

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 208**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/KR2012/007959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13058485**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12841143 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2768846**

54 Título: **Métodos para purificar análogos de eritropoyetina que tienen punto isoeléctrico más bajo**

30 Prioridad:

18.10.2011 KR 20110106230

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

73 Titular/es:

**CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.
(100.0%)
(Chungjeongno 3-ga, Chong Kun Dang Building)
8, Chungjeong-ro, Seodaemun-gu
Seoul 120-726, KR**

72 Inventor/es:

**KOH, YEO-WOOK;
LEE, SANG-YONG;
KIM, COOK-HEE;
LEE, SEUNG-HUI;
KIM, HA-NA;
KIM, SU-YON;
SEONG, JIN-HYUN y
CHO, YONG-HYUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 208 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

Métodos para purificar análogos de eritropoyetina que tienen punto isoeléctrico más bajo

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un método para purificar un análogo de eritropoyetina que tiene un bajo punto isoeléctrico por debajo de 4 mediante la adición de una cadena de azúcar enlazada a N con alta pureza.

Estado de la técnica

15 La eritropoyetina es un factor estimulante de la eritropoyesis que promueve la producción de glóbulos rojos mediante la estimulación de células madre hematopoyéticas y que facilita su diferenciación en eritrocitos. La eritropoyetina (o EPO) es una glicoproteína que tiene tres cadenas de azúcar enlazadas a N y una cadena de azúcar enlazada a O y se usa para tratar la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica, cáncer y similares. El número de residuos de ácido siálico en las cadenas de azúcar de la EPO afecta la semivida y la actividad biológica de la EPO en la sangre. Una isoforma que tiene un mayor número de residuos de ácido siálico tiene una actividad biológica más alta a medida que se suprime la degradación de la EPO (Egrie JC y Browne JK., Br. J. Cancer, 2001; 84, 3-10 y Egrie et al., Glycoconj. J., 1993; 10: 263 - 269).

25 Recientemente, se ha producido una nueva proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP), que es un análogo de eritropoyetina con un bajo punto isoeléctrico, obtenido añadiendo cadenas de azúcar enlazadas a N a la eritropoyetina de origen natural mediante modificación genética con el fin de aumentar la actividad biológica. La darbepoetina alfa es una NESP actualmente disponible como fármaco (Egrie y Browne, Br. J. Cancer. 84 suplemento 1, 3-10 (2001)). NESP es una glicoproteína que consta de 165 aminoácidos. Mientras que la EPO de origen natural tiene hasta 14 residuos de ácido siálico, la NESP tiene hasta 18 o 22 residuos de ácido siálico añadiendo cadenas de azúcar enlazados a N. El ácido siálico es un ácido de azúcar. A medida que aumenta el número de residuos de ácido siálico como resultado de la adición de las cadenas de azúcar enlazadas a N, la molécula de NESP tiene por lo tanto un punto isoeléctrico más bajo (pI) (Rush RS, et al., Anal. Chem., 1995; 67: 1441-52).

35 Dado que la NESP obtenida por adición de los residuos de ácido siálico tiene una semivida 3 veces más larga en suero en comparación con la eritropoyetina recombinante existente, se puede esperar un efecto terapéutico equivalente con menos administraciones cuando se trata la anemia de pacientes con enfermedad renal crónica. El contenido de ácido siálico de la EPO está directamente relacionado con la duración de la liberación del fármaco *in vivo* y, por lo tanto, se considera una propiedad importante de la glicoproteína. El residuo de ácido siálico en el terminal de la cadena de azúcar de EPO protege el segundo residuo de galactosa de la cadena de azúcar, inhibiendo así la degradación del residuo de galactosa por el receptor de hepatocitos, prolongando la semivida de EPO *in vivo* y mejorando su actividad biológica (Goldwasser et al., J. Biol. Chem. 249, 4202 - 4206 (1974), Lowy et al., Nature 185, 102 - 103 (1960)).

45 Un método para producir EPO usando células animales se describe en la siguiente patente. El registro de patente coreano No. 10-0423615 describe un método para producir eritropoyetina cultivando células productoras de EPO en un matraz o rodillo exento de suero y purificándolas secuencialmente mediante cromatografía de adsorción de Sefarosa Azul, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía líquida de alta velocidad. Sin embargo, esta patente no describe un método para producir NESP, y el procedimiento de purificación que implica los cuatro procesos cromatográficos descritos en la patente es complicado.

50 Además, se describe el uso de cromatografía de inmunoadsorción en los registros de patente coreana Nos. 10-0153808 y 10-0900013, el uso de cromatografía de afinidad en los registros de patente coreana Nos. 10-0390325 y 10-0423615 y el uso de cromatografía de fase inversa en los registros de patente coreana Nos. 10-0065197 y 10-0423615, la publicación de patente coreana No. 10-2004-0065567 y el registro de patente coreana No. 10-0900033. Además, se describe el uso de la cromatografía hidrófoba en los registros de patente coreana Nos. 10-0344059 y 10-0567448, y el uso de la cromatografía de intercambio iónico por lotes en el registro de patente coreana No. 10-0297927. Por último, se describe el uso de cromatografía de hidroxipatita en los registros de patente coreana Nos. 10-0390325 y 10-0900013 y en la patente estadounidense No. 7.619.073. Aunque las técnicas anteriormente descritas describen la purificación de EPO, no describen la purificación de NESP que tiene un punto isoeléctrico más bajo que el de la EPO.

Mientras tanto, la patente estadounidense No. 7.217.689 que describe material de NESP, describe el uso de cromatografía de intercambio aniónico en los Ejemplos.

65 El documento WO2010/008823 A2 describe el uso de cromatografía de intercambio aniónico o adsorción junto con cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de NESP. En particular, esta publicación propone un

método para separar isoformas que tienen más residuos de ácido siálico a través de cromatografía de intercambio catiónico.

El documento WO2005/121173 A1 describe un método para el enriquecimiento de EPO en una mezcla de proteínas, que comprende las siguientes etapas a)-c) llevadas a cabo en el orden dado: a) una primera cromatografía de intercambio aniónico; b) una cromatografía de afinidad, una cromatografía de interacción hidrófoba y una cromatografía de hidroxapatita, en donde las etapas de purificación cromatográfica dentro de la etapa b) pueden llevarse a cabo en cualquier orden; y c) una segunda cromatografía de intercambio aniónico. El documento WO2005/121173 A1 utiliza necesariamente al menos 5 etapas de cromatografía seleccionadas de entre cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, y cromatografía de hidroxapatita, que deben realizarse en orden.

El documento WO2011/024024 A1 describe un procedimiento para recuperar la darbepoetina alfa recombinante (que tiene 5 cadenas de azúcar enlazadas a N) a partir de sobrenadantes de cultivo celular. También se describe en el documento WO2011/024024 A1 un método de recuperación que contiene las siguientes etapas obligatorias de cromatografía: (i) una etapa de cromatografía de intercambio aniónico (pH del regulador 6,8-7,2) seguida por (ii) una cromatografía de intercambio catiónico débil (pH del regulador 6,8-7,2) en el modo de flujo seguido por (iii) una cromatografía de intercambio catiónico fuerte (pH del regulador 3,6-4,5) en modo de enlace y de elución. El documento WO2011/024024 A1 no contiene ninguna descripción de una etapa de cromatografía de hidroxapatita.

La tesis de Stefan Nahrgang (No. 2608 (2002-01-01)), denominada "Influencia de la línea celular y de las condiciones del proceso sobre la glicosilación de proteínas recombinantes" describe entre otras cosas la purificación de formas altamente sialiladas y biológicamente activas de EPO (u otras proteínas recombinantes sialiladas) y sugiere que dichas formas de EPO pueden purificarse eficazmente a partir de sobrenadantes utilizando ya sea AEX (cromatografía de intercambio aniónico), HAC (cromatografía de hidroxapatita) o una combinación de estos métodos. Nahrgang (2002) sugiere también que se puede usar una combinación de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de hidroxapatita para purificar la EPO altamente sialilada. Nahrgang (2002) no tiene ninguna descripción de (i) un método que tenga entre otras cosas tres etapas de cromatografía específicas y consecutivas en las que se usan reguladores con valores de pH relativamente bajos en la cromatografía de aniones o de (ii) análogos de EPO que tienen cuatro o más cadenas de azúcar enlazadas a N sometido al proceso de purificación.

