



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 20 451 T2 2008.01.24**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 492 878 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 20 451.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB02/00971**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 716 973.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/080852**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.03.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.10.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.01.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 21/00 (2006.01)**

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(73) Patentinhaber:
**Lek Pharmaceutical and Chemical Co. D.D.,
Ljubljana, SI**

(74) Vertreter:
Spott, Weinmiller & Böhm, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:
**SVETINA, Monica, 1000 Ljubljana, SI; SVETEK,
Jelka, 1000 Ljubljana, SI; GANTAR-KSELA, Mateja,
1000 Ljubljana, SI; BRINC, Matjaz, 1000 Ljubljana,
SI; FRANCKY, Andrej, 1000 Ljubljana, SI**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN FÜR DIE HERSTELLUNG EINES GEWÜNSCHTEN PROFILS VON ERYTHROPOIE-
TIN GLYKO-ISOFORMEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung von Erythropoetin (EPO) unter Verwendung einer spezifischen Kombination aus chromatographischen Schritten. Dieses Verfahren ermöglicht die Herstellung von Erythropoetin mit hoher Reinheit und mit einem gewünschten Profil an EPO Glycoisofomen.

[0002] EPO ist ein Glycoprotein, das eine Hauptrolle bei der Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen für Erythrocyten spielt. EPO, das durch rekombinante DNA Technologie erhalten wird (rekombinantes EPO), wird für die klinische Anwendung verwendet.

[0003] EPO kommt als Gemisch aus Glycoisofomen vor, die sich in der Anzahl an geladenen Kohlenhydratresten des Proteins unterscheiden. Die Gruppe aus unterschiedlichen Gemischen der EPO Glycoisofomen umfasst EPO-alpha, EPO-beta und EPO-omega.

Beschreibung des Stands der Technik

[0004] EPO und Verfahren zur Herstellung sind beispielsweise in EP 0 148 605 A, EP 0 205 564 A und EP 0 255 231 A beschrieben.

[0005] EPO kann aus unterschiedlichen Quellen isoliert werden, die auch genetisch veränderte Säugerzellen umfassen. Verfahren zur Isolierung/Reinigung, die aus der Wissenschafts- und Patentliteratur bekannt sind, umfassen mehrere chromatographische Schritte. Die am meisten verwendeten sind Anionenaustauschchromatographie und Umkehrphasen HPLC (RP-HPLC). Andere chromatographische Verfahren werden ebenfalls verwendet: Hydroxyapatit-, hydrophobe, Kationenaustausch-, Affinitäts- (das heißt Immunaффinitäts-) und Größenausschluss-(Gelfiltrations-)Chromatographien. Einige Zwischenschritte sind auch herkömmlich: Aussalzung, Konzentration, Diafiltration, Ultrafiltration, Dialyse, Fällung mit Ethanol und andere.

[0006] Verfahren zur Isolierung von EPO sind in mehreren europäischen Patenten und Patentanmeldungen und auch in der Wissenschaftsliteratur beschrieben.

[0007] Verfahren zur Isolierung von EPO, die die Verwendung von RP-HPLC umfassen, sind beschrieben in EP 0 205 564 A, EP 0 148 605 A, EP 0 830 376 A, EP 0 267 678 A, EP 0 228 452 A, EP 1 127 063 A, EP 0 209 539 A und Lai et al. (1986) J. Biol. Chem., 261(7): 3116–3121, Broudy et al. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 265(2): 329–336, Zou et al., (1998) Se Pu, Inuue et al. (1994) Biol. Pharm Bull 17(2): 180–184, Qian et al., (1986) Blood, 68(1): 258–262, Krystal et al. (1986) Blood 67(1): 71–79 und Lange et al (1984) Blood Cells, 10(2–3): 305–314. RP-HPLC erfordert in den meisten Fällen die Verwendung von organischen unpolaren Lösemitteln. Die organischen unpolaren Lösemittel sind toxisch, verschmutzen die Umwelt und sind schwierig von den gewünschten Proteinen zu trennen.

[0008] Verfahren zur Isolierung von EPO, die Immunaффinitätschromatographie mit gebundenen monoklonalen Antikörpern umfassen, sind beschrieben in: Sasaki et al. (1987) Methods Enzymol, Yanagawa et al. (1984) J. Biol. Chem, 259(5): 2707–2710 und Ghanem et al. (1994) Prep. Biochem. 24(2): 127–142. Monoklonale Antikörper sind Säugerproteine, ihre Stabilität für die Reinigung im großen Maßstab ist fraglich und Cleaning-in-place und desinfizierende Reinigungen sind schwer auszuführen. Es besteht auch ein Infektionsrisiko mit Viren.

[0009] In EP 0 358 463 A ist eine Kombination aus Ionenaustauschchromatographie und Chromatographie mit gebundenem Lektin zur Isolierung von EPO beschrieben. Dieses Verfahren ergibt nur eine geringe Ausbeute.

[0010] Die Verwendung einer Lektinmatrix in einer Kombination mit Aussalzung und Gelfiltration ist in EP 1010 758 A beschrieben. Es wird erneut eine geringe Ausbeute erhalten.

