bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de ST6GalNAcI modificado en las células hospedantes procariontas. Estos polipéptidos de ST6GalNAcI modificados son polipéptidos quiméricos que comprenden una primera porción de un polipéptido de Gal- β 1,3GalNAc- α 2,3-sialiltransferasa (ST3GalI) y una segunda porción de un polipéptido de GalNAc- α -2,6-sialiltransferasa I (ST6GalNAcI). Los polipéptidos de ST6GalNAcI modificados también pueden ser polipéptidos truncados que carecen del dominio de señal de ST6GalNAcI completo, o de una porción de este, del dominio transmembrana de ST6GalNAcI completo, o de una porción de este, y/o del dominio troncal de ST6GalNAcI completo, o de una porción de este, en células hospedantes eucariotas o procariontas.

30 El documento US 2006/0234345 A1 de Neose Technologies Inc. describe un método para producir una glicosiltransferasa eucariota soluble en un microorganismo procarionta que está en un entorno oxidante, mediante a) la expresión de un ácido nucleico que codifica la glicosiltransferasa eucariota en el microorganismo procarionta, y después, b) cultivar el microorganismo procarionta bajo condiciones que permiten la expresión de la glicosiltransferasa eucariota activa soluble dentro de un compartimento celular del microorganismo procarionta.

Skretas et al. (2009, *Microbial Cell Factories*, 8:50) se refieren a un método para la expresión de la sialiltransferasa ST6GalNAcI humana en cepas de *E. coli* modificadas que poseen ciertos tipos de citoplasma oxidativo o que coexpresan el factor de activación de chaperonas/cochaperonas moleculares DnaK/DnaJ, GroEL/GroES, y Skp, y que pueden producir cantidades muy grandes de ST6GalNAcI soluble.

35 Sin embargo, la capacidad de *E. coli* para el plegamiento de proteínas y la formación de enlaces disulfuro no es suficiente, aunque existen una serie de herramientas desarrolladas para solucionar estas limitaciones. Además, el alto rendimiento de expresión de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión de *E. coli* a menudo puede conducir a la acumulación de proteínas agregadas insolubles que forman cuerpos de inclusión que pueden ser un impedimento significativo para obtener proteínas solubles activas (Brondyk W. H., 2009, *Methods in Enzymology*, vol. 463, cap. 11).

Para solucionar los problemas asociados con la producción de sialiltransferasas recombinantes en cultivos de *E. coli*, se han desarrollado sistemas de cultivo de células de insecto.

45 Los documentos US 2006/0246544 A1 y US 2008/0207487 A1 describen un método para fabricar una composición que incluye un polipéptido recombinante, por ejemplo, de sialiltransferasas, en el que el polipéptido se expresa en una célula de insecto (por ejemplo, empleando un sistema de expresión de baculovirus), y en el que la composición está fundamentalmente exenta de actividad endoglicanasa. El método incluye someter una mezcla que incluye el polipéptido a una cromatografía de modo mixto, que incluye las etapas de: (i) poner en contacto la mezcla y un medio de cromatografía de modo mixto, y (ii) eluir el polipéptido del medio de cromatografía de modo mixto generando una fracción de flujo que comprende el polipéptido.

50 Sin embargo, la complejidad del sistema de expresión de células de insecto-baculovirus, la limitada estabilidad durante la conservación de la cepa de siembra vírica requerida y la necesidad de unas titulaciones de virus muy altas para producir una infección eficaz limitan su uso para la bioproducción a gran escala. Además, se ha demostrado que los vectores víricos, tales como baculovirus, son capaces de infectar a células de mamífero, en concreto a células humanas (Boyce F. M. y Buchner N. L., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:2348-2352; Lundstrom et al., 2001, *Cytotechnology*, 35: 213-221). Por tanto, estos vectores representan una amenaza para la seguridad, en especial cuando se aplican a la producción de proteínas recombinantes a gran escala, en la que se

manipulan volúmenes grandes de células infectadas.

Una alternativa para superar las limitaciones descritas acerca del uso de sistemas de cultivo de células de insecto es el uso de sistemas de células de mamífero para la fabricación de sialiltransferasas recombinantes.

5 El documento WO 2005/121332 A2 de Neose Technologies Inc. describe métodos para producir un polipéptido de ST6GalNAcl truncado aislado que carece del dominio de señal de ST6GalNAcl completo, o de una porción de este, del dominio transmembrana de ST6GalNAcl completo, o de una porción de este, y/o del dominio troncal de ST6GalNAcl completo, o de una porción de este, en células hospedantes de insecto y procariontes, y en general indica que el polipéptido también puede ser producido en células de mamífero.

10 El documento US 5.032.519 de the University of California describe métodos para transfectar una célula hospedante, por ejemplo, una célula CHO, con un vector que porta un gen que expresa una glicosiltransferasa cuyo anclaje a la membrana y la mayoría de la región troncal han sido reemplazadas por un segmento de la señal de secreción escindible. La glicosiltransferasa soluble resultante, cuando se expresa en la célula, es segregada por la célula. La glicosiltransferasa soluble segregada después se separa del medio de cultivo celular para su uso en aplicaciones industriales o la investigación de síntesis de carbohidratos. Además, el documento US 5.032.519 describe un método para purificar una glicosiltransferasa soluble empleando una cromatografía de afinidad.

15 Sin embargo, ninguno de los documentos mencionados que se refieren a la producción de sialiltransferasas recombinantes en células de mamífero describe un método para proporcionar una sialiltransferasa recombinante que sea muy activa, esté purificada hasta una calidad farmacéutica y pueda producirse a gran escala.

20 Por tanto, son necesarios métodos eficaces de producción de sialiltransferasas recombinantes que tengan una actividad y una pureza que sea adecuada para reacciones y procesos "de escala farmacéutica", en especial para la producción de productos terapéuticos de glicopéptidos. Así, el problema que subyace a la presente invención es proporcionar estos métodos para producir sialiltransferasas recombinantes.

Sumario de la invención

25 Este problema es resuelto por la presente invención proporcionando, en un aspecto, un método para producir un polipéptido de sialiltransferasa, que comprende las etapas de:

a) expresar un polipéptido de sialiltransferasa en una célula CHO;

30 b) recoger el medio de cultivo celular que contiene el polipéptido de sialiltransferasa expresado; y purificar el polipéptido de sialiltransferasa del medio de cultivo celular sometiendo el medio de cultivo celular a (i) dos etapas de cromatografía de afinidad o una etapa de cromatografía de afinidad y una etapa de cromatografía de modo mixto, (ii) una cromatografía de intercambio aniónico, y (iii) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico, en el que la sialiltransferasa es ST6GalNAcl.

35 En una realización, el polipéptido de sialiltransferasa es un polipéptido de sialiltransferasa truncado que carece del dominio de señal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, del dominio transmembrana de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, y/o del dominio troncal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este. Preferiblemente, el polipéptido de sialiltransferasa solo comprende el dominio activo de la sialiltransferasa.

40 Generalmente, la ST6GalNAcl se selecciona del grupo que consiste en ST6GalNAcl humana, de chimpancé, de orangután, de cerdo, de vaca, de perro, de rata, de ratón y de pollo. En una realización preferida, la ST6GalNAcl es una ST6GalNAcl de pollo. Lo más preferiblemente, el polipéptido de ST6GalNAcl comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6. Según una realización de la presente invención, se emplea un módulo de expresión que codifica una secuencia señal de EPO y una secuencia de polipéptido de sialiltransferasa para expresar el polipéptido de sialiltransferasa en células CHO.

45 Preferiblemente, la etapa a) del método de producción se realiza empleando un cultivo de alimentación discontinua sin suero y/o realizando un desplazamiento de la temperatura de incubación de 37 °C +/- 1 °C a 32 °C +/- 1 °C después de alcanzar una densidad celular predefinida.

En una realización muy preferida, la etapa c) se realiza en el siguiente orden:

i. una cromatografía de intercambio aniónico;

ii. una primera cromatografía de afinidad;

iii. una segunda cromatografía de afinidad o una cromatografía de modo mixto;

50 iv. una cromatografía de intercambio catiónico.

Generalmente, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza con membranas o resinas de intercambio

aniónico que contienen grupos dietilaminoetilo (DEAE), grupos aminoetilo cuaternario (QAE), grupos amonio cuaternario (Q), grupos dimetilaminoetilo (DMAE) y/o grupos trimetilaminoetilo (TMAE) como grupos funcionales. Preferiblemente, se realiza con una resina Q-Sepharose Fast Flow, disponible en el mercado, empleando un tampón NaCl/Tris-HCl como eluyente a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0.

- 5 En general, la cromatografía de afinidad se realiza con resinas Ni-NTA, resinas Talon, resinas de cromatografía de tinte, resinas de afinidad de anticuerpos, resinas de afinidad de lectinas y/o resinas de afinidad de péptido-ligando. En una realización preferida, la (primera) cromatografía de afinidad se realiza con una resina Blue Sepharose FF, disponible en el mercado, preferiblemente empleando un tampón de clorhidrato de L-arginina/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0 como eluyente, y la cromatografía de modo mixto se realiza con una resina de hidroxapatito disponible en el mercado, preferiblemente empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0 como eluyente.

15 Generalmente, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza con una resina que contiene un material de intercambio catiónico de sulfopropilo o una resina que tenga características similares. Preferiblemente, se realiza con una resina SP-Sepharosa High Performance, disponible en el mercado, más preferiblemente empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 6,0 y 7,0 como eluyente.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona un método para la producción y la purificación de una sialiltransferasa ST6GalNAcI mejorada que es muy activa y pura. Este objetivo se logra expresando el polipéptido de la sialiltransferasa en una célula CHO, recogiendo el medio de cultivo celular que contiene el polipéptido de la sialiltransferasa expresado, y purificando el polipéptido de la sialiltransferasa del medio de cultivo sometiendo el medio de cultivo a (i) dos etapas de cromatografía de afinidad o una etapa de cromatografía de afinidad y una etapa de cromatografía de modo mixto, y (ii) una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

25 De modo más específico, la presente invención se refiere a un método en el que la purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI se realiza en el siguiente orden:

- i. una cromatografía de intercambio aniónico;
- ii. una primera cromatografía de afinidad;
- iii. una segunda cromatografía de afinidad o una cromatografía de modo mixto;
- iv. una cromatografía de intercambio catiónico.

30 A menos que se indique lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, en la presente se describen los métodos y los materiales preferidos.

35 A. Polipéptido de sialiltransferasa y módulo de expresión

40 En una realización, el polipéptido de sialiltransferasa es un polipéptido de sialiltransferasa que carece del dominio de señal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, del dominio transmembrana de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, y/o del dominio troncal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este. Preferiblemente, el polipéptido de sialiltransferasa solo comprende el dominio activo de la sialiltransferasa. El polipéptido de sialiltransferasa también puede comprender un péptido señal.

En una realización preferida, se emplea un módulo de expresión que codifica una secuencia señal de EPO y una secuencia del polipéptido de sialiltransferasa para expresar un polipéptido de sialiltransferasa en células CHO.