Como se describe, el método de purificación en las patentes existentes relativas a la EPO implica el uso de columnas inaplicables en la producción a escala industrial o los complicados procesos de purificación de cuatro o más etapas. Además, el método no es aplicable para NESP que tiene un punto isoeléctrico más bajo debido al cambio en las propiedades fisicoquímicas por la adición de cadenas de azúcar. La única patente publicada recientemente relativa a la purificación de NESP implica cuatro etapas, y su proceso principal de separación de isoformas que tienen más residuos de ácido siálico usa cromatografía de intercambio catiónico. Por el contrario, en la presente invención se utiliza cromatografía de intercambio aniónico que es capaz de separar más precisamente las isoformas que tienen más residuos de ácido siálico. Además, el presente procedimiento de purificación consiste en procesos cromatográficos más sencillos de tres etapas, y permite la purificación de análogos de eritropoyetina que tienen un bajo punto isoeléctrico más rápido a menor coste.

Descripción de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores han hecho esfuerzos para desarrollar un método para purificar los análogos de eritropoyetina con alta pureza que tienen un punto isoeléctrico más bajo que la eritropoyetina de origen natural de la solución de cultivo de células animales. Como resultado, se ha desarrollado un nuevo protocolo de purificación para los análogos de eritropoyetina (darbepoetina alfa) que tienen un bajo punto isoeléctrico expresado en células animales y que demostró que los análogos de eritropoyetina que tienen un bajo punto isoeléctrico por debajo de 4 pueden ser purificados convenientemente, en forma rápida y eficaz con alta pureza utilizando el protocolo de purificación.

Por lo tanto, es un objetivo de esta invención proporcionar un método para purificar un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 y una estructura de azúcar complicada.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada a seguir junto con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

Solución técnica

En un aspecto de esta invención, se proporciona un método para purificar un análogo de eritropoyetina (EPO) que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, que comprende:

(a) Obtener de una solución pretratada mediante la remoción de células animales de una solución de cultivo de las células animales, en donde las células animales expresan un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4;

5 (b) Obtener una primera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la solución pretratada a una primera cromatografía de intercambio iónico;

(c) Obtener una segunda fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la primera fracción a cromatografía de adsorción; y

10 (d) Obtener una tercera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la segunda fracción a una segunda cromatografía de intercambio iónico.

15 Los presentes inventores han hecho esfuerzos para desarrollar un método para purificar análogos de eritropoyetina con alta pureza que tienen un punto isoeléctrico más bajo que la eritropoyetina de origen natural a partir de la solución de cultivo de células animales. Como resultado, se ha desarrollado un nuevo protocolo de purificación para los análogos de eritropoyetina que tienen un bajo punto isoeléctrico expresado en células animales y han demostrado que los análogos de eritropoyetina que tienen un bajo punto isoeléctrico por debajo de 4 pueden purificarse conveniente, en forma rápida y eficaz, con alta pureza utilizando el protocolo de purificación.

20 Cada etapa del presente método para purificar un análogo de eritropoyetina se describirá en detalle.

Etapa (a): Obtención de la solución pretratada a partir de una solución de cultivo de células animales que expresan un análogo de eritropoyetina

25 De acuerdo con la presente invención, en primer lugar, se obtiene una solución pretratada a partir de una solución de cultivo de células animales que expresan un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 eliminando las células animales de la solución de cultivo.

30 Las células animales que expresan un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 útiles en la presente invención incluyen preferiblemente células de mamíferos, roedores, aves o de insectos, más preferiblemente células de ovario de hámster chino (CHO), VERO, HeLa, WI38, de riñón de hámster bebé (BHK), COS o células de riñón de canino Madin-Darby (MDCK), más preferiblemente células CHO, VERO, HeLa o MDCK, más preferiblemente células CHO.

35 El análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 comprende una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina natural. El análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico bajo puede prepararse por mutagénesis tal como mediante adición, supresión o sustitución de un residuo de aminoácido. A través de esto, pueden aumentarse o alterarse los sitios de glicosilación. El análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico bajo tiene más cadenas de carbohidratos que la eritropoyetina natural, y tiene al menos una cadena de azúcar adicional. Aunque el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico bajo exhibe un contenido de ácido siálico más alto que la eritropoyetina natural debido a la cadena de azúcar adicional, la estructura bidimensional o tridimensional de la proteína que es importante en su actividad biológica, no se altera por ello.

45 Aunque la eritropoyetina natural que tiene tres cadenas de azúcar enlazadas a N comprende hasta 14 residuos de ácido siálico, el análogo de eritropoyetina que tiene al menos una cadena de azúcar adicional enlazada a N puede comprender más residuos de ácido siálico. Dado que el ácido siálico es un ácido de azúcar cargado negativamente, el análogo de eritropoyetina que tiene al menos cuatro cadenas de azúcar enlazadas a N tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, mientras que la eritropoyetina natural que tiene tres cadenas de azúcar enlazadas a N tiene un punto isoeléctrico de 4 o superior. Por consiguiente, el análogo de eritropoyetina es relativamente más difícil de preparar que la eritropoyetina.

50 Por ejemplo, el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 de la presente invención es uno en el que al menos un sitio de glicosilación adicional en una o más posiciones seleccionadas entre 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 y 138 posiciones de la secuencia de EPO (por ejemplo, la secuencia del GenBank M11319). Más preferiblemente, el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 es una nueva proteína estimulante de eritropoyesis (NESP) que comprende las mutaciones A30N, H32T, P87V, W88N y P90T.

60 Las células animales que expresan el análogo de eritropoyetina pueden cultivarse de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede emplearse un método de cultivo alimentado por lotes, de cultivo repetido alimentado por lotes o de cultivo continuo, conocidos como los métodos para cultivar células CHO. Más preferiblemente, puede emplearse un cultivo repetido alimentado por lotes.

65 El cultivo de células animales necesita ser tratado previamente ya que normalmente comprende diversos constituyentes (impurezas) tales como proteínas, sacáridos, grasas, etc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "pretratamiento" se refiere a un proceso de eliminación de impurezas antes de realizar la cromatografía en columna con el fin de mejorar la eficacia de purificación del método de purificación de acuerdo con la presente invención.

5 De acuerdo con una realización preferida, en la etapa de pretratamiento (a), las células animales se remueven de la solución de cultivo de células animales mediante (i) filtración a través de un filtro de profundidad y un filtro de membrana seguido de ultrafiltración o (ii) centrifugación seguida por ultrafiltración.

10 El pretratamiento que utiliza el filtro de profundidad se puede realizar de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica. El filtro de profundidad se utiliza para eliminar las partículas más grandes que un tamaño predeterminado de la solución de cultivo. A diferencia del filtro de membrana, el filtro de profundidad elimina las partículas de la solución de cultivo capturándolas en matrices. Típicamente, el filtro de profundidad comprende un medio fibroso tal como celulosa, fibra de vidrio o polipropileno. El pretratamiento usando el filtro de membrana puede realizarse según diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el pretratamiento puede realizarse usando diversas membranas que tienen poros que tienen un tamaño predeterminado.

20 Un filtrado obtenido realizando la filtración a través del filtro de profundidad y del filtro de membrana se somete a ultrafiltración. La ultrafiltración se realiza utilizando una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular apropiado (MWCO). Por ejemplo, la ultrafiltración se puede realizar usando una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular de 5-30 kDa. La ultrafiltración puede proporcionar un efecto de concentración, así como de filtración.

25 Alternativamente, el pretratamiento puede realizarse centrifugando el cultivo celular y realizando después la ultrafiltración. La centrifugación se puede realizar a 2.000-5.000 rpm.

A través de esta etapa de pretratamiento se puede reducir el volumen de la solución de cultivo de células animales que comprende el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, y se puede disminuir la carga de la columna cromatográfica eliminando diversas impurezas presentes en la solución de cultivo.