[0011] Die Verwendung einer Dihydroxyboronilmatrix zur Reinigung von EPO ist in EP 0 820 468 A beschrieben. Es führt zu einer geringen Reinheit, die nicht in der Humanmedizin verwendbar ist.

[0012] Die EP 1 127 063 A beschreibt die Isolierung von EPO durch Fällung mit Ammoniumsulfat, hydrophober Chromatographie, Anionen- und Kationenaustauschchromatographien, Gelfiltration oder unterschiedlichen Kombinationen der beschriebenen Chromatographien. Dieses Verfahren liefert EPO, das in einem großen Maßstab mit einer hohen Reinheit hergestellt werden kann, das zur Verwendung in der Humanmedizin geeignet ist. Die Verwendung von Ammoniumsulfat kann Probleme mit der Maßstabsvergrößerung verursachen, es ist zusätzliche Ausrüstung erforderlich und es besteht ein Bedarf, die Phasen zu wechseln.

[0013] Die EP 0 984 062 A beschreibt die Isolierung von EPO mittels: Chromatographie mit dem Matrixgebundenen Farbstoff, hydrophober Chromatographie, Hydroxyapatitchromatographie und Anionenaustauschchromatographie. Weder die Isolierung eines gewünschten Profils an Isoformen noch die Möglichkeit der Veränderung der EPO Glycoisoformen mit einer Kombination des chromatographischen Schritts ist beschrieben.

[0014] In der EP 0 640 619 A ist die Isolierung von spezifischen EPO Glycoisoformen unter Verwendung der Anionenaustauschchromatographie beschrieben. Es gibt jedoch keine Beschreibung über ein Verfahren zur Herstellung eines Gemisches aus unterschiedlichen EPO Glycoisoformen. Ferner ermöglicht das Verfahren nicht die Isolierung von EPO mit hoher Reinheit.

[0015] Die EP 0 428 267 A beschreibt ein Verfahren zur Isolierung von spezifischen EPO Glycoisoformen, das einen präparativen isoelektrischen Fokussierungsschritt und ein Verfahren zur Isolierung von Gemischen der EPO Glycoisoformen mit 12 oder mehr Sialinsäuren pro Molekül, das einen Anionenaustauschchromatographieschritt umfasst, der nach RP-HPLC Reinigungsschritten ausgeführt wird. Ferner erlaubt das Verfahren keine erwünschte Kontrolle des gewünschten Isoformengemisches, speziell jene mit weniger als 12 Sialinsäuren. Weder die Isolierung des gewünschten Profils der Isoformen noch die Möglichkeit der Veränderung der EPO Glycoisofomen mit einer Kombination aus chromatographischen Schritten ist beschrieben.

[0016] Es ist ein Verfahren zur Isolierung der genauen Anzahl der EPO Glycoisoformen eines EPO Analogons in EP 1 037 921 A beschrieben. Das Verfahren verwendet RP-HPLC.

[0017] Die Trennung der spezifischen EPO Glycoisoformen durch die Verwendung der isoelektrischen Kapillarfokussierung ist in Cifuentes et al. (1999) J. Chromatogr. A. 15(2): 453–463 beschrieben. Jedoch wird in diesem Verfahren Harnstoff verwendet, der klinische Anwendungen hemmt. Die Verwendung der Kapillarisoelektrofokussierung ist nicht für eine Herstellung in großem Maßstab in der Industrie geeignet.

[0018] Die Abtrennung von EPO Glycoisoformen durch ein Verfahren, das unterschiedliche chromatographische Verfahren verwendet, ist auch in Gokana et al. (1997) J. Chromat. A. 791: 109–118 beschrieben. Das Verfahren umfasst die Verwendung der Immunaффinitätschromatographie mit gebundenen monoklonalen Antikörpern. Dies erhöht das Risiko für eine mögliche virale Infektion, die für klinische Anwendungen schädlich ist, wobei die Stabilität für eine Herstellung in großem Maßstab fraglich ist und das Cleaning-in-Place und die desinfizierenden Reinigungen schwierig auszuführen sind. Ferner umfasst es die Verwendung von RT-HPLC, für die gewöhnlich toxische, organische Lösemittel erforderlich sind. Es ist daher schwierig, dieses System für eine industrielle Anwendung zu verwenden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Es ist ein Ziel der Erfindung, das Verfahren zur Herstellung von EPO zu verbessern. Die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren zur Herstellung von EPO nach Anspruch 1 und den folgenden Ansprüchen.

[0020] Der Ausdruck "EPO Glycoisoform" bezieht sich auf die EPO Herstellung mit einem einzigen pl und weist dieselbe Aminosäuresequenz auf. Unterschiedliche EPO Glycoisoformen unterscheiden sich vorwiegend durch den Gehalt an geladenen Kohlenhydratresten (Sialinsäuren) pro EPO Molekül.

[0021] Der Gehalt an Sialinsäuren trägt zur Azidität einer EPO Glycoisoform bei und definiert daher die Position jeder Bande im Gel der isoelektrischen Fokussierung (IEF).