45 Un "polipéptido", denominado de modo alternativo "proteína", se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y que están unidos a través de enlaces amida. Además, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, P-alanina, fenilglicina y homoarginina. En la presente invención también pueden incluirse aminoácidos que no están codificados por genes. Además, en la invención también pueden utilizarse aminoácidos que han sido modificados para que incluyan grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos empleados en la presente invención pueden ser el D- o L-isómero. En general se prefiere el L-isómero. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Tal como se emplea en la presente, un "péptido" se refiere a péptidos glicosilados y no glicosilados. También se incluyen péptidos que son glicosilados de modo incompleto por un sistema que expresa el péptido. Para un análisis general, véase Spatola, A. F., en "Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins", B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983). El término polipéptido incluye moléculas que se denominan habitualmente proteínas o péptidos.

El polipéptido de sialiltransferasa es una α -N-acetilgalactosamida α -2,6-sialiltransferasa I (ST6GalNAcI) (Kurosawa et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 1402-1409).

5 Un "polipéptido de sialiltransferasa truncado" se refiere a una sialiltransferasa que tiene menos restos aminoácidos que una sialiltransferasa natural, pero que conserva la actividad enzimática. Cualquiera de una serie de restos aminoácidos puede delecionarse con la condición de que la enzima conserve la actividad. En algunas realizaciones pueden delecionarse dominios o porciones de dominios. En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de sialiltransferasa solo comprende el dominio activo de la sialiltransferasa.

10 Un "dominio activo" o "dominio catalítico" se refiere a un dominio de una proteína, o a una subsecuencia de este, que cataliza una reacción enzimática realizada por la enzima. Por ejemplo, un dominio catalítico de una sialiltransferasa incluirá una subsecuencia de la sialiltransferasa que sea suficiente para transferir un resto ácido siálico desde un donante a un sacárido aceptor. Un dominio catalítico puede incluir una enzima completa, una de sus subsecuencias, o puede incluir otras secuencias de aminoácidos que no están unidas a la enzima natural, o una de sus subsecuencias. Un ejemplo de una región catalítica es, pero sin limitación, el dominio catalítico de la ST6GalNAcI de pollo, que comprende los restos aminoácidos de 232 a 566 de la secuencia de longitud completa según SEQ ID NO:2. El dominio catalítico de la ST6GalNAcI de pollo se muestra en SEQ ID NO:4. La sialiltransferasa es ST6GalNAcI. Generalmente, la ST6GalNAcI se selecciona del grupo que consiste en ST6GalNAcI humana, de chimpancé, de orangután, de cerdo, de vaca, de rata, de perro, de ratón y de pollo (Kurosawa et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:1402-1409; Skretas et al., 2009, *Microbial cell factories*, 8:50; documento WO 2005/121332). En una realización muy preferida, la ST6GalNAcI es una ST6GalNAcI de pollo que es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. Preferiblemente, el polipéptido de ST6GalNAcI es codificado por la secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6, respectivamente.

B. Sistema de expresión

25 Según la presente invención, el polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI se expresa en una célula CHO. El procedimiento concreto empleado para introducir el respectivo material genético en la célula hospedante para la expresión de la sialiltransferasa soluble no es particularmente crítico. Tal como entenderán los expertos en la técnica, la elección del promotor, así como los métodos y las estrategias para introducir material genético en la célula hospedante empleada para expresar un polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI son muy conocidos en la técnica.

30 Estos incluyen el uso de vectores plasmídicos, vectores víricos y cualquier otro método conocido para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula hospedante. Solo es necesario que el procedimiento de modificación genética concreto empleado sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula hospedante que es capaz de expresar la sialiltransferasa truncada o modificada genéticamente o de longitud completa.

35 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede emplearse para transportar el ácido nucleico aislado hacia el interior de una célula. En la técnica se conocen diversos tipos de vectores que incluyen, pero no se limitan a ácidos nucleicos lineales, ácidos nucleicos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Así, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus genéticamente modificado. También debe considerarse que el término incluye compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de un ácido nucleico hacia el interior de una célula, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares.

40 Los vectores adecuados incluyen los vectores pSV40, pEF-1- α , pSV2, pT-Rex, pSecTag2, pBudCE4.1, o pcDNA/His Max, junto con, por ejemplo, un promotor de CMV. En una realización preferida de la presente invención, se emplea el vector pMOZ-G8 que se diseña para un alto nivel de expresión de un gen heterólogo, para la expresión del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI. Los marcadores de selección adecuados son, entre otros, la neomicina, puromicina, higromicina y dihidrofolato reductasa (DHFR).

C. Cultivo de células CHO

45 Según una realización de la presente invención, la etapa a) del método de producción se realiza empleando un cultivo de alimentación discontinua sin suero y empleando un desplazamiento de la temperatura de incubación de 37 °C +/- 1 °C a 32 °C +/- 1 °C después de alcanzar una densidad celular predefinida de $\geq 5 \times 10^5$ células viables/ml, preferiblemente $\geq 1,5 \times 10^6$ células viables/ml.

55 El polipéptido de sialiltransferasa se produce en un cultivo de alimentación discontinua sin suero empleando una línea celular derivada de CHO modificada para que sobreexpresa ST6GalNAcI. El inóculo para el proceso de fermentación se cultiva a partir de un vial del banco de células maestro (MCB) empleando matraces T o matraces de agitación, seguido de un cultivo en un biorreactor de siembra. El inóculo después se traslada al biorreactor de producción, en el que se produce una posterior expansión de las células hasta que la densidad celular alcanza un nivel apropiado para la producción.

El desplazamiento de la temperatura se inicia a una densidad celular definida, y el nivel de glucosa se mantiene dentro de un intervalo definido mediante la introducción de una disolución de glucosa. Al final del cultivo se recolecta el cultivo. Las células y los residuos en el cultivo se retiran de la recolección mediante filtración en profundidad. La recolección se conserva a 2-8 °C hasta el inicio de la purificación de las proteínas.

- 5 La figura 1 ilustra las diferentes etapas de cultivo celular y recolección de una realización preferida de la presente invención.

D. Purificación de la sialiltransferasa

Según otro aspecto de la presente invención, la purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI del medio de cultivo se realiza sometiendo el medio de cultivo a dos etapas de cromatografía de afinidad o a una etapa de cromatografía de afinidad y una etapa de cromatografía de modo mixto, y una etapa de cromatografía de intercambio aniónico y de intercambio catiónico.

En una realización preferida, la purificación se logra en el siguiente orden:

- 15 i. una cromatografía de intercambio aniónico, que concentra la disolución que contiene la enzima y proporciona una primera reducción de los contaminantes, tales como ADN, proteínas de la célula hospedante (HCP) y compuestos del medio de fermentación;
- ii. una primera cromatografía de afinidad, que se emplea como una etapa de purificación intermedia para enriquecer la enzima sialiltransferasa y disminuir las proteínas de la célula hospedante;
- iii. una segunda cromatografía de afinidad o una cromatografía de modo mixto, que se emplea para reducir de modo eficaz el nivel de proteínas de la célula hospedante; y
- 20 iv. una cromatografía de intercambio catiónico, que se emplea para eliminar cualquier proteína de la célula hospedante residual y otros contaminantes.

La figura 2 ilustra las diferentes etapas de purificación de una realización preferida de la presente invención.

I. Etapa de cromatografía de intercambio aniónico

Según la presente invención, el proceso de purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI incluye una etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEC). La AEC se basa en las interacciones entre las cargas de las proteínas en la muestra y las cargas inmovilizadas sobre la resina. En la cromatografía de intercambio aniónico, los iones de unión de las proteínas son negativos, y el grupo funcional inmovilizado sobre la resina es positivo. Las resinas de intercambio aniónico que se emplean habitualmente son resinas Q, una amina cuaternaria, y resina DEAE (DiEtilAminoEtano). Sin embargo, en general, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse con cualquier membrana o resina de intercambio aniónico habitual disponible en el mercado. Las resinas de intercambio aniónico pueden emplearse en forma de columnas precargadas. Como alternativa, las columnas pueden prepararse personalmente. No existen limitaciones específicas con respecto a la capacidad y a la geometría de las columnas distintas de las habituales. Los expertos en la técnica saben que la cantidad de resina de intercambio aniónico utilizada depende del contenido global en proteínas del fluido del cultivo celular o cualquiera otro fluido, por ejemplo, el eluato de una etapa de cromatografía previa, que se aplica a la columna en la etapa de captura.

Las resinas de intercambio aniónico fuertes típicas que pueden emplearse para los objetivos de la invención comprenden grupos funcionales tales como restos aminoetilo cuaternario (QAE), restos amonio cuaternario (Q), y grupos trimetilamonioetilo (TMAE).

40 Las resinas que incluyen restos aminoetilo cuaternario (QAE) incluyen, por ejemplo, Toyopearl QAE (disponible en Tosoh Bioscience, Alemania), Selectacel QAE (un derivado de aminoetilo cuaternario de la celulosa, disponible en Polysciences Inc., Pensilvania, EEUU) y otros. Las resinas que tienen restos amonio cuaternario (Q) incluyen, por ejemplo, Q Sepharose XL, Q Sepharose FF, Q Sepharose HP, Resource Q (disponibles en GE Healthcare, Alemania), Macro Prep High Q (Bio-Rad, California, EEUU), Toyopearl Super Q (disponible en Tosoh Bioscience, Alemania) y UNOsphere Q (disponible en Bio-Rad, California, EEUU). Las resinas que tienen grupo trimetilamonioetilo (TMAE) incluyen, por ejemplo, Fractogel EMD TMAE (disponible en Merck, Alemania).

50 La cromatografía de intercambio aniónico es preferiblemente una cromatografía de intercambio aniónico fuerte que se realiza empleando una resina de intercambio aniónico fuerte que tiene grupos funcionales $-N^+(CH_3)_3$, o una resina que tenga características similares. Los ejemplos preferidos de resinas de intercambio aniónico fuerte que pueden emplearse para el objetivo de la invención son resinas de intercambio aniónico fuertes de amonio cuaternario conocidas en la técnica como UNOsphere Q, Q Sepharose HP, Q Sepharose FF y otras resinas que tienen restos amonio cuaternario (Q). En una realización muy preferida de la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza con una resina Q-Sepharose Fast Flow disponible en el mercado.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza preferiblemente empleando tampones que tienen un pH ligeramente alcalino. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, tampón borato, trietanolamina/ácido iminodiacético, Tris, acetato de amonio, tricina, bicina, TES, HEPES, TAPS. Se prefiere el uso de un tampón Tris. La elución de la resina de intercambio aniónico habitualmente se logra aumentando la conductividad de la fase móvil mediante la adición de una sal, preferiblemente cloruro de sodio. Preferiblemente, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza empleando un tampón NaCl/Tris-HCl como eluyente a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0.

II. Etapa de la primera cromatografía de afinidad

Según la presente invención, el proceso de purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcl incluye una etapa de cromatografía de afinidad que preferiblemente es una cromatografía de afinidad de tinte.

La cromatografía de afinidad de tinte se basa en la alta afinidad de los tintes inmovilizados por los sitios de unión sobre las proteínas de la muestra. La etapa de la cromatografía de afinidad de tinte se realiza empleando una resina que tiene, como ligando inmovilizado, un compuesto de tinte que es conocido por los expertos en la técnica, concretamente Cibacron Blue F3G-A. Los expertos en la técnica entienden el término "inmovilizado" y significa que el ligando se derivatiza en el sentido de que se une químicamente a la resina. Una resina particularmente preferida es Blue Sepharose FF (que puede obtenerse en Amersham Biosciences Inc.).