30 Etapa (b): Obtención de la primera fracción primero por cromatografía de intercambio iónico

35 La solución pretratada obtenida a partir de la etapa de pretratamiento se somete a una primera cromatografía de intercambio aniónico para obtener una primera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina.

La primera cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse usando diversas técnicas de cromatografía de intercambio aniónico conocidas en la técnica. Más preferiblemente, se puede emplear una cromatografía de intercambio aniónico fuertemente básica.

40 Una resina de intercambio aniónico útil en la presente invención tiene grupos funcionales cargados positivamente unidos covalentemente a la resina. Preferiblemente, el grupo funcional cargado positivamente de la resina de intercambio aniónico es amina o amino, más preferiblemente amina primaria, amina secundaria, amina terciaria o amina cuaternaria, lo más preferiblemente amina cuaternaria. Ejemplos del grupo funcional cargado positivamente de la resina de intercambio aniónico incluyen amina cuaternaria (por ejemplo, trimetilaminometilo y trietilaminoetilo), aminoetilo, dietilaminoetilo y p-aminobencilo.

50 En la presente invención se pueden usar poliestireno, poliacrilato, celulosa, Sefacel, dextrano, agarosa o Toyopearl, preferiblemente celulosa, dextrano o agarosa, lo más preferiblemente agarosa como soporte de la resina de intercambio aniónico. Además, en la presente invención, se puede utilizar Sefarosa Q o Sefarosa DEAE, preferiblemente Sefarosa Q como agente de intercambio aniónico.

55 En la primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico de la presente invención, puede usarse cualquier regulador que tenga una potencia como regulador. Por ejemplo, pueden usarse acetato de sodio, fosfato de sodio, glicina-HCl o Tris.

60 Pueden usarse diversos reguladores, en particular Tris, como regulador de equilibrio, y el pH puede ser 6-8, preferiblemente 7,0-7,6. Como regulador de lavado, puede usarse un regulador (preferiblemente, regulador de acetato) de pH inferior a 4,0. Más preferiblemente, se puede usar un regulador de pH 3,0-6,0, incluso más preferiblemente 4,0-4,5.

Pueden usarse diversos reguladores que contienen una sal adecuada (preferiblemente, cloruro de sodio) como regulador de elución. En particular, se puede usar Tris, y el pH puede ser de 6-8, preferiblemente de 7,0-7,6.

65 El pH y/o la fuerza iónica apropiados para eluir el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 de un agente de intercambio aniónico fuertemente básico se puede determinar empíricamente y puede variar dependiendo de diversos factores (por ejemplo, el tipo de agente de intercambio aniónico fuertemente básico,

temperatura, etc.). La fuerza iónica del regulador de elución puede proporcionarse mediante diversas sales. Por ejemplo, se puede usar cloruro de sodio para proporcionar la fuerza iónica.

5 Con referencia a los Ejemplos de esta invención, la etapa (b) puede describirse como sigue: Una columna (BPG 100/500, GE Healthcare) empacada con 800 mL de resina Sefarosa Q FF (GE Healthcare), que es una especie de resina de intercambio aniónico fuertemente básica, se equilibra utilizando un regulador de equilibrio (por ejemplo, regulador Tris 10 mM, pH 7,4). A continuación, la solución pretratada obtenida en la etapa (a) se añade a la columna Sefarosa Q y se eliminan las impurezas por lavado, de modo que la mayor parte de la sustancia unida a la resina es el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4. De acuerdo con una realización preferida, se usa regulador de acetato 100 mM (pH 4,0) como regulador de lavado. El análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 puede eluirse usando regulador Tris que contiene cloruro de sodio. La concentración de cloruro de sodio puede ser preferiblemente de 50-500 mM, más preferiblemente de 100-400 mM, más preferiblemente de 200-300 mM.

15 En la etapa (b), la solución pretratada obtenida en la etapa (a) se somete a una primera cromatografía de intercambio iónico para obtener la primera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina.

Etapa (c): Obtención de la segunda fracción mediante cromatografía de adsorción

20 La primera fracción obtenida de la primera etapa de cromatografía de intercambio iónico se somete a cromatografía de adsorción para obtener una segunda fracción que comprende el análogo de eritropoyetina.

25 Durante la cromatografía de adsorción, la separación de la muestra se produce entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria (resina adsorbente) que es sólida debido a la diferencia de adsorptividad.

30 La fase estacionaria que puede usarse en la cromatografía de adsorción de la presente invención incluye preferiblemente sílice, alúmina, óxido de magnesio y fosfato de calcio (preferiblemente, hidroxiapatita), pero no se limita a los mismos. Más preferiblemente, la fase estacionaria puede ser fosfato de calcio, lo más preferiblemente hidroxiapatita. La hidroxiapatita tiene excelente poder de resolución y separación. Cuando se usa hidroxiapatita como fase estacionaria, se puede usar regulador de fosfato como fase móvil.

35 Cuando se usa hidroxiapatita, se puede usar regulador de fosfato como regulador de equilibrado, y el pH puede ser de 6-8, preferiblemente de 6,0-7,0. Se puede usar regulador de fosfato que comprende una sal apropiada (preferiblemente cloruro de sodio) como regulador de elución, y el pH puede ser de 6-8, específicamente de 6,0 - 7,0.

40 Con respecto a los Ejemplos de esta invención, la etapa (c) puede describirse de la siguiente forma: Se equilibra una columna empacada con resina de hidroxiapatita (tipo I o II, 20-40 μm) utilizando un regulador de equilibrado (por ejemplo, regulador de fosfato 20 mM, pH 6,0 - 7,0). A continuación, se añade la primera fracción obtenida en la etapa (b) a la columna de hidroxiapatita y se obtiene el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 no adsorbido como una fracción no adsorbida. Las impurezas de proteína adsorbidas por la resina de hidroxiapatita se pueden eluir usando un regulador de elución (por ejemplo, regulador de fosfato 500 mM, pH 6,0-7,0).

45 Etapa (d): Obtención de la tercera fracción por la segunda cromatografía de intercambio iónico

La segunda fracción obtenida de la etapa de cromatografía de adsorción se somete a una segunda cromatografía de intercambio aniónico para obtener una tercera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina.

50 La segunda cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar utilizando diversas técnicas de cromatografía de intercambio aniónico conocidas en la técnica. Preferiblemente, se puede emplear una cromatografía de intercambio aniónico fuertemente básica.

55 Una resina de intercambio aniónico en la presente invención puede tener grupos funcionales cargados positivamente. Preferiblemente, el grupo funcional cargado positivamente de la resina de intercambio aniónico es amina o amino, más preferiblemente amina primaria, amina secundaria, amina terciaria o amina cuaternaria, lo más preferiblemente amina cuaternaria.

60 En la presente invención, se puede usar poliestireno, poliacrilato, poliestireno/divinilbenceno, celulosa, Sefacel, dextrano, agarosa o Toyopearl, preferiblemente agarosa o poliestireno/divinilbenceno como soporte de la resina de intercambio aniónico.

65 En la presente invención, se puede usar Sefarosa Q, Sefarosa DEAE, SOURCE 15Q, SOURCE 30Q, Capto DEAE o Capto Q, preferiblemente SOURCE 15 Q o SOURCE 30 Q, como un agente de intercambio aniónico.

En la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico de la presente invención, puede usarse cualquier regulador que tenga una potencia reguladora. Por ejemplo, pueden usarse acetato de sodio, fosfato de sodio, glicina-HCl o Tris.

5 Pueden usarse diversos reguladores, en particular regulador de acetato, como regulador de equilibrado, y el pH puede ser de 3-6, preferiblemente de 4-5. Como regulador de lavado, puede usarse un regulador (preferiblemente, regulador de glicina) de pH 2,0-4,0, más preferiblemente 3,0-4,0. Pueden usarse diversos reguladores, particularmente regulador de fosfato, que contiene una sal adecuada (preferiblemente, cloruro de sodio) como regulador de elución, y el pH puede ser de 6-8, preferiblemente de 7,0-7,6. La concentración de la sal, particularmente de cloruro de sodio, contenida en el regulador de elución puede ser preferiblemente 100-500 mM.

15 Con respecto a los Ejemplos de esta invención, la etapa (d) puede ser descrita de la siguiente forma: Una columna (XK 50/30, GE Healthcare) empacada con 800 mL de resina Sefarosa Q SOURCE 15Q o 30Q (GE Healthcare), que es una clase de resina de intercambio aniónico fuertemente básica, se equilibra usando un regulador de equilibrado (por ejemplo, regulador de fosfato 20 mM, pH 6,0-7,0). A continuación, se añade la segunda fracción que comprende el análogo de eritropoyetina obtenido de la etapa de cromatografía de adsorción a la columna SOURCE 15Q o 30Q, y la resina se lava usando un primer regulador de lavado (por ejemplo, regulador acetato 20 mM, pH 4,0-5,0) y un segundo regulador de lavado (por ejemplo, regulador de glicina 20 mM, pH 2,2-2,4).

20 De acuerdo con una realización preferida, la etapa (c) y la etapa (d) se realizan como un único proceso. Dado que la segunda fracción no requiere tratamiento antes de la etapa (d), las columnas de la etapa (c) y la etapa (d) pueden conectarse directamente. En este caso, el tiempo gastado para la etapa (c) y la etapa (d) puede reducirse y la segunda fracción y la tercera fracción se pueden obtener en poco tiempo.

25 De acuerdo con la presente invención, pueden eliminarse eficazmente las isoformas de proteínas excluyendo el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de en la etapa (d). Dado que la pequeña cantidad de impurezas de proteína no adsorbidas en la etapa (c) se eliminan eficazmente en la etapa (d), la fracción que contiene el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 puede obtenerse con alta pureza.

30 El presente método es muy eficaz para la purificación del análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, preferiblemente un factor estimulador de eritropoyesis que tiene cuatro o más cadenas de azúcar enlazadas a N, lo más preferiblemente una NESP.

35 Efectos beneficiosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen de la siguiente manera:

40 (a) La presente invención proporciona un nuevo método para purificar análogos de eritropoyetina (EPO) que tienen un punto isoeléctrico por debajo de 4.

45 (b) Mientras que la EPO de origen natural que tiene tres cadenas de azúcar enlazadas a N comprende hasta 14 residuos de ácido siálico, el análogo de eritropoyetina que tiene cuatro o más cadenas de azúcar enlazadas a N puede comprender más residuos de ácido siálico. El análogo de eritropoyetina que tiene cuatro o más cadenas de azúcar enlazadas a N tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, mientras que la eritropoyetina natural que tiene tres cadenas de azúcar enlazadas a N tiene un punto isoeléctrico de 4 o superior. Por consiguiente, el análogo de eritropoyetina es relativamente más difícil de preparar que la eritropoyetina. Las dificultades para producir el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico bajo causado por sus propiedades fisicoquímicas se resuelven en la presente invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método que permite la producción del análogo de eritropoyetina que tiene un bajo punto isoeléctrico a escala industrial.

50 (c) La presente invención proporciona un método de purificación, por lo que las impurezas proteicas pueden eliminarse eficazmente a través de tres etapas de cromatografía y el análogo de eritropoyetina puede obtenerse con alta pureza.

55 (d) Dado que la cromatografía de adsorción y las segundas etapas de cromatografía de intercambio iónico del presente método de purificación pueden realizarse como un solo procedimiento, se puede reducir el tiempo requerido para la purificación.

60 Descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra brevemente un método preferido para purificar un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 a partir de una solución de cultivo de células animales de acuerdo con la presente invención.

65 La Fig. 2 muestra un cromatograma de una primera fracción que comprende un análogo de eritropoyetina que tiene

un punto isoeléctrico por debajo de 4 obtenido por una primera cromatografía de intercambio iónico en un método de purificación de acuerdo con la presente invención. La flecha indica el pico del cromatograma de la proteína objetivo.

5 La Fig. 3 muestra un cromatograma de una segunda fracción que comprende un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 obtenido por cromatografía de adsorción en un método de purificación de acuerdo con la presente invención. La flecha indica el pico del cromatograma de la proteína objetivo.

10 La Fig. 4 muestra un resultado de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio y tinción de Coomassie de fracciones obtenidas por un método de purificación de acuerdo con la presente invención. La flecha indica las bandas de la proteína objetivo y una NESP estándar.

15 Carril 1: estándar de peso molecular (Bio-Rad)
 Carril 2: solución de cultivo de células animales (filtrada por ultrafiltración)
 Carril 3: primera fracción obtenida a partir de la primera cromatografía de intercambio iónico
 Carril 4: segunda fracción obtenida a partir de la cromatografía de adsorción
 Carril 5: tercera fracción obtenida a partir de la segunda cromatografía de intercambio iónico
 Carril 6: NESP estándar.

20 La Fig. 5 muestra un resultado del enfoque isoeléctrico y tinción de Coomassie de una tercera fracción obtenida en la etapa final de un método de purificación de acuerdo con la presente invención.

25 Carril 1: fracción sometida a una segunda cromatografía de intercambio iónico
 Carril 2: fracción purificada de lavado de pH obtenida a partir de la segunda cromatografía de intercambio iónico
 Carril 3: fracción purificada obtenida a partir de la segunda cromatografía de intercambio iónico
 Carril 4: NESP estándar.

30 La Fig. 6 muestra un cromatograma de una tercera fracción que comprende un análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4 obtenido por una segunda cromatografía de intercambio aniónico en un método de purificación de acuerdo con la presente invención. La flecha indica el pico del cromatograma de la proteína objetivo.

La Fig. 7 muestra un cromatograma de NESP obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño en un método de purificación de acuerdo con la presente invención. La flecha indica el pico del cromatograma de la proteína objetivo.

35 La Fig. 8 muestra un resultado del enfoque isoeléctrico y tinción de Coomassie de una fracción obtenida por cromatografía de adsorción y una segunda cromatografía de intercambio iónico en un método de purificación de acuerdo con la presente invención.

Carril 1: NESP estándar

40 Carril 2: Fracción purificada obtenida a partir de una segunda cromatografía de intercambio iónico

Las Figs. 9a-9d muestran cromatogramas de exclusión por tamaño que muestran la pureza de las fracciones obtenidas a partir de cada etapa del presente método de purificación.

45 Modo para la invención

A continuación, se describirá ahora la presente invención en forma más detallada mediante ejemplos.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Cultivo de células que producen análogos de eritropoyetina

Las células CHO que producen una glicoproteína con cinco aminoácidos (A30N, H32T, P87V, W88N y P90T) de EPO sustituida se cultivaron en un recipiente de 50 litros. Las células se cultivaron mediante cultivo repetido alimentado por lotes, que es uno de los métodos para cultivar células CHO, bien conocido en la técnica. Se utilizó un medio químicamente definido o un medio exento de suero tal como el medio SFM4CHO disponible a través de HyClone. La solución de cultivo se recuperó después de una fase de producción de aproximadamente 5 días. La concentración celular era de 8×10^6 células/mL o superior y la viabilidad celular era de al menos del 95%.

60 Ejemplo 2: Microfiltración y ultrafiltración

Las células y los desechos celulares se retiraron de la solución de cultivo de células animales obtenidas en el Ejemplo 1 usando un filtro de profundidad (Millipore) y un filtro de membrana (Sartorius, 0,2 μm), respectivamente. Posteriormente, el filtrado resultante de la microfiltración se hizo pasar a través de una membrana de ultrafiltración (Millipore, MWCO: 5-30 kDa) con el fin de eliminar sales y sacáridos menores que 5-30 kDa. La diafiltración y la concentración se realizaron usando regulador Tris que tenía un volumen de 10 veces el volumen inicialmente concentrado.

Ejemplo 3: primera cromatografía de intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico se realizó usando el sistema AKTApilot (GE, EE.UU.), y se usó una columna BPG 100/500 (GE) empacada con 800 mL de resina Sefarosa Q FF (GE). La columna se equilibró utilizando regulador Tris 10 mM de pH 7,4 con una velocidad de flujo de 300 mL/min. La columna se lavó usando regulador de acetato 100 mM de pH 4,0 como regulador de lavado, y la proteína adsorbida en el gel de Sefarosa Q FF se eluyó usando un regulador de equilibrado que contenía cloruro de sodio 300 mM. El primer cromatograma de intercambio aniónico resultante se muestra en la Fig. 2.