Se entiende que el método puede realizarse con otras resinas que tengan características similares. Los ejemplos de otras resinas incluyen Toyopearl AF-blue-HC-650M (Tosoh Bioscience), Toyopearl SuperButyl 550, Toyopearl Phenyl 650, Blue Cellthru BigBead (Sterogene), SwellGel Blue (Pierce), Cibachrome blue 3GA-agarose 100 (Sigma), Affi-Gel Blue (BioRad), cartuchos azules de Econo-Pac (Bio-Rad), Blue Sepharose HP (Amersham), Cibacron Blue 3GA (Sigma), Blue Sepharose 6FF (GE Healthcare), ProSep PB (Millipore), Methyl Sepharose y CDP Sepharose (Calbiochem).

La etapa de la cromatografía de afinidad de tinte se realiza preferiblemente empleando tampones que tienen un pH ligeramente alcalino. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES. En una realización muy preferida, la cromatografía de afinidad de tinte se realiza empleando un tampón de clorhidrato de L-arginina/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0 como eluyente.

III. Etapa de la segunda cromatografía de afinidad o cromatografía de modo mixto

Según una realización de la presente invención, el proceso de purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcl incluye una etapa de cromatografía de afinidad, según se ha definido en el capítulo II previo, o una cromatografía de modo mixto, preferiblemente una cromatografía de hidroxapatito.

La cromatografía de hidroxapatito es una cromatografía de modo mixto que emplea un fosfato de calcio hidroxilado insoluble $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que forma la matriz y el ligando. Los grupos funcionales consisten en parejas de iones de calcio con carga positiva (sitios C) y agrupaciones de grupos fosfato con carga negativa (sitios P). Las interacciones entre el hidroxapatito y las proteínas son complejas y multimodales. En un método de la interacción, los grupos amino con carga positiva sobre las proteínas se asocian con los sitios P con carga negativa y los grupos carboxilo con carga negativa sobre la proteína interaccionan mediante complejación de coordinación con los sitios C (Shepard (2000), *J. of Chromatography*, 891:93-98).

El hidroxapatito cristalino fue el primer tipo de hidroxapatito empleado en cromatografía. La cromatografía de hidroxapatito cerámico es un desarrollo posterior de la cromatografía de hidroxapatito. El hidroxapatito cerámico se refiere a una forma de hidroxapatito en la que los nanocristales se aglomeran en partículas y se fusionan a una temperatura elevada para crear microesferas cerámicas estables adecuadas para aplicaciones de cromatografía. Los ejemplos comerciales de hidroxapatito cerámico incluyen, pero no se limitan a CHT de tipo I y CHT de tipo II.

El hidroxapatito cerámico tiene una alta durabilidad, una buena capacidad de unión a proteínas, y puede emplearse a mayores caudales y presiones que el hidroxapatito cristalino (Vola et al. (1993), *BioTechniques*, 14:650-655). El hidroxapatito se ha empleado en la separación cromatográfica de proteínas, ácidos nucleicos, así como anticuerpos. En la cromatografía de hidroxapatito, la columna normalmente se equilibra y la muestra se aplica en una concentración baja de tampón fosfato, y las proteínas adsorbidas después se eluyen en un gradiente de concentración de tampón fosfato (Giovannini (2000), *Biotechnology and Bioengineering*, 73:522-529).

Puede utilizarse cualquier resina de hidroxapatito para realizar la etapa de la segunda cromatografía de afinidad del método según la invención. En una realización preferida se realiza en una resina de hidroxapatito cerámico, tal como una resina de hidroxapatito de tipo I o de tipo II. La resina de hidroxapatito puede tener partículas de cualquier tamaño, tal como de 20, 40 u 80 μm . En una realización muy preferida, la resina de hidroxapatito cerámico comprende partículas que tienen un tamaño de 40 μm . Una resina de hidroxapatito que es particularmente adecuada es una columna disponible en el mercado con el nombre de hidroxapatito cerámico CHT de tipo I, 40 μm .

En una realización muy preferida de la presente invención, la cromatografía de afinidad de hidroxapatito se realiza empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 6,3 y 7,3 como eluyente.

IV. Etapa de cromatografía de intercambio catiónico

Según la presente invención, el proceso de purificación del polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAc1 incluye una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (CEC).

5 La CEC se basa en las interacciones entre las cargas de las proteínas en la muestra y las cargas inmovilizadas sobre la resina. En la cromatografía de intercambio catiónico, los iones de unión de las proteínas son positivos y el grupo funcional inmovilizado es negativo. Las resinas de intercambio catiónico que se emplean habitualmente son la resina S, derivados de sulfato, y resinas CM (carboximetilo), con iones derivados carboxilados.

10 Sin embargo, en general, la etapa de cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse con todas las membranas o resinas de intercambio catiónico disponibles en el mercado habituales. Las resinas de intercambio catiónico pueden utilizarse en forma de membranas o columnas precargadas sobre las cuales se fija el grupo funcional, por ejemplo, ácido sulfónico. Como alternativa, las columnas pueden prepararse personalmente. No existen limitaciones específicas con respecto a la capacidad y a la geometría de las columnas distintas de las habituales. Los expertos en la técnica saben que la cantidad de resina de intercambio catiónico utilizada depende del contenido global en proteínas del fluido del cultivo celular o cualquiera otro fluido, por ejemplo, el eluato de una
15 etapa de cromatografía previa.

Están disponibles diferentes tipos de materiales de intercambio catiónico bajo diferentes nombres y de una multitud de suministradores, tales como Bio-Rex® (por ejemplo, tipo 70), Chelex® (por ejemplo, tipo 100), Macro-Prep® (por ejemplo, tipo CM, High S, 25 S), AG® (por ejemplo, tipo 50W, MP) (todas disponibles en BioRad Laboratories); WCX 2 (disponible en Ciphergen), Dowex® MAC-3 (disponible en Dow Chemical Company), Mustang C y Mustang S (disponibles en Pall Corporation), Cellulose CM (por ejemplo, tipo 23, 52), Hyper-D, Partisphere (disponible en Whatman plc.), Amberlite® IRC (por ejemplo, tipo 76, 747, 748), Amberlite® GT 73, Toyopearl® (por ejemplo, tipo SP, CM, 650M) (todas disponibles en Tosoh Bioscience GmbH), CM 1500 y CM 3000 (disponibles en BioChrom Labs), SP-Sepharose™, CM-Sepharose™ (disponibles en GE Healthcare), resinas porosas (disponibles en PerSeptive Biosystems), Asahipak ES (por ejemplo, tipo 502C), CXpak P, IEC CM (por ejemplo, tipo 825, 2825, 5025, LG), IEC SP (por ejemplo, tipo 420N, 825), IEC QA (por ejemplo, tipo LG, 825) (disponibles en Shoko America Inc.), resina de intercambio catiónico 50W (disponible en Eichrom Technologies Inc.). Preferiblemente, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico fuerte, tal como Macro-Prep® High S o 25S, MacroCap SP, Toyopearl® SP 650M, Source S, SP Sepharose, o POLYCAT A.

20 En una realización preferida de la presente invención, la etapa de intercambio catiónico se realiza con una resina que contiene un material de intercambio catiónico de sulfopropilo o una resina que tenga características similares. En una realización muy preferida de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza con una resina SP-Sepharose High Performance disponible en el mercado.

35 La etapa de la cromatografía de intercambio catiónico se realiza preferiblemente empleando un tampón que tenga un pH ligeramente ácido. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, ácido maleico, ácido malónico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido butanandioico, ácido acético, fosfato, HEPES y BICINE. Se prefiere el uso de un tampón fosfato. La elución de la resina de intercambio catiónico habitualmente se logra aumentando la conductividad de la fase móvil mediante la adición de una sal, preferiblemente cloruro de sodio. Preferiblemente, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio a un pH en el intervalo entre 6,0 y 7,0 como eluyente.

40 V. Otras etapas de purificación

Además, el método puede comprender etapas de filtración. Los procesos de filtración son muy conocidos por los expertos en la técnica y pueden emplearse todos los métodos conocidos. El método puede comprender uno o más procesos de ultrafiltración en diversas etapas del método. El método puede comprender nanofiltración, por ejemplo, para la eliminación final de los virus.

45 La ultrafiltración es una forma de filtración con membrana en la que la presión hidrostática empuja a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. La ultrafiltración es un método de separación que se emplea habitualmente para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares, en especial disoluciones de proteínas. La ultrafiltración es similar a la nanofiltración, pero se diferencia en términos del tamaño de las moléculas que retiene. En el marco de la presente invención, se prefiere un límite de exclusión de peso molecular de 10 kDa (10 kDa UF). Las membranas UF también pueden emplearse para la diafiltración para eliminar sales y otras microespecies de la disolución mediante una dilución y concentración repetidas o continuas.

55 Preferiblemente, el proceso de purificación comprende una o más etapas de ultrafiltración/diafiltración. Estas etapas de filtración pueden realizarse antes, entre y/o después de las etapas de cromatografía. Preferiblemente, se realiza una etapa de diafiltración entre las etapas de cromatografía, por ejemplo, entre la etapa de cromatografía de modo mixto y la etapa de cromatografía de intercambio catiónico, y se realiza una etapa de ultrafiltración/diafiltración después de las etapas de cromatografía. Estas etapas de filtración pueden realizarse empleando dispositivos de

filtración disponibles en el mercado, por ejemplo, disponibles en GE Healthcare o Sartorius. La ultrafiltración se realiza preferiblemente empleando los módulos Sartocon y los módulos Sartocon Slice suministrados por Sartorius.

E. Polipéptido de sialiltransferasa producido

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona polipéptidos de sialiltransferasa producidos mediante cualquiera de los métodos según la invención.

10 En una realización, el polipéptido de sialiltransferasa es un polipéptido de sialiltransferasa truncado que carece del dominio de señal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, del dominio transmembrana de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este, y/o del dominio troncal de la sialiltransferasa completo, o de una porción de este. En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de sialiltransferasa solo comprende el dominio activo de la sialiltransferasa, y dicho polipéptido es soluble. La sialiltransferasa es ST6GalNAcI, preferiblemente de pollo, lo más preferiblemente la sialiltransferasa es la proteína según SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6.

15 Los polipéptidos de la sialiltransferasa ST6GalNAcI producidos según los métodos de la presente invención tienen varias ventajas frente a los polipéptidos de sialiltransferasa de la técnica anterior. Los métodos de producción nuevos y mejorados de la presente invención proporcionan polipéptidos de la sialiltransferasa ST6GalNAcI que son muy activos, están purificados hasta una calidad farmacéutica, y pueden producirse a gran escala.

20 El término "puro" se refiere a un polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI que está sustancial o fundamentalmente exento de los componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla empleada para preparar el polipéptido, por ejemplo, ADN o proteínas de la célula hospedante. Generalmente, el polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI producido mediante el método de la presente invención es al menos 98% puro, preferiblemente al menos 99% puro. La pureza se determina mediante cualquier método de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, la intensidad de las bandas en un gel teñido con plata, una electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC, RP-HPLC, ELISA o un medio similar).

25 El término "activo" se refiere a la actividad específica de un polipéptido de la sialiltransferasa ST6GalNAcI producido mediante el método de la presente invención, lo cual significa la actividad catalítica de la sialiltransferasa, que consiste en transferir un resto ácido siálico desde una molécula donante a una molécula aceptora.