Ejemplo 4: cromatografía de adsorción

Se realizó la cromatografía de adsorción usando el sistema AKTApurifier, y se usó una columna XK 50/30 empacada con 430 mL de resina de hidroxapatita tipo I o II (20-40 μ m, Bio-Rad). La columna se equilibró utilizando regulador de fosfato 20 mM de pH 6,0-7,0 a una velocidad de flujo de 20 mL/min. La fracción obtenida a partir de la primera cromatografía de intercambio aniónico se hizo pasar a través de la columna, por lo que se recuperó el análogo de eritropoyetina como una fracción no adsorbida. La columna se lavó entonces usando regulador fosfato 500 mM de pH 6,0-7,0 como regulador de lavado para eliminar las impurezas proteicas que quedaban en la columna. Para una segunda cromatografía de intercambio iónico eficaz, se realizó una ultrafiltración (MWCO 5-30 kDa) antes de realizar la cromatografía de adsorción. El cromatograma de adsorción resultante se muestra en la Fig. 3.

Ejemplo 5: segunda cromatografía de intercambio aniónico

La segunda cromatografía de intercambio aniónico se realizó usando el sistema AKTApurifier, y se usó una columna XK 50/30 empacada con 200 mL de resina SOURCE 15Q o 30Q (GE). La columna se equilibró utilizando regulador acetato 20 mM de pH 4,0-5,0 a una velocidad de flujo de 25 mL/min. La columna se lavó usando regulador de glicina 20 mM de pH 2,2-2,4 como regulador de lavado, y se eluyó la proteína adsorbida en el gel SOURCE 15Q o 30Q usando regulador de fosfato que contenía 100-500 mM de cloruro de sodio. Con respecto a cada una de las fracciones, se analizaron la presencia de impurezas (Fig. 4) y la isoforma del análogo de eritropoyetina (Fig. 5) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio y tinción de Coomassie, y por enfoque isoeléctrico y tinción de Coomassie. Se demostró que la fracción final mostró un patrón de banda de proteína similar a la NESP estándar en el análisis de isoformas. El segundo cromatograma de intercambio aniónico resultante se muestra en la Fig. 6. Además, la pureza de las proteínas purificadas obtenidas a partir del segundo cromatograma de intercambio aniónico se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño. La pureza era al menos del 98% como se muestra en la Fig. 7.

Ejemplo 6: Rendimiento simultáneo de la cromatografía de adsorción y la segunda cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de adsorción y la segunda cromatografía de intercambio aniónico se realizaron simultáneamente usando el sistema AKTApurifier. Se conectaron una columna XK 50/30 (GE) empacada con 430 mL de resina de hidroxapatita y una columna XK 50/30 (GE) empacada con 200 mL de resina SOURCE 15Q o 30Q a través de un conector y se equilibraron las columnas usando regulador de fosfato 20 mM de pH 6,0-7,0 (regulador de equilibrado) a una velocidad de flujo de 20 mL/min. A continuación, se pasó la fracción obtenida de la primera cromatografía de intercambio aniónico a través de una membrana de ultrafiltración (MWCO: 5-30 kDa) y se añadió el filtrado resultante a la columna conectada a la misma. A continuación, se eliminaron las impurezas proteicas no adsorbidas en la columna inyectando un regulador de equilibrio a una velocidad de flujo de 20 mL/min. Después del lavado, se retiró la columna de hidroxapatita y sólo se montó la columna SOURCE en el sistema AKTApurifier. A continuación, se eluyó la proteína objetivo de la misma forma que se describe en el Ejemplo 5. La isoforma del producto final de purificación se analizó mediante enfoque isoeléctrico y tinción de Coomassie (Fig. 8). Como resultado, se demostró que no había diferencia en la pureza del producto final entre el método en el que se llevaron a cabo la cromatografía de adsorción y la segunda cromatografía de intercambio iónico independientemente y una en la que la cromatografía de adsorción y la segunda cromatografía de intercambio iónico se realizaron secuencialmente como un solo proceso. Además, se demostró que la fracción final mostraba un patrón de banda proteica similar a la NESP estándar.

Ejemplo 7: Análisis de las fracciones de cada etapa

Cada fracción y patrón de peso molecular se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio y gradiente de 4-12% (SDS-PAGE) durante 1 hora bajo un voltaje constante de 150 V. Después de la electroforesis, se tiñó el gel durante 30 minutos con tinción de Coomassie.

Se sometieron a electroforesis 10 μ g de cada fracción en un gel de enfoque isoeléctrico (IEF) al 2-5% por cada hora bajo cuatro etapas de voltaje constante de 100 V, 200 V, 400 V y 550 V. Después de las electroforesis, se tiñó el gel durante 30 minutos con tinción de Coomassie.

Ejemplo 8: Establecimiento de un proceso de purificación a escala piloto

Se estableció un proceso de purificación a escala piloto utilizando el método de purificación de la presente invención. El rendimiento de cada etapa de purificación y el rendimiento final se presentan en la Tabla 1. Se demostró que se podía lograr un alto rendimiento, aunque se eliminaron las isoformas que tenían un alto punto isoeléctrico para mejorar la pureza y calidad como medicamento.

5

[Tabla 1]

Etapa de purificación	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Contenido de proteína (mg)	Pureza (%)	Contenido (mg)	Rendimiento total (%)
Concentrado de cultivo	6780	0,5	3390,0	22,4	759,4	-
Primera cromatografía aniónica	2466	0,3	813,8	60,1	489,1	60,1
Cromatografía de adsorción	4695	0,1	469,5	94,0	441,3	54,2
Segunda cromatografía aniónica	424	0,4	148,4	99,0	146,9	18,1

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para purificar un análogo de eritropoyetina (EPO) que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4, que es una nueva proteína estimuladora de eritropoyesis (NESP) que tiene cinco cadenas de azúcar enlazadas a N que comprende:
- 10 (a) Obtener una solución pretratada mediante la eliminación de células animales de una solución de cultivo de las células animales, en donde las células animales expresan el análogo de eritropoyetina que tiene un punto isoeléctrico por debajo de 4;
- 10 (b) Obtener una primera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la solución pretratada a una primera cromatografía de intercambio aniónico, en donde se usa un regulador de pH por debajo de 4,0 como regulador de lavado en la primera cromatografía de intercambio aniónico;
- 15 (c) Obtener una segunda fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la primera fracción a una cromatografía de hidroxapatita; y
- 15 (d) Obtener una tercera fracción que comprende el análogo de eritropoyetina sometiendo la segunda fracción a una segunda cromatografía de intercambio aniónico, en la que se usa un regulador de pH 2,0-4,0 como regulador de lavado en la segunda cromatografía de intercambio aniónico.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células animales que expresan el análogo de eritropoyetina comprenden células de ovario de hámster chino (CHO), VERO, HeLa, W138, de riñón de hámster bebé (BHK), COS o de riñón de perro Madin-Darby (MDCK).
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (a) se realiza mediante (i) filtración a través de un filtro de profundidad y un filtro de membrana seguido de ultrafiltración o (ii) centrifugación seguida de ultrafiltración.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (c) y la etapa (d) se realizan como un único proceso.