30 La actividad catalítica de ST6GalNAcI se refiere a la transferencia de un resto ácido siálico desde CMP-ácido siálico con un enlace α 2,6 hasta un resto *N*-acetilgalosamina (GalNAc) O-enlazado al aminoácido treonina/serina de una glicoproteína. La actividad específica puede expresarse en unidades de actividad. Tal como se emplea en la presente, una unidad de actividad cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto a un valor de pH, temperatura y aceptor-sustrato concretos. En la presente invención, la actividad específica de ST6GalNAcI está en un intervalo entre 5 U/mg y 10 U/mg, preferiblemente de 6 U/mg a 9 U/mg, lo más preferiblemente de 7 U/mg a 8 U/mg.

35 La actividad sialiltransferasa puede determinarse mediante métodos conocidos. Estos métodos incluyen un ensayo de fluorescencia, ensayos basados en RP-HPLC y estrategias radiactivas (Spiegel et al., 1992, *J Chromatogr.*, 573(1):23-7; Gross et al., 1990, *Anal Biochem.*, 186(1):127-34; Skretas et al., 2009, *Microbial cell factories*, 8:50).

F. Uso de las sialiltransferasas

40 En otro aspecto, la presente descripción incluye el uso de ST6GalNAcI producida mediante el método según la invención para la glicosilación de proteínas terapéuticas, en particular para la glico-PEGilación de G-CSF, eritropoyetina, IFN, hGH, FSH o insulina humanas o anticuerpos.

La glicosiltransferasa ST6GalNAcI es un reactivo fundamental para la glicosilación de proteínas terapéuticas. Además, la ST6GalNAcI es un importante reactivo para la investigación y el desarrollo de glicopéptidos importantes desde el punto de vista terapéutico y productos terapéuticos de oligosacáridos.

45 Las enzimas sialiltransferasas ST6GalNAcI modificadas son útiles para la preparación *in vivo* e *in vitro* de péptidos glicosilados, así como para la producción de oligosacáridos que contienen los restos glicosilo específicos que pueden ser transferidos por las enzimas glicosiltransferasas modificadas. Las formas modificadas de los polipéptidos de la ST6GalNAcI pueden poseer actividades biológicas comparables, y en algunos casos mayores, a la de sus polipéptidos homólogos de longitud completa.

50 El término "glicosilación", tal como se emplea en la presente, se refiere a una conjugación enzimáticamente mediada de una especie de azúcar modificado con un resto aminoácido o glicosilo de un polipéptido, por ejemplo, un péptido de eritropoyetina, por la sialiltransferasa preparada mediante el método de la presente invención. Los subgéneros de la glicosilación son la "glicoconjugación" y la "glico-PEGilación", en los que el grupo modificador del azúcar modificado es polietilenglicol, o uno de sus derivados de alquilo (por ejemplo, m-PEG) o de sus derivados reactivos (por ejemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG).

Una "proteína terapéutica", tal como se emplea en la presente, se refiere a una proteína, un péptido, una glicoproteína o un glicopéptido que se administra a un sujeto para tratar una enfermedad o una disfunción o para mejorar la salud del sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida, la proteína terapéutica es una proteína humana. En otra realización, la proteína terapéutica es glicosilada o modificada de otro modo por una o más glicosiltransferasas producidas en células CHO.

El G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) es un factor del crecimiento hematopoyético que estimula la proliferación y la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas y la activación de neutrófilos maduros. El G-CSF es capaz de apoyar la proliferación de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. La forma humana del G-CSF ha sido clonada por grupos de Japón y EEUU en 1986 (véase, por ejemplo, Nagata et al., 1986, Nature, 319:415-418). La glicoproteína humana natural existe en dos formas, una que tiene 174 aminoácidos y la otra que tiene 177 aminoácidos. La forma de 174 aminoácidos más abundante y más activa se ha empleado para el desarrollo de productos farmacéuticos mediante la tecnología del ADN recombinante.

Los siguientes ejemplos se refieren a la producción y la purificación de un polipéptido de ST6GalNAcl de pollo truncado, y se proporcionan solo para ilustrar más a fondo el método de la invención. No debe interpretarse que el alcance de la invención consista simplemente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1. Construcción del módulo de expresión

Se generó un módulo de expresión para la expresión de un polipéptido de ST6GalNAcl que consiste en la glicosiltransferasa de pollo (α -N-acetil-nueraminil-2,3- β -galactosil-1,3-N-acetilgalactosaminida alfa-2,6-sialiltransferasa I) truncada en el N-terminal en el aminoácido K232, a la cual se han unido 8 aminoácidos de una secuencia intermedia en el N-terminal. La secuencia de aminoácidos completa empleada para la expresión (SEQ ID NO:6) se muestra en la figura 3.

Para añadir una señal de inicio de la traducción y para aumentar la tasa de expresión, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de ST6GalNAcl truncado se introdujo en un módulo de expresión de eritropoyetina (EPO) humana genómica para reemplazar a las secuencias codificadoras de EPO.

En conjunto, la unidad de transcripción de ST6GalNAcl se diseñó para que contuviese los siguientes elementos:

- una secuencia señal de EPO (que consiste en el exón 1 [que codifica 4 aminoácidos], el intrón 1 y una porción del exón 2 [que codifica 27 aminoácidos: MGVHECPAWLWLLLSLLSL PLGLPVLG] de la eritropoyetina humana);
- ST6GalNAcl y una secuencia de nucleótidos de una secuencia intermedia (SEQ ID NO:5);
- 3'-UTR de la eritropoyetina humana, 285 pb;
- un conector de 45 pb con un sitio 5'-Not I; el sitio 3'-MunI es una parte integral de la secuencia de SV40.

Basándose en la secuencia de aminoácidos presentada en la figura 3, la secuencia de nucleótidos de la ST6GalNAcl madura se optimizó para la utilización de codones en CHO; los nucleótidos derivados de la secuencia de EPO genómica no se adaptaron y se corresponden con los de la secuencia de eritropoyetina humana natural. El módulo de expresión resultante se abrevia como EcST6. La secuencia de nucleótidos de EcST6 fue confirmada mediante secuenciación (SEQ ID NO:7). La congruencia de la secuencia fue del 100%.

2. Construcción del vector de expresión

El fragmento de EcST6 sintético se clonó como un fragmento Not I/Mnu I en el vector de expresión pMOZ-G8.

Este vector se basa en un esqueleto de pSV2 que contiene la unidad de expresión de β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina y el origen de la replicación de pBR322 como elementos procariotas, y el marcador de selección eucariota de la dihidrofolato reductasa (DHFR) dirigido por un promotor de gen temprano de SV40 y la correspondiente 3'-UTR de SV40. El marcador de selección de DHFR de ratón original fue modificado mediante una fusión parcial con un gen DHFR de CHO para obtener un híbrido recombinante de DHFR (DHRFec), que muestra una afinidad 10 veces inferior al agente selectivo metotrexato (MTX). Las células transfectadas con el marcador de selección DHRFec pueden seleccionarse con cantidades mayores de MTX para, en primer lugar, bloquear la DHFR endógena, que está presente en la línea celular progenitora CHOSI CHO DHFR, y para enriquecer en células genéticamente alteradas que portan el plásmido derivado de DHRFec. La expresión génica está bajo el control de un promotor de mCMV fuerte. Cadena abajo del promotor de mCMV está el sitio de clonación múltiple (MCS) y un intrón de β -globina de conejo, así como una 3'-UTR que permite la expresión eficaz de transcripciones de ADNc.

La inserción del módulo en el vector pMOZ-G8 se verificó mediante PCR.

Células de *E. coli* fueron transformadas con el plásmido de expresión pMO7-G8EcST6. Se realizó una selección de las colonias de los diferentes transformantes y se preparó el ADN plasmídico a partir de un clon seleccionado. Para

confirmar la identidad de pMO7-G8 EcST6, la secuencia de nucleótidos completa se verificó mediante secuenciación de ADN.

3. Línea de células CHO

5 Para la expresión de la forma segregada de la ST6GalNAcI de pollo, se empleó una línea de células de ovario de hámster chino. La línea celular parental empleada para la producción de ST6GalNAcI es un derivado de CHOSI 4, una línea de células de ovario de hámster chino deficiente en actividad dihidrofolato reductasa (dhfr) (CHO dhfr-), que ha sido adaptada para crecer en un medio sin suero ni proteínas.

Resumen de la línea de células hospedantes CHOSI 4:

10 - La línea de células hospedantes CHOSI 4 se deriva de CHO dhfr- (ATCC n.º CRL-9096, ACC126 de DSMZ, Braunschweig, Alemania).

- La línea de células hospedantes CHOSI 4 ha sido adaptada para crecer en un medio sin suero ni proteínas, químicamente definido, mediante un cultivo a largo plazo en medio MAM-PF2.

- La morfología de CHOSI 4 es de forma redonda. El cultivo crece como una suspensión de una única célula.

15 - CHOSI 4 está adaptada para el crecimiento en un medio MAM-PF químicamente definido, sin componentes animales, que no contiene suero, proteínas, péptidos ni hidrolizados. No obstante, la línea celular puede cultivarse en otros medios sin suero disponibles en el mercado.

20 - CHOSI 4 se subcultiva en una proporción de división total de 1:50 por semana. Las células se dividen primero 1:20 en un matraz nuevo y después de 4 días se obtiene 3/2 del volumen inicial de medio fresco. CHOSI 4 muestra una velocidad de crecimiento específica de más de uno por día ($D > 1 \times d^{-1}$) y unas densidades celulares en sistemas de cultivo agitados de 2×10^6 células/ml en modo discontinuo y 1×10^7 células/ml en modo de alimentación discontinua.

- La adición de factores de unión o de suero de ternera fetal al medio de cultivo celular conduce a un cambio en la morfología de las células, y las células CHOSI 4 revierten para formar una capa epitelial.

4. Cultivo y recolección de las células

Descongelación de las células y expansión del inóculo en matraces T y matraces de agitación

25 Un único vial de MCB se retiró de la conservación en la fase de vapor del nitrógeno líquido y se calentó en un baño de agua a 37 ± 1 °C. Las células se recolectaron mediante una centrifugación en un matraz T que contiene medio de cultivo precalentado fresco. Se logró una posterior expansión del inóculo mediante unas etapas de dilución y subcultivo en matraces de agitación con volúmenes crecientes de medio de cultivo hasta un volumen final que era adecuado para su uso como siembra en el biorreactor.

30 *Expansión celular en el biorreactor de siembra*

Después de la expansión celular en los matraces de agitación, el inóculo se trasladó al biorreactor de siembra y el volumen se expandió con medio fresco hasta un volumen de trabajo final de 10 l. Las células se cultivaron en el biorreactor de siembra durante 3 días hasta que se hubo alcanzado el número de células adecuado para el inóculo en el biorreactor de producción.

35 *Cultivo en el biorreactor de producción*

40 Después del crecimiento en el biorreactor de siembra, el contenido del biorreactor de siembra se trasladó asépticamente al biorreactor de producción y el cultivo trasladado se expandió hasta el volumen de trabajo final con medio de cultivo fresco. Después de alcanzar una densidad celular predefinida de $\geq 1,5 \times 10^6$ células viables/ml, la temperatura de incubación disminuyó de $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ hasta $32 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$. El nivel de glucosa se mantuvo dentro de un intervalo definido mediante la introducción de una disolución de glucosa a una concentración de entre 4 g/l y 8 g/l. El proceso de fermentación se terminó 14-17 días después del inicio del cultivo en el biorreactor de producción.