Fig. 1

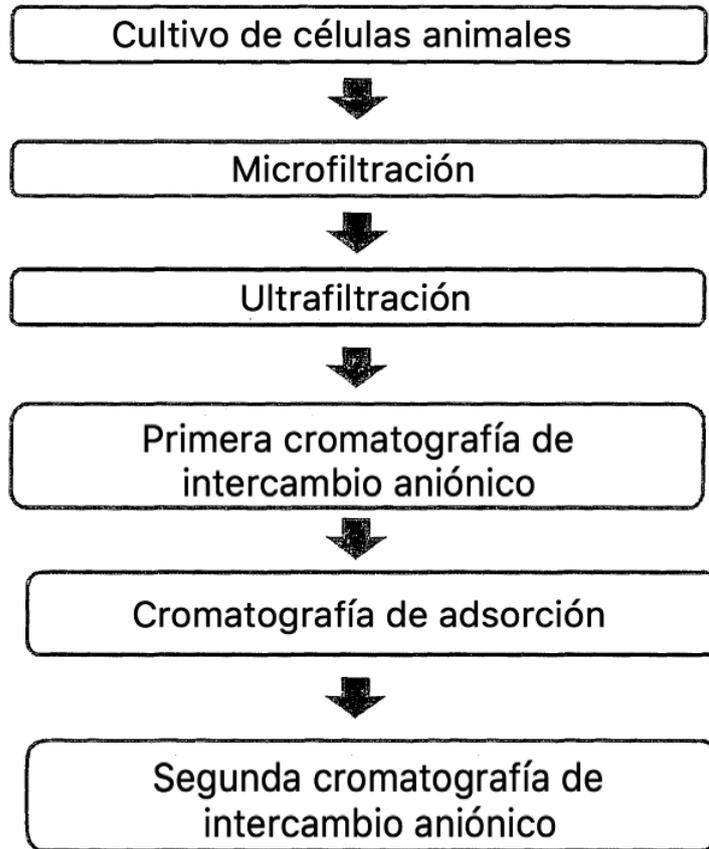


Fig. 2

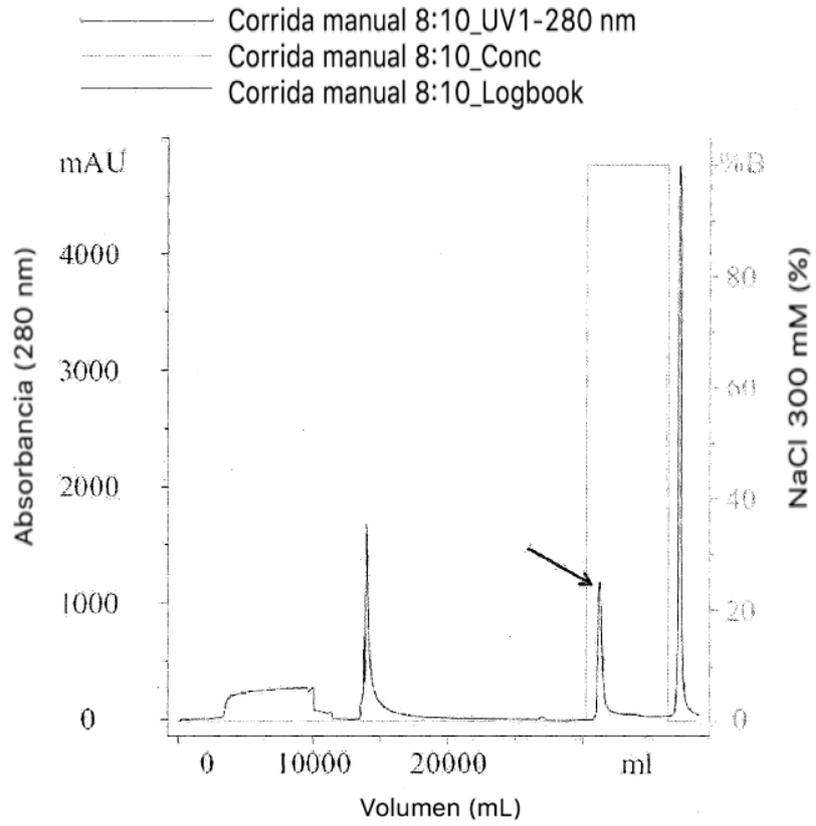


Fig. 3

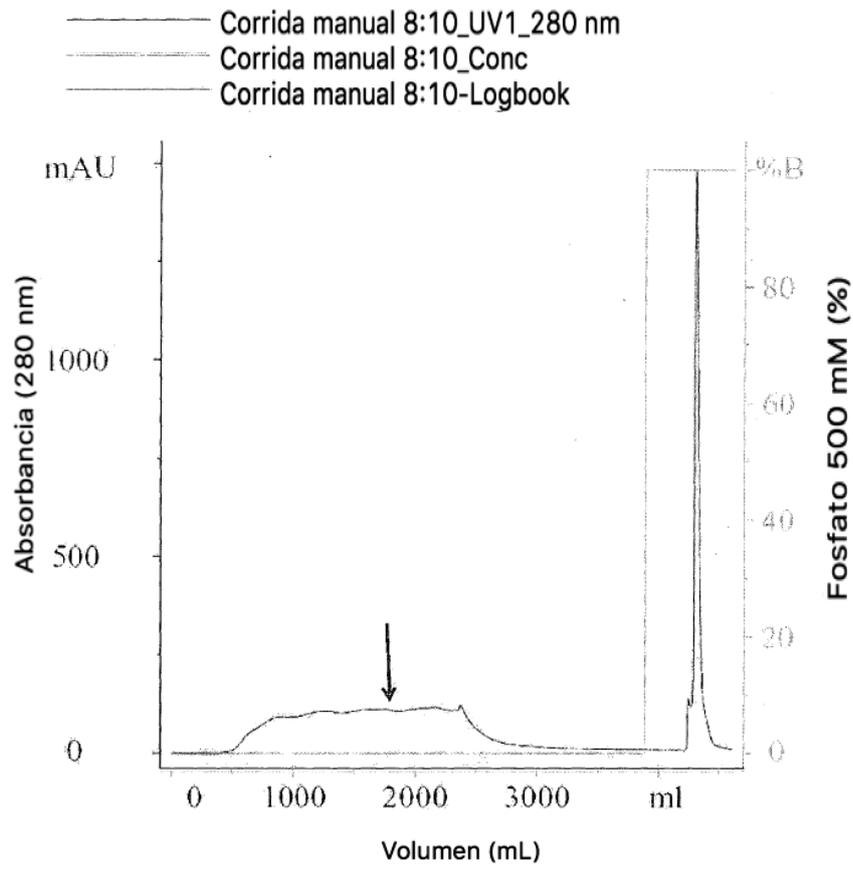


Fig. 4

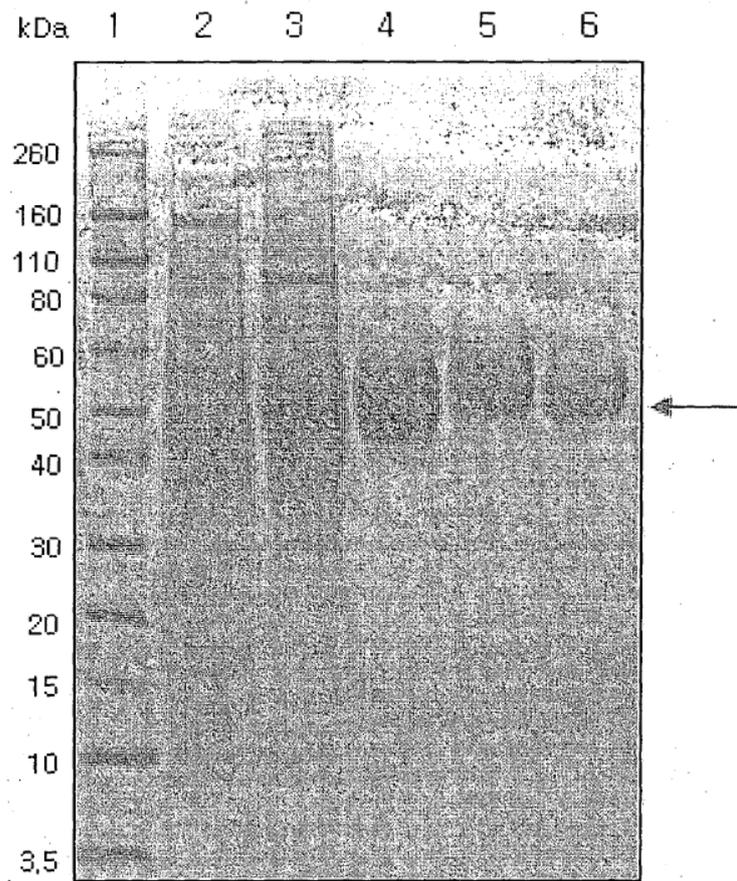