Recolección y conservación

45 La suspensión celular del biorreactor de producción se separó de las células y los restos mediante filtración en profundidad de la recolección en bolsas estériles desechables después de que terminase la fermentación. Se empleó un filtro de profundidad desechable para la filtración de la recolección. La recolección se conservó a 2-8 °C hasta el posterior procesamiento corriente abajo.

5. Purificación

Purificación - Ejemplo 1

5 El proceso de purificación de ST6GalNAc comenzó con la etapa de cromatografía de captura empleando una columna de intercambio aniónico. Las posteriores etapas de purificación incluyen una cromatografía de afinidad, una cromatografía de modo mixto, una ultra-/diafiltración, una cromatografía de intercambio catiónico y una nanofiltración final a través de una membrana Planova® de 15 nm. Las etapas cromatográficas se realizaron empleando sistemas de cromatografía en gradiente y se realizaron de modo automático. Se registró la absorción de UV, la conductividad, el pH, el caudal y la contrapresión en cada etapa cromatográfica con un software adecuado.

En la tabla 1 se presentan los tipos de columna y las resinas utilizadas.

Etapa	Tipo de columna	Tipo de resina	Dimensiones del gel (D x A) [mm]
Cromatografía de intercambio aniónico	Columna de vidrio de borosilicato BPG	Q-Sepharose Fast Flow	200 x 205
Cromatografía de afinidad	Columna de vidrio de borosilicato BPG	Blue Sepharose 6-Fast Flow	140 x 110
Cromatografía de modo mixto	Columna de vidrio de borosilicato BPG	Hidroxiapatito de tipo I 40 µm	100 x 250
Cromatografía de intercambio catiónico	Columna de vidrio de borosilicato BPG	SP-Sepharose High Performance	100 x 150

1ª columna: Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

10 Se empleó una cromatografía de intercambio aniónico con la resina Q-Sepharose Fast Flow como la primera etapa cromatográfica para capturar la ST6GalNAc en la recolección y para la reducción del volumen.

La ST6GalNAc se eluyó aplicando una etapa salina de NaCl 800 mM en Tris HCl 20 mM, pH 7,6. El eluato se recogió basándose en el perfil de absorción de UV.

En la tabla 2 se resumen las condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condiciones
Resina	Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences/GE-Healthcare)
Diámetro de la columna	200 mm
Altura del lecho	205 mm +/- 15 mm
Placas teóricas	> 2.200 N/m
Factor de asimetría	0,8-1,5
Tampón de equilibrio	Tris 20 mM, pH 7,6
Tampón de elución	NaCl 800 mM en Tris HCl 20 mM, pH 7,6
Criterio de reunión	Inicio: DO 280 > 0,04 AU; Final: 0,6 CV después del inicio

15 2ª columna: Cromatografía de afinidad (Blue Sepharose 6 FF)

20 Blue Sepharose 6FF es una resina de agarosa unida covalentemente al tinte Cibacron Blue® y se emplea para unir preferentemente la ST6GalNAc en presencia de los contaminantes contenidos en el eluato de Q-Sepharose. La ST6GalNAc eluye con clorhidrato de L-arginina 500 mM en tampón fosfato de potasio 25 mM, pH 7,5. El eluato se recogió basándose en el perfil de absorción de UV.

En la tabla 3 se resumen las condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condiciones
Resina	Blue Sepharose FF (Amersham Biosciences/GE-Healthcare)

Parámetro	Condiciones
Diámetro de la columna	140 mm
Altura del lecho	110 mm +/- 20 mm
Placas teóricas	> 2.778 N/m
Factor de asimetría	0,8-1,5
Tampón de equilibrio	tampón fosfato de potasio 25 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM
Tampón de elución	clorhidrato de L-arginina 500 mM, fosfato de potasio 25 mM, pH 7,5
Criterio de reunión	Inicio: DO > 0,010 AU; Final: DO > 0,05 AU

3ª columna: Cromatografía de modo mixto (hidroxiapatito)

5 Se empleó una cromatografía de modo mixto sobre una resina de hidroxiapatito como etapa intermedia para reducir aún más los niveles de HCP y ADN. La ST6GalNAcl eluyó con NaCl 1,0 M en tampón fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8. El eluato se recogió basándose en el perfil de absorción de UV.

En la tabla 4 se resumen las condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condiciones
Resina	hidroxiapatito CHT de tipo I, 40 µm (BioRad)
Diámetro de la columna	100 mm
Altura del lecho	250 mm +/- 20 mm
Placas teóricas	> 4.760 N/m
Factor de asimetría	0,8-2,3
Tampón de equilibrio	tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 6,8
Tampón de elución	tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 6,8, NaCl 1 M
Criterio de reunión	Inicio: DO > 0,050 AU; Final: 1,34 CV

Ultrafiltración/diafiltración

10 El eluato de hidroxiapatito se diafiltró empleando un módulo de corte Sartocón con un límite de exclusión de peso molecular (MWCO) de 30 kDa. La filtración de flujo tangencial se realizó para desalar y concentrar el producto, y por último para intercambiar el tampón a tampón fosfato de potasio 25 mM a pH 6,0.

4ª columna: Cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose)

15 Se empleó una cromatografía de intercambio catiónico como etapa de acabado final para eliminar cualquier HCP residual remanente posible. Bajo las condiciones específicas aplicadas, la ST6GalNAcl eluyó con NaCl 250 mM en tampón fosfato de potasio 25 mM, pH 6,8.

En la tabla 5 se resumen las condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condiciones
Resina	SP-Sepharose High Performance
Diámetro de la columna	100 mm
Altura del lecho	150 mm +/- 20 mm
Placas teóricas	> 7.353 N/m

Parámetro	Condiciones
Factor de asimetría	0,8-1,5
Tampón de equilibrio	tampón fosfato de potasio 25 mM, pH 6,0
Tampón de elución	cloruro de sodio 250 mM, fosfato de potasio 25 mM, pH 6,0
Criterio de reunión	Inicio: DO > 0,050 AU; Final: OD < 0,200 AU + 0,6 CV

Ultrafiltración/diafiltración y formulación

5 El eluato de SP-Sepharose se diafiltró en un módulo de corte Sartocón con un MWCO de 30 kDa. La filtración de flujo tangencial se realizó para desalar y concentrar el producto, y para intercambiar el tampón a BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 100 mM, sorbitol al 5%.

Después de completar la diafiltración se añadió Tween 80 hasta una concentración final de 0,003%.

Purificación - Ejemplo 2

1ª columna: Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

10 Esta etapa del proceso se empleó para capturar el cST6 mediante una cromatografía de intercambio aniónico a partir de la recolección del biorreactor aclarada y esterilizada mediante filtración. Se diluyeron 1000 ml del sobrenadante del biorreactor 1:3 en el tampón A (Tris 20 mM, pH 7,6) y se cargaron sobre una columna Omni 25/150 Q Sepharose FF. El cST6 eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-1 M, 20 CV).

2ª columna: Cromatografía de afinidad (matriz de afinidad CDP)

15 Esta etapa del proceso de una cromatografía de afinidad es una etapa intermedia que es importante para aumentar la pureza de cST6. La reunión de las fracciones 9-11 de la etapa de captura de Q Sepharose se diluyó 1:3 en tampón A (MES 10 mM, pH 6,8, glicerol al 25%) y se cargó sobre una columna de afinidad XK 10/55 CDP. Para evitar sobrecargar la columna CDP, la carga se aplicó en dos ensayos CDP idénticos. El cST6 eluyó mediante un gradiente lineal de NaCl (0-1 M, 10 CV).

3ª columna: Cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q Sepharose)

20 Esta cromatografía de intercambio aniónico se empleó como etapa de acabado final. La reunión de las fracciones de cST6 de la etapa intermedia de CDP se diluyó 1:10 en tampón A (Tris 20 mM, pH 7,6) y se cargó sobre una columna Mono Q HR 10/10. El cST6 eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0,6 M, 5 CV).

Purificación - Ejemplo 3

1ª columna: Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

25 Se empleó una cromatografía de intercambio aniónico con la resina Q-Sepharose Fast Flow como la primera etapa cromatográfica para capturar la ST6GalNAc en la recolección y para la reducción del volumen. Se purificaron 300 ml del sobrenadante filtrado, aclarado y estéril del biorreactor de cultivo de alimentación discontinua.

Las condiciones cromatográficas se resumen en la tabla 6.

Columna	Omnifit 25, altura del lecho = 15 cm, CV = 73,6 ml
Tampón de equilibrio A	Tris 20 mM, pH 7,6
Tampón de elución B	Tris 20 mM, pH 7,6, NaCl 1 M
Factor de dilución para la carga	Dilución de la muestra 1:3 en tampón de equilibrio A
Gradiente	Etapas: Tampón de elución B al 4% (4 CV), al 20% (4 CV) y al 100% (2 CV)

30 *2ª columna: Cromatografía de afinidad intermedia (Blue Sepharose FF)*

Esta etapa del proceso de cromatografía de afinidad es una etapa intermedia que es importante para aumentar la pureza de cST6. El eluato de la etapa de cromatografía de captura (29 ml) se diluyó y se purificó con una etapa de cromatografía con Blue Sepharose.

Las condiciones cromatográficas se resumen en la tabla 7.

Columna	Omnifit 10, altura del lecho = 7,0 cm, CV = 5,5 ml
Tampón de equilibrio A	fosfato de potasio 25 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM
Tampón de elución B	fosfato de potasio 25 mM, pH 7,5, arginina-HCl 1 M
Factor de dilución para la carga	Dilución de la muestra 1:3 en tampón de equilibrio A
Gradiente	Etapas: B al 10%, B al 75%, B al 100% (cada etapa 5 CV)

3ª columna: Cromatografía de afinidad de acabado (Prosep PB)

5 El medio ProSep-PB está compuesto de un ligando de m-aminofenilo sintético inmovilizado sobre esferas de vidrio de tamaño de poro controlado.

Esta cromatografía de afinidad se empleó como etapa de acabado final. Se purificaron 15 ml del eluato intermedio en esta etapa de cromatografía.

Las condiciones cromatográficas se resumen en la tabla 8.

Columna	Omnifit 10, altura del lecho = 5,8 cm, CV = 4,55 ml
Tampón de equilibrio A12	fosfato de potasio 25 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M
Tampón de equilibrio A11	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M
Tampón de elución B	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M, sorbitol 1,37 M
Factor de dilución para la carga de la muestra	Dilución 1:5 en tampón de equilibrio A12
Gradiente	Etapas: B al 100% a lo largo de 5 CV
Tampón de dilución	BisTris 50 mM, pH 6,5, Tween80 al 0,015%
Tampón de formulación	BisTris 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,1 M, sorbitol al 5%, Tween80 al 0,003%

10 **6. Pureza de ST6GalNAcl, actividad específica y rendimiento de la producción**

Ejemplo 1

Se midió la pureza de ST6GalNAcl purificada según el ejemplo 1 mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie (véase la figura 3), RP-HPLC, ELISA, y ensayo del umbral en tres lotes. La actividad específica de ST6GalNAcl se midió mediante RP-HPLC.