Fig. 5

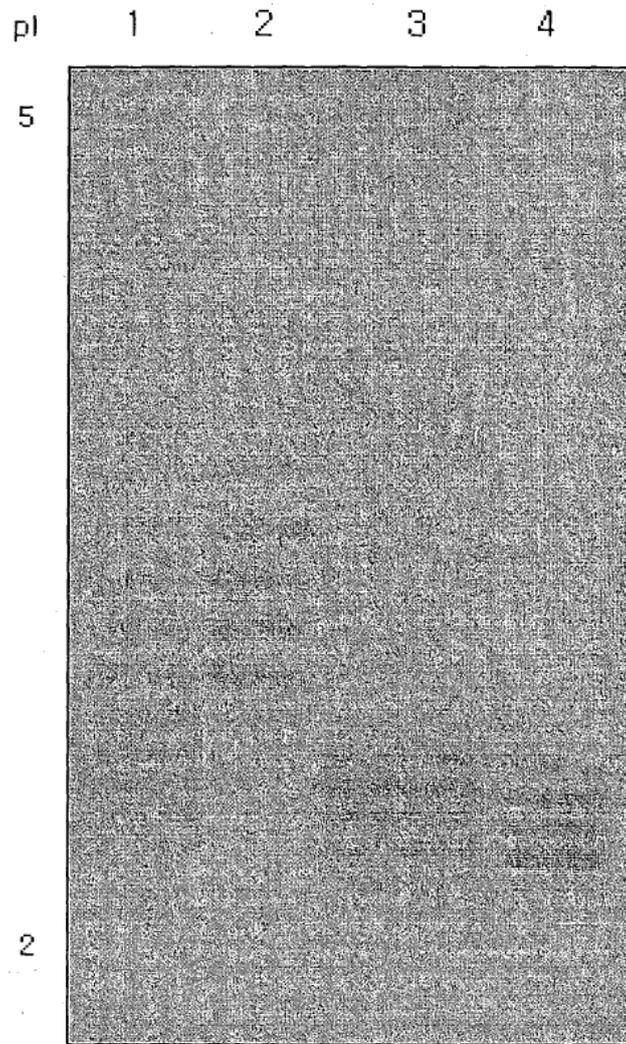


Fig. 6

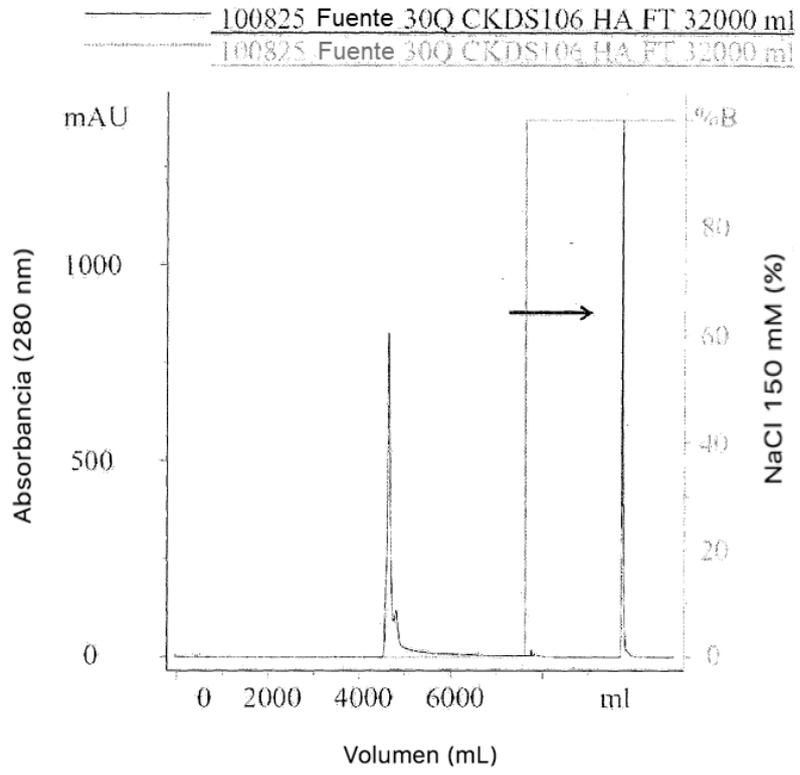


Fig. 7

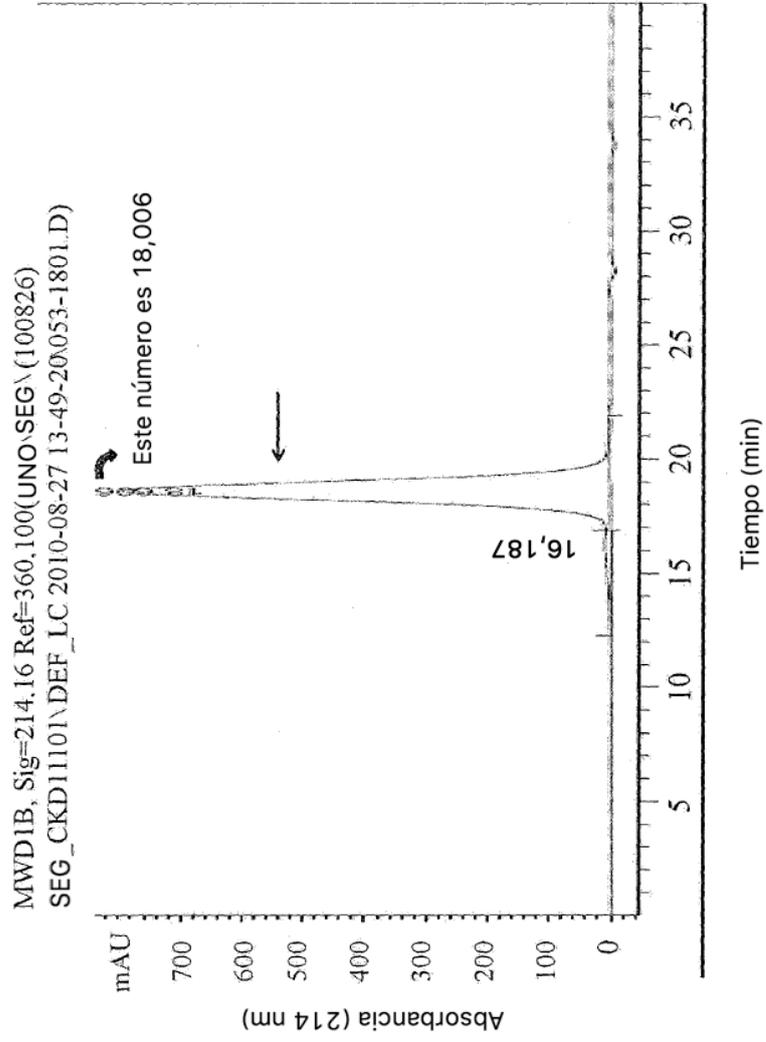


Fig. 8