15 La pureza y las actividades específicas se muestran en la tabla 9.

Ensayo	Método	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3
Identidad	SDS-PAGE	Banda principal a aprox. 66 kDa	Banda principal a aprox. 66 kDa	Banda principal a aprox. 66 kDa
Pureza	RP-HPLC	100,0%	100,0%	99,5%
Proteínas residuales de las células hospedantes CHO (ensayo genérico)	ELISA	35 ng/mg (ppm)	35 ng/mg (ppm)	37 ng/mg (ppm)
ADN residual de la célula hospedante	ensayo del umbral	≤ 784 pg/mg	≤ 833 pg/mg	≤ 755 pg/mg
Actividad específica	RP-HPLC	5,6 U/mg	7,8 U/mg	7,7 U/mg

El rendimiento de la producción de la ST6GalNAcl purificada se encuentra en un intervalo de 65 mg/l a 75 mg/l.

- 5 Se realizó un estudio comparativo para comparar la expresión de ST6GalNAcl en células CHO con la expresión de ST6GalNAcl en células de insecto. La ST6GalNAcl derivada de células de insecto mostró una actividad específica de 2,5 U/mg, y la ST6GalNAcl derivada de CHO mostró una actividad específica mayor de 7,8 U/mg.

Ejemplo 2

Las fracciones de cST6 purificadas según el ejemplo 2 se reunieron y se analizaron para la pureza mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie (véase la figura 4). Las muestras reunidas de cST6 que proceden de tres clones diferentes C1, C2 y C3 se cargaron sin diluir, diluidas 1:5 y diluidas 1:10.

- 10 La tabla 10 muestra la preparación de las muestras y la carga.

Pocillo	Muestra	Volumen de la muestra (µl)	Tampón de la muestra (µl)	Volumen de carga (µl)	Condiciones
1	Reunión de C1 después de la 3ª columna (Mono Q)	10	10	20	ebullición/reducción
2	Reunión de C2 después de la 3ª columna (Mono Q)	10			
3	Reunión de C3 después de la 3ª columna (Mono Q)	10			
4	-	-	10	10	
5	Reunión de C1 después de la 3ª columna (Mono Q)	2+8 H2O	10	20	
6	Reunión de C2 después de la 3ª columna (Mono Q)	2+8 H2O			
7	Reunión de C3 después de la 3ª columna (Mono Q)	2+8 H2O			
8	-	-	10	10	
9	Reunión de C1 después de la 3ª columna (Mono Q)	1+9 H2O	10	20	
10	Reunión de C2 después de la 3ª columna (Mono Q)	1+9 H2O			
11	Reunión de C3 después de la 3ª columna (Mono Q)	1+9 H2O			
12	Marcador de bajo peso molecular			10	

Tal como se muestra en la figura 4, las reuniones no diluidas muestran una pequeña contaminación por debajo de 20 kDa. La señal de las reuniones diluidas 1:10 es más fuerte que la señal de las impurezas en las muestras no diluidas. Por tanto, puede calcularse que la pureza es > 90%.

15 **Ejemplo 3**

Se midió la pureza de la ST6GalNAcl purificada según el ejemplo 3 mediante SDS-PAGE teñida con Coomassie, RP-HPLC, ELISA, y ensayo del umbral en tres lotes. La actividad específica de ST6GalNAcl se midió mediante RP-HPLC.

Leyendas de las figuras

- 20 Figura 1: Proceso de fabricación de la sialiltransferasa: cultivo celular y recolección.

Figura 2: Proceso de fabricación de la sialiltransferasa: purificación.

Figura 3: Gel de proteínas (SDS-PAGE) que se ha teñido con azul de Coomassie después de las diferentes etapas de purificación del ejemplo 1. La banda que aparece alrededor de 66 kDa se corresponde con el polipéptido de la ST6GalNAcl purificado, según SEQ ID NO:6.

- 5 Figura 4: Gel de proteínas (SDS-PAGE) que se ha teñido con azul de Coomassie de reuniones de cST6 procedentes de tres clones diferentes, C1, C2 y C3, después de la tercera columna de la purificación según el ejemplo 2. La banda que aparece alrededor de 66 kDa se corresponde con el polipéptido de la ST6GalNAcl purificado, según SEQ ID NO:6.

ES 2 534 936 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BioGenerix AG

<120> Método para producir y purificar una sialiltransferasa soluble activa

<130> B 9298/RN

5 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1701

<212> ADN

10 <213> *Gallus gallus*

<400> 1

atgggggtttt taatcagaag gcttcctaaa gattccagaa tattccgttg gctccttatt	60
ttaacagtct tttccttcat cattactagt tttagcgcct tgtttgcat ggagaaaagc	120
atthtcaggc agctcaagat ttaccaaagc attgcacata tgctacaagt ggacacccaa	180
gatcagcaag gttcaaacta ttctgctaata gggagaatth caaaggttgg tttggagaga	240
gacattgcat ggctcgaact gaatactgct gtgagtacac caagtgggga agggaaggaa	300
gagcagaaga aaacagtga accagttgcc aagggtggaag aagccaagga gaaagtgact	360
gtgaaacat tccctgaggt gatggggatc acaaatacaa cagcatcaac agcctctgtg	420
gtggagagaa caaaggagaa aacaacagcg agaccagttc caggggtggg ggaagctgat	480
gggaagagaa caacgatagc acttcccagc atgaaggaag acaaagagaa ggcgactgtg	540
aaaccatcct ttgggatgaa ggtagctcat gcaaacagca catccaaaga taaaccaaag	600
gcagaagagc ctctgcatc agtgaaagcc ataagacctg tgactcaggc tgccacagtg	660
acagagaaga agaaactgag ggctgctgac ttcaagactg agccacagtg ggattttgat	720
gatgagtaca tactggatag ctcatctcca gtatcgacct gctctgaatc agtgagagcc	780
aaggctgcca agtctgactg gctgcgagat cttttcctgc cgaacatcac actcttcata	840
gacaagagtt acttcaatgt cagtgagtg gaccgcctgg agcattttgc acctccctat	900
ggcttcatgg agctgaatta ctactggta gaagaagtca tgtcacggct gcctccaaat	960
ccccaccagc agctgctcct ggccaacagt agcagcaacg tgtcaacgtg catcagctgt	1020
gctgtttgtgg ggaatggagg gatattgaat aactctggaa tgggccagga gattgactcc	1080
catgactatg tgttccgggt gagcggggct gtaatcaaag gttacgaaaa ggatgtggga	1140
acaaaaacct ctttctacgg attcacagcg tactccctgg tgcctctctt ccagaacttg	1200
ggacacaaaag ggttcaagaa gatcccacag gggaagcata tcagatacat tcacttctg	1260
gaggcagtta gagactatga gtggctgaag gctcttctgt tggacaagga tatcaggaaa	1320
ggattcctga actactatgg gcgaaggccc cgggagagat tcgatgaaga tttcacaatg	1380
aataagtacc tggtagctca ccctgatttc ctcagatact tgaaaaacag gttcttaaaa	1440
tctaaaaatc tgcaaaaagcc ctactggcgg ctgtacagac ccacaacagg agccctcctg	1500

ES 2 534 936 T3

ctgctgactg ccctgcatct ctgtgaccgg gtgagtgccct atggctacat cacagaaggt 1560
 caccagaagt actcggatca ctactatgac aaggagtgga aacgcctggt cttctacggt 1620
 aaccatgact tcaacttggga gaagcaggtg tggaaaaggc ttcatgatga gaacatcatg 1680
 aagctctacc agagatcctg a 1701

<210> 2
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 2

5

Met Gly Phe Leu Ile Arg Arg Leu Pro Lys Asp Ser Arg Ile Phe Arg
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Ile Leu Thr Val Phe Ser Phe Ile Ile Thr Ser Phe Ser
 20 25 30
 Ala Leu Phe Gly Met Glu Lys Ser Ile Phe Arg Gln Leu Lys Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Ser Ile Ala His Met Leu Gln Val Asp Thr Gln Asp Gln Gln Gly
 50 55 60
 Ser Asn Tyr Ser Ala Asn Gly Arg Ile Ser Lys Val Gly Leu Glu Arg
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Trp Leu Glu Leu Asn Thr Ala Val Ser Thr Pro Ser Gly
 85 90 95
 Glu Gly Lys Glu Glu Gln Lys Lys Thr Val Lys Pro Val Ala Lys Val
 100 105 110
 Glu Glu Ala Lys Glu Lys Val Thr Val Lys Pro Phe Pro Glu Val Met
 115 120 125
 Gly Ile Thr Asn Thr Thr Ala Ser Thr Ala Ser Val Val Glu Arg Thr
 130 135 140
 Lys Glu Lys Thr Thr Ala Arg Pro Val Pro Gly Val Gly Glu Ala Asp
 145 150 155 160
 Gly Lys Arg Thr Thr Ile Ala Leu Pro Ser Met Lys Glu Asp Lys Glu
 165 170 175
 Lys Ala Thr Val Lys Pro Ser Phe Gly Met Lys Val Ala His Ala Asn
 180 185 190
 Ser Thr Ser Lys Asp Lys Pro Lys Ala Glu Glu Pro Pro Ala Ser Val
 195 200 205
 Lys Ala Ile Arg Pro Val Thr Gln Ala Ala Thr Val Thr Glu Lys Lys

ES 2 534 936 T3

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val Ser
 500 505 510

Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His Tyr
 515 520 525

Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp Phe
 530 535 540

Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Met
 545 550 555 560

Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
 565

<210> 3
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> *Gallus gallus*

5 <400> 3

aaaaccgagc ctcaatggga ttttgatgat gagtacatcc tggattccag ctccccagct 60
 agcacctggt ccgaaagcgt gagagccaag gctgccaat ctgattggct gcgcgacctg 120
 tttctgccta atatcacct gttcatcgac aagtcttact tcaatgtgtc tgagtgggac 180
 aggctggaac attttgctcc accttatgga ttcattggagc tcaactacag cctggtggag 240
 gaggtgatga gcaggctccc tccaacccc caccagcagc tgctgctggc taattcttct 300
 tctaactgta gcacatgcat ctctgtgca gtggtgggca atggggggat tctgaacaat 360
 agcggtatgg gtcaggagat cgactctcat gattacgtgt tcagggtgtc tggcgctgtg 420
 atcaaaggct atgagaagga cgtggggaca aaaacttct tctacggctt cactgcctat 480
 agcctcgtca gctccttgca aaacctcggg cataaggggt ttaagaaaat cccacagggg 540
 aagcatatca ggtacattca cttcctcgag gcagtgaggg actatgagtg gctgaaagcc 600
 ctgctgttgg ataaggacat caggaagggg ttctgaact attacggctg caggcccagg 660
 gagaggttcg acgaggactt caccatgaac aaatacctgg tcgctcacc cgaactttctg 720
 aggtacctga agaatagggt cttgaaatct aaaaacctgc agaaacccta ttggaggctg 780
 tacaggccta ccaccggggc tctgctcctg ctgactgctc tgcattctgtg cgacagggta 840
 tctgcttacg gatacatcac cgagggccac caaaagtaca gcgaccatta ttatgacaaa 900
 gaatggaagc ggctggtggt ttacgtgaac cacgatttta atctggagaa gcagggtgtg 960
 aaaaggctcc acgacgagaa tatcatgaag ctgtatcaac ggagctga 1008

10 <210> 4
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 4

ES 2 534 936 T3

Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe Asp Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Ala Ser Thr Cys Ser Glu Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala
 20 25 30
 Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe
 35 40 45
 Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn Val Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His
 50 55 60
 Phe Ala Pro Pro Tyr Gly Phe Met Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu
 65 70 75 80
 Glu Val Met Ser Arg Leu Pro Pro Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu
 85 90 95
 Ala Asn Ser Ser Ser Asn Val Ser Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val
 100 105 110
 Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Asn Ser Gly Met Gly Gln Glu Ile Asp
 115 120 125
 Ser His Asp Tyr Val Phe Arg Val Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr
 130 135 140
 Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn Leu Gly His Lys Gly Phe Lys Lys
 165 170 175
 Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg Tyr Ile His Phe Leu Glu Ala Val
 180 185 190
 Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala Leu Leu Leu Asp Lys Asp Ile Arg
 195 200 205
 Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Arg Arg Pro Arg Glu Arg Phe Asp
 210 215 220
 Glu Asp Phe Thr Met Asn Lys Tyr Leu Val Ala His Pro Asp Phe Leu
 225 230 235 240
 Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu Lys Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro
 245 250 255
 Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr Thr Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr
 260 265 270

ES 2 534 936 T3

Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu
 275 280 285

Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg
 290 295 300

Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp
 305 310 315 320

Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Met Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
 325 330 335

<210> 5

<211> 1032

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ST6GalNAcl de pollo truncada con secuencia intermedia

<400> 5

tttgtgtcta	ccctggagga	cccaaaaacc	gagcctcaat	gggattttga	tgatgagtac	60
atcctggatt	ccagctcccc	agctagcacc	tgttccgaaa	gcgtagagagc	caaggctgcc	120
aaatctgatt	ggctgcgca	cctgtttctg	cctaataca	ccctgttcat	cgacaagtct	180
tacttcaatg	tgtctgagt	ggacaggctg	gaacattttg	ctccacctta	tggattcatg	240
gagctcaact	acagcctggt	ggaggaggtg	atgagcaggc	tcctcccaa	ccccaccag	300
cagctgctgc	tggctaattc	ttcttctaac	gtgagcacat	gcatctcctg	tgcagtgggtg	360
ggcaatgggg	ggattctgaa	caatagcggg	atgggtcagg	agatcgactc	tcatgattac	420
gtgttcaggg	tgtctggcgc	tgtgatcaaa	ggctatgaga	aggacgtggg	gacaaaaact	480
tccttctacg	gcttactgc	ctatagcctc	gtcagctcct	tgcaaacct	cgggcataag	540
gggtttaaga	aaatcccaca	ggggaagcat	atcaggatca	ttcacttctc	cgaggcagtg	600
agggactatg	agtggctgaa	agccctgctg	ttggataagg	acatcaggaa	gggattcctg	660
aactattacg	gtcgcaggcc	caggagagag	ttcgacgagg	acttcacat	gaacaaatac	720
ctggtcgctc	accccgactt	tctgaggtac	ctgaagaata	ggttcttgaa	atctaaaaac	780
ctgcagaaac	cctattggag	gctgtacagg	cctaccaccg	gggctctgct	cctgctgact	840
gctctgcatc	tgtgcgacag	ggtatctgct	tacggatata	tcaccgaggg	ccaccaaag	900
tacagcgacc	attattatga	caaagaatgg	aagcggctgg	tgttttacgt	gaaccacgat	960
tttaatctgg	agaagcaggt	gtggaaaagg	ctccacgacg	agaatatcat	gaagctgtat	1020
caacggagct	ga					1032

10

<210> 6

<211> 343

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 534 936 T3

<220>

<223> ST6GalNAcl de pollo truncada con secuencia intermedia

<400> 6

Phe Val Ser Thr Leu Glu Asp Pro Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asp Phe
1 5 10 15

Asp Asp Glu Tyr Ile Leu Asp Ser Ser Ser Pro Ala Ser Thr Cys Ser
20 25 30

Glu Ser Val Arg Ala Lys Ala Ala Lys Ser Asp Trp Leu Arg Asp Leu
35 40 45

Phe Leu Pro Asn Ile Thr Leu Phe Ile Asp Lys Ser Tyr Phe Asn Val
50 55 60

Ser Glu Trp Asp Arg Leu Glu His Phe Ala Pro Pro Tyr Gly Phe Met
65 70 75 80

Glu Leu Asn Tyr Ser Leu Val Glu Glu Val Met Ser Arg Leu Pro Pro
85 90 95

Asn Pro His Gln Gln Leu Leu Leu Ala Asn Ser Ser Ser Asn Val Ser
100 105 110

Thr Cys Ile Ser Cys Ala Val Val Gly Asn Gly Gly Ile Leu Asn Asn
115 120 125

Ser Gly Met Gly Gln Glu Ile Asp Ser His Asp Tyr Val Phe Arg Val
130 135 140

Ser Gly Ala Val Ile Lys Gly Tyr Glu Lys Asp Val Gly Thr Lys Thr
145 150 155 160

Ser Phe Tyr Gly Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Val Ser Ser Leu Gln Asn
165 170 175

Leu Gly His Lys Gly Phe Lys Lys Ile Pro Gln Gly Lys His Ile Arg
180 185 190

Tyr Ile His Phe Leu Glu Ala Val Arg Asp Tyr Glu Trp Leu Lys Ala
195 200 205

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Ile Arg Lys Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly
210 215 220

Arg Arg Pro Arg Glu Arg Phe Asp Glu Asp Phe Thr Met Asn Lys Tyr
225 230 235 240

Leu Val Ala His Pro Asp Phe Leu Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Phe Leu
245 250 255

Lys Ser Lys Asn Leu Gln Lys Pro Tyr Trp Arg Leu Tyr Arg Pro Thr
260 265 270

ES 2 534 936 T3

Thr Gly Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ala Leu His Leu Cys Asp Arg Val
 275 280 285

Ser Ala Tyr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly His Gln Lys Tyr Ser Asp His
 290 295 300

Tyr Tyr Asp Lys Glu Trp Lys Arg Leu Val Phe Tyr Val Asn His Asp
 305 310 315 320

Phe Asn Leu Glu Lys Gln Val Trp Lys Arg Leu His Asp Glu Asn Ile
 325 330 335

Met Lys Leu Tyr Gln Arg Ser
 340

- <210> 7
- <211> 2235
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 5 <220>
- <223> Módulo de expresión EcST6

<400> 7

```

gcgggcgctc tagaactagt ggatcccccg ggctgcagga attcgatcgc gccccaggtc      60
gctgagggac cccggccagg cgcggagatg ggggtgcacg gtgagtactc gcgggctggg      120
cgctcccgcc cgcccggggtc cctgtttgag cggggattta gcgccccggc tattggccag      180
gaggtggctg ggttcaagga ccggcgactt gtcaaggacc ccggaagggg gagggggggtg      240
gggcagcctc cacgtgccag cggggacttg ggggagtcct tggggatggc aaaaacctga      300
cctgtgaagg ggacacagtt tgggggttga ggggaagaag gtttgggggt tctgctgtgc      360
cagtggagag gaagctgata agctgataac ctgggcgctg gagccaccac ttatctgcca      420
gaggggaagc ctctgtcaca ccaggattga agtttggccg gagaagtgga tgctggtagc      480
tgggggtggg gtgtgcacac ggcagcagga ttgaatgaag gccagggagg cagcacctga      540
gtgcttgcac ggttggggac aggaaggacg agctggggca gagacgtggg gatgaaggaa      600
gctgtccttc cacagccacc cttctccctc cccgcctgac tctcagcctg gctatctggt      660
ctagaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgctgctccc tctgggcctc      720
ccagtcctgg gctttgtgtc taccctggag gacccaaaaa ccgagcctca atgggatttt      780
gatgatgagt acatcctgga ttccagctcc ccagctagca cctgttccga aagcgtgaga      840
gccaaaggctg ccaaactgta ttggctgctc gacctgttct tgcctaatat caccctgttc      900
atcgacaagt cttacttcaa tgtgtctgag tgggacaggc tggaacattt tgctccacct      960
tatggattca tggagctcaa ctacagcctg gtggaggagg tgatgagcag gctccctccc      1020
aacccccacc agcagctgct gctggctaata tcttcttcta acgtgagcac atgcatctcc      1080
tgtgcagtgg tgggcaatgg ggggattctg aacaatagcg gtatgggtca ggagatcgac      1140
    
```

ES 2 534 936 T3

tctcatgatt	acgtgttcag	ggtgtctggc	gctgtgatca	aaggctatga	gaaggacgtg	1200
gggacaaaa	cttccttcta	cggcttcact	gcctatagcc	tcgtcagctc	cttgcaaaac	1260
ctcgggcata	aggggtttaa	gaaaatccca	caggggaagc	atatcaggta	cattcacttc	1320
ctcgaggcag	tgagggacta	tgagtggctg	aaagccctgc	tgttgataa	ggacatcagg	1380
aagggattcc	tgaactatta	cggtcgcagg	cccagggaga	ggttcgacga	ggacttcacc	1440
atgaacaaat	acctggtcgc	tcaccccgac	tttctgaggt	acctgaagaa	taggttcttg	1500
aaatctaaaa	acctgcagaa	accctattgg	aggctgtaca	ggcctaccac	gggggctctg	1560
ctcctgctga	ctgctctgca	tctgtgcgac	agggtatctg	cttacggata	catcaccgag	1620
ggccaccaa	agtacagcga	ccattattat	gacaaagaat	ggaagcggct	ggtgttttac	1680
gtgaaccacg	atthtaatct	ggagaagcag	gtgtggaaaa	ggctccacga	cgagaatatc	1740
atgaagctgt	atcaacggag	ctgaccagggt	gtgtccacct	gggcatatcc	accacctccc	1800
tcaccaacat	tgcttgtgcc	acaccctccc	ccgccactcc	tgaaccccg	cgaggggctc	1860
tcagctcagc	gccagcctgt	cccattggaca	ctccagtgcc	agcaatgaca	tctcaggggc	1920
cagaggaact	gtccagagag	caactctgag	atctttttcc	ctctgcaaaa	aattatgggg	1980
acatcatgaa	gccccttgag	catctgactt	ctggctaata	aaggaaatth	atthtcattg	2040
caatagtgtg	ttggaatth	ttgtgtctct	cactcggaag	gacatagatc	cagacatgat	2100
aagatacatt	gatgagth	gacaaaccac	aactagaatg	cagtgaaaaa	aatgctth	2160
ttgtgaaatt	tgtgatgcta	ttgctthatt	tgtaacatt	ataagctgca	ataaacaagt	2220
taacaacaac	aattg					2235