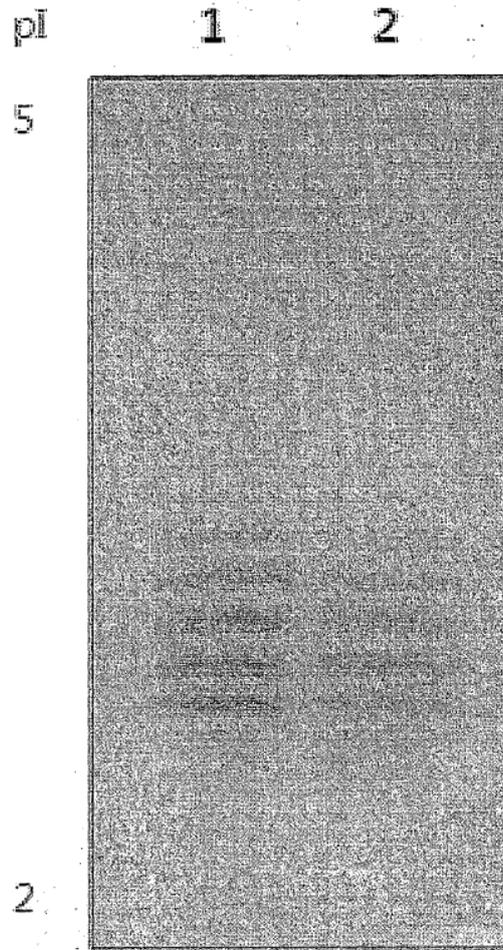


Fig. 9a

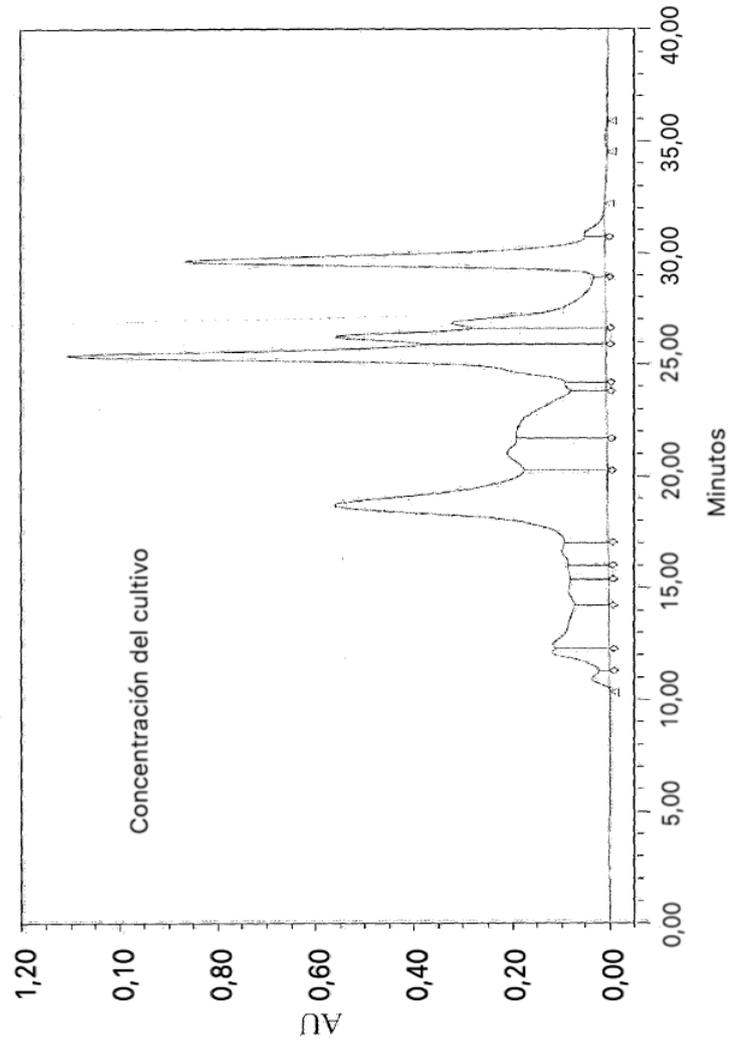


Fig. 9b

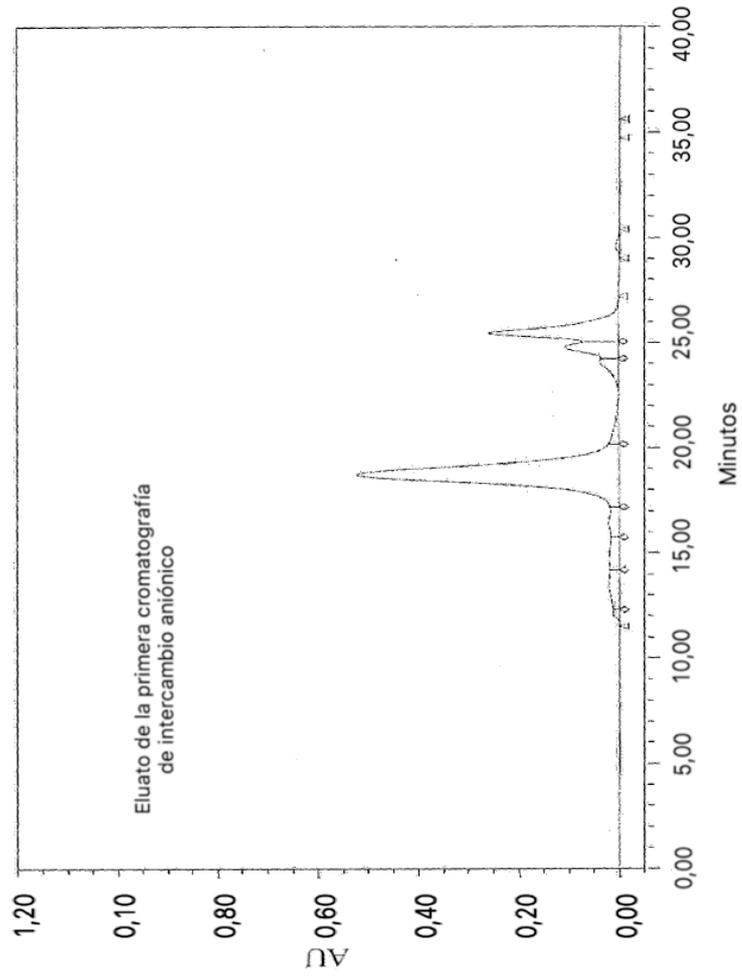


Fig. 9c

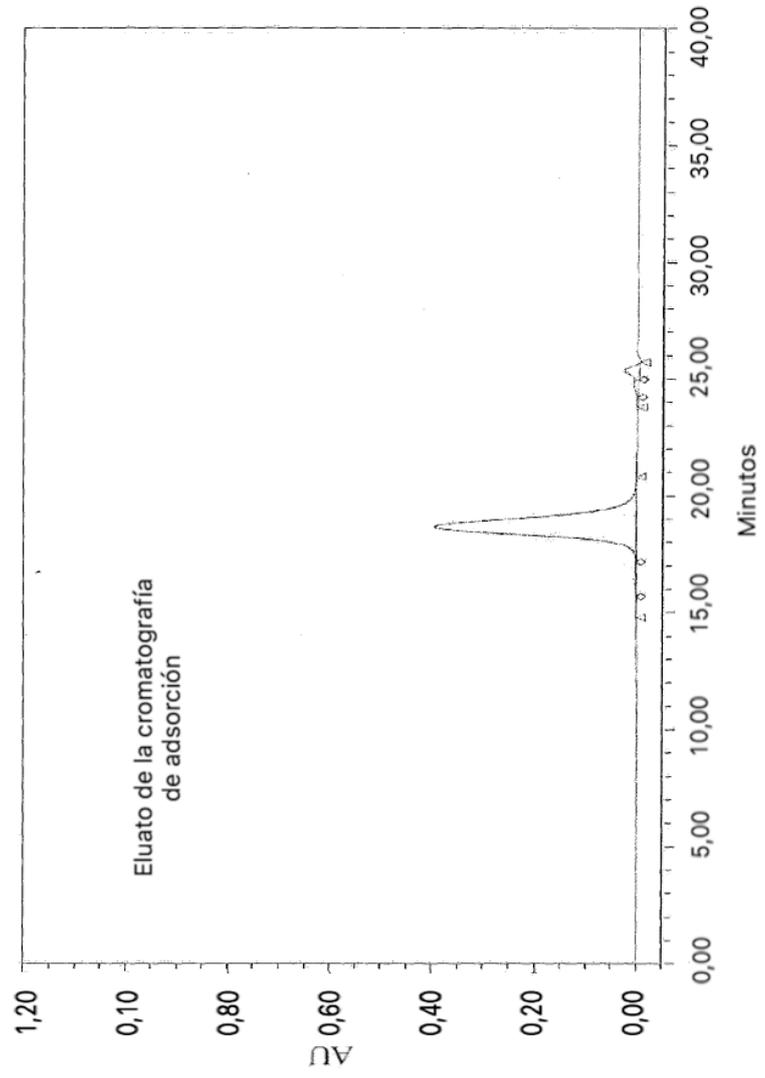


Fig. 9d