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para producir un polipéptido de sialiltransferasa, que comprende las etapas de:
- a) expresar un polipéptido de sialiltransferasa en células CHO; recoger el medio de cultivo celular que contiene el polipéptido de sialiltransferasa expresado; y
- 5 b) purificar el polipéptido de sialiltransferasa del medio de cultivo celular sometiendo el medio de cultivo celular a (i) dos etapas de cromatografía de afinidad o una etapa de cromatografía de afinidad y una etapa de cromatografía de modo mixto, (ii) una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, y (iii) una etapa de cromatografía de intercambio catiónico,
- en el que la sialiltransferasa es ST6GalNAcl.
- 10 2.- El método según la reivindicación 1, en el que la ST6GalNAcl se selecciona del grupo que consiste en ST6GalNAcl humana, de chimpancé, de orangután, de cerdo, de vaca, de perro, de rata, de ratón y de pollo.
- 3.- El método según la reivindicación 2, en el que la ST6GalNAcl es una ST6GalNAcl de pollo.
- 4.- El método según la reivindicación 3, en el que el polipéptido de la ST6GalNAcl comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 6.
- 15 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido de sialiltransferasa solo comprende el dominio activo de la sialiltransferasa.
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se emplea un módulo de expresión que codifica una secuencia señal de EPO y una secuencia del polipéptido de sialiltransferasa para expresar el polipéptido de sialiltransferasa en células CHO.
- 20 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa a) se realiza aplicando un desplazamiento de la temperatura de incubación de 37 °C +/- 1 °C a 32 °C +/- 1 °C después de alcanzar una densidad celular predefinida.
- 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa b) se realiza en el siguiente orden:
- 25 i. una cromatografía de intercambio aniónico;
- ii. una primera cromatografía de afinidad;
- iii. una segunda cromatografía de afinidad o una cromatografía de modo mixto;
- iv. una cromatografía de intercambio catiónico.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cromatografía de intercambio aniónico se realiza empleando una resina que porta un amonio cuaternario como grupo funcional.
- 30 10.- El método según la reivindicaciones 9, en el que la cromatografía de intercambio aniónico se realiza empleando un tampón de NaCl/Tris-HCl como eluyente, a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0.
- 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la primera cromatografía de afinidad se realiza empleando una cromatografía de afinidad de tinte.
- 35 12.- El método según la reivindicación 11, en el que la primera cromatografía de afinidad se realiza empleando una resina Blue Sepharose Fast Flow.
- 13.- El método según la reivindicación 12, en el que la cromatografía de afinidad con Blue Sepharose se realiza empleando un tampón de clorhidrato de L-arginina/fosfato de potasio como eluyente a un pH en el intervalo entre 7,0 y 8,0.
- 40 14.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la cromatografía de modo mixto se realiza empleando una resina de hidroxiapatito.
- 15.- El método según la reivindicación 14, en el que la cromatografía de afinidad de hidroxiapatito se realiza empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio como eluyente, a un pH en el intervalo entre 6,3 y 7,3.
- 45 16.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza con una resina que contiene un material de intercambio catiónico de sulfopropilo.
- 17.- El método según la reivindicación 16, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza empleando

una resina SP-Sepharose High Performance.

18.- El método según la reivindicación 17, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza empleando un tampón de NaCl/fosfato de potasio como eluyente, a un pH en el intervalo entre 6,0 y 7,0.

5 19.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la etapa b) se realiza en el siguiente orden:

- i. una cromatografía de intercambio aniónico que emplea una resina Q-Sepharose Fast Flow;
- ii. una primera cromatografía de afinidad que emplea una resina Blue Sepharose Fast Flow;
- iii. una cromatografía de modo mixto que emplea una resina de hidroxapatito;
- iv. una cromatografía de intercambio catiónico que emplea una resina SP-Sepharose High Performance.

10

Figura 1

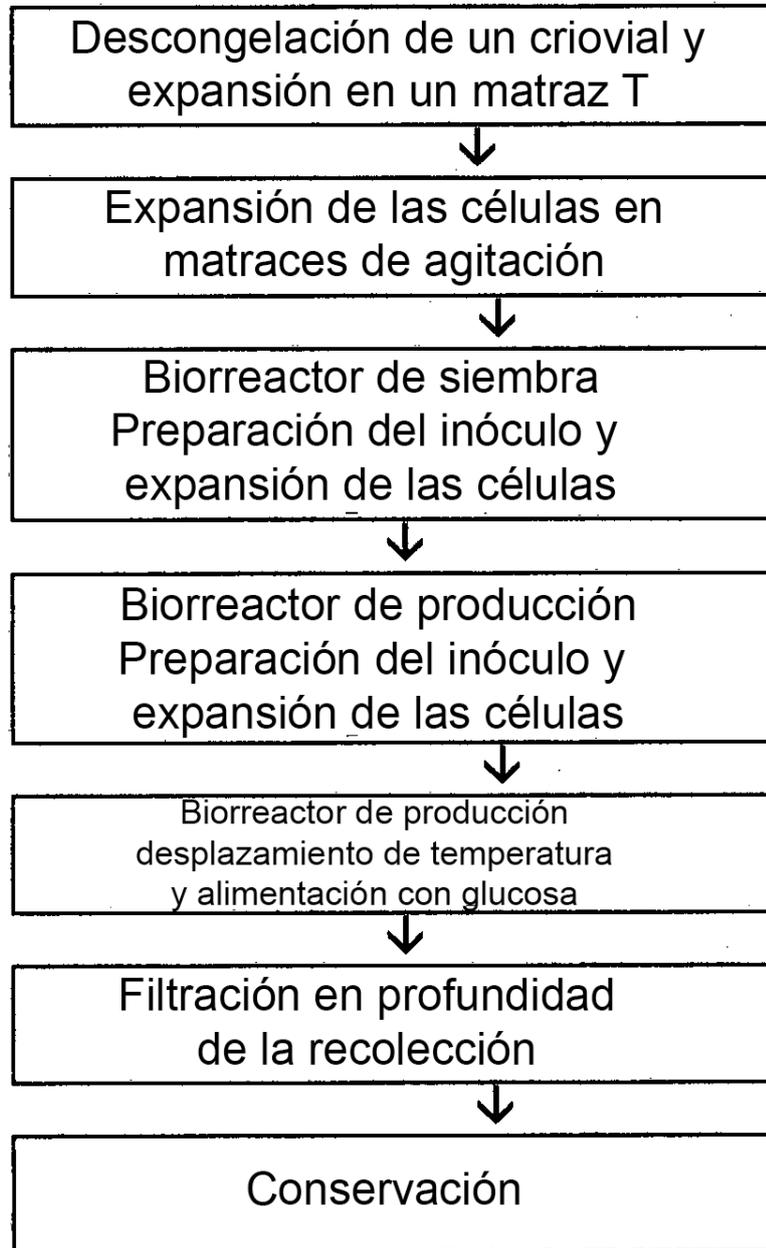


Figura 2

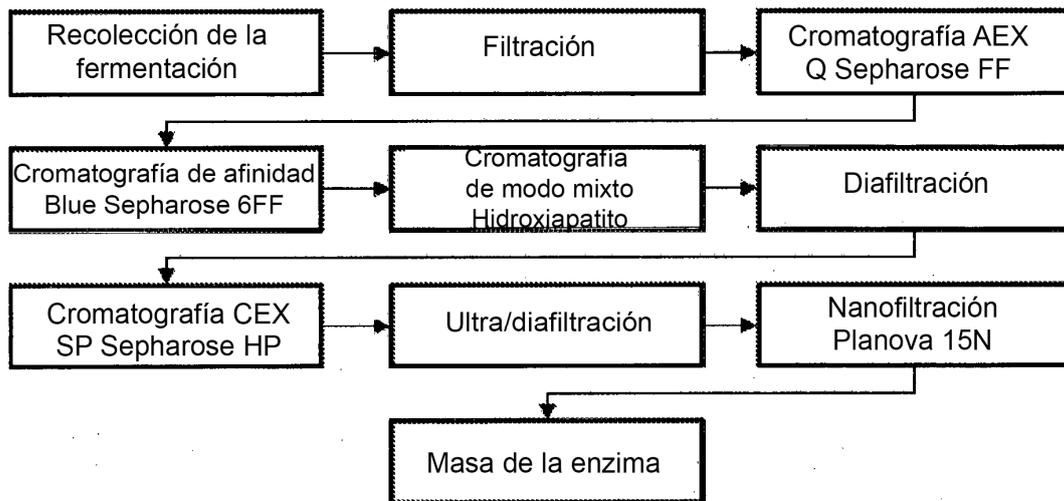


Figura 3

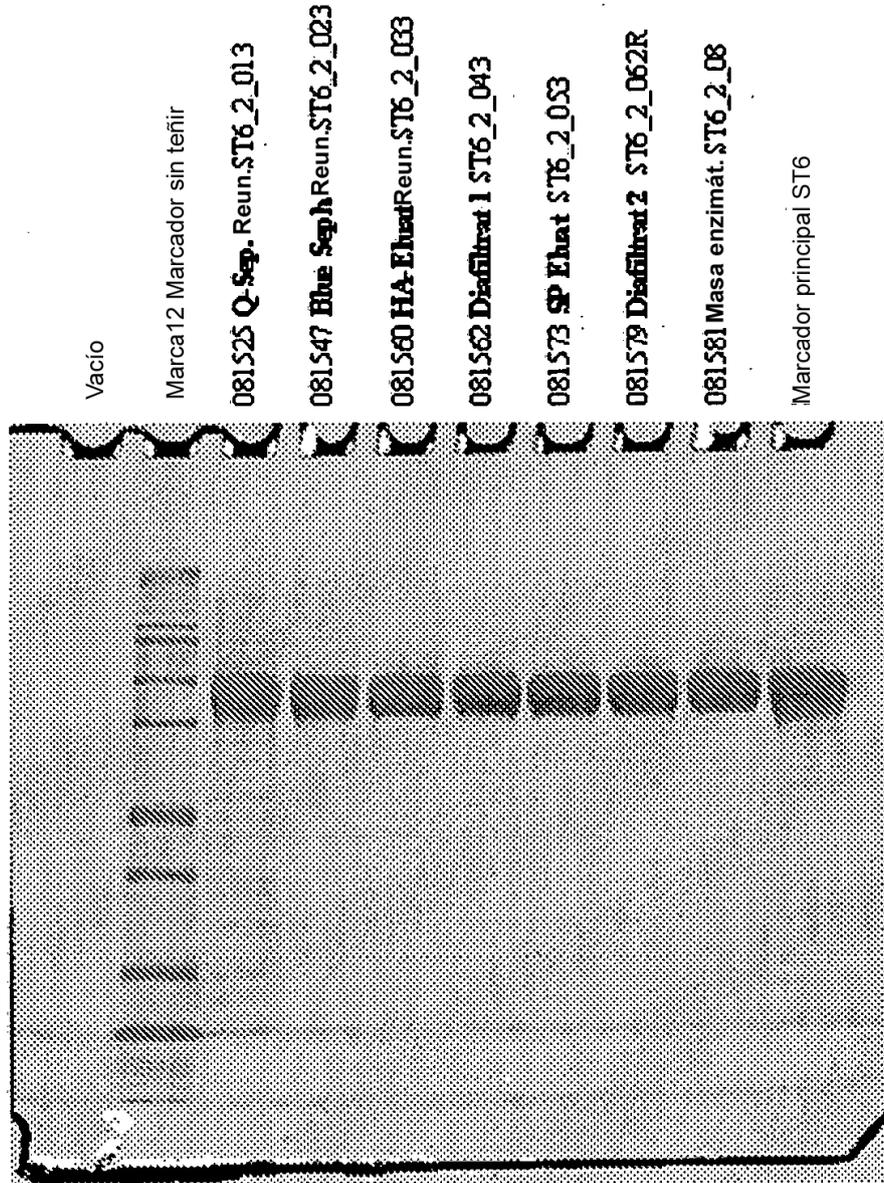


Figura 4