[0022] Die Nummerierung der Bandenpositionen im IEF Gel ist willkürlich. Höhere Nummern zeigen eine erhöhte Azidität an, das heißt einen höheren Gehalt an Sialinsäuren. Demnach enthält EPO alpha (Epoetin alfa-Eprex[®]) EPO Glycoisoformen von 3 bis 8, BRP Standard (ein Referenzstandard der Europäischen Pharmakopöe-Erythropoetin BRP Batch 1) enthält die EPO Glycoisoformen 1 bis 8, EPO beta (Epoetin beta-Neorecormon[®]) enthält die EPO Glycoisoformen 1 bis 8. Der BRP Standard dürfte eine 50:50 Mischung der zwei EPO Präparationen sein, die derzeit auf dem europäischen Markt erhältlich sind (Epoetin alfa und Epoetin

beta).

[0023] Gemäß Lai et al. (1986) J. Biol. Chem. und EP 0 428 267 A ist EPO alpha als Gemisch an EPO Glycoisoformen beschrieben, die 9 bis 14 Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül enthalten und diese EPO Glycoisoformen können dementsprechend den willkürlichen Nummern 3 bis 8 zugeordnet werden (für die Präsentationen der EPO Glycoisoformen dieser Erfindung verwendet).

[0024] Das essentielle Element der Erfindung ist die Bildung von EPO mit hoher Reinheit und mit einem erwünschten Profil der EPO Glycoisoformen unter Verwendung einer Kombination an spezifischen chromatographischen Schritten auf eine Weise, dass das Ausgangsprofil der EPO Glycoisoformen verändert oder modifiziert ist. Die chromatographischen Schritte, die im erfindungsgemäßen Verfahren angewendet werden, umfassen zumindest (a) Farbstoffaffinitätschromatographie und (b) hydrophobe Chromatographie und (c) Anionenaustauschchromatographie. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner (d) Gelfiltrationschromatographie.

[0025] Im Verfahren zur Herstellung von EPO gemäß der Erfindung wird das Profil der EPO Glycoisoformen durch jeden der oben erwähnten chromatographischen Schritte verändert oder modifiziert. Die Performance aller chromatographischer Schritte (a) bis (c) vorzugsweise mit (d) erlaubt es, ein reineres, vorbestimmteres EPO Glycoisoformenprofil zu erhalten. Es ist daher möglich, das Profil der EPO Glycoisoformen während des Reinigungsprozesses zu kontrollieren und daher eine exakte und gewünschte Mischung der EPO Glycoisoformen (EPO alpha, EPO beta und andere) mit hoher Reinheit zu erhalten.

[0026] Das gewünschte Profil der EPO Glycoisoformen wird geeigneterweise durch das Einstellen der bestimmten Prozessfaktoren, Auswahl geeigneter Matrices für die oben erwähnten Chromatographieschritte, Anwendung von geeigneten Bedingungen in den Wasch-/Elutionsschritten der jeweiligen chromatographischen Verfahren und/oder Sammeln von geeigneten Fraktionen, die aus den Chromatographiesäulen eluiert werden.

[0027] Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhafterweise mit einem Verfahren zur Analyse des Profils der EPO Glycoisoformen kombiniert werden, indem die EPO enthaltenden Proben, die an ausgewählten Zwischenschritten während eines Mehrschrittverfahrens zur Herstellung von EPO in Form eines Glycoisoformengemisches und wahlweise auch zu Beginn und/oder am Ende des gesamten Prozesses erhalten werden, einer IEF mit einer geeigneten Gelmatrix, wie Polyacrylamid unterzogen werden und dann eine Immundetektion auf einer festen Phase ausgeführt wird. Das heißt die Analyse wird als Zwischenprozessschritt im Verlauf des Isolierungs- und Reinigungsprozesses vorzugsweise mindestens zweimal ausgeführt. Die Immundetektion kann auf der Basis der Western Blottechnik auf einer geeigneten Membran ausgeführt werden, wie einer Nitrozellulosemembran. Durch dieses Verfahren wird eine in-Prozesskontrolle der Proben während des Reinigungsverfahrens ermöglicht. Das Verfahren ist daher zur Forschung, Verfahrensoptimierung und zur industriellen Anwendung der Verfahren zur Herstellung von EPO mit einem spezifischen und gewünschten Profil an EPO Glycoisoformen brauchbar. Wenn es mit dem Verfahren zur Herstellung eines EPO mit einem gewünschten EPO Glycoisoformenprofil der Erfindung, wie dies oben definiert ist, kombiniert wird, erlaubt die in-Prozessanalyse eine Inline-Kontrolle an ausgewählten Chromatographieschritten, optional vor und nach jedem Schritt. Es ermöglicht eine Kontrolle über die Wirksamkeit der gewünschten Profiländerung der EPO Glycoisoformen und die Bedingungen, die bei den Reinigungsschritten in Bezug auf das gewünschte EPO Glycoisoformenprofil angepasst werden können. Es ermöglicht daher eine gezielte Entwicklung und Produktion von EPO. Eine Profilsteuerte Produktion von EPO kann daher ausgeführt werden. Es kann daher eine hohe und gleichförmige Produktspezifität und eine hohe Produktqualität aufrechterhalten werden.

[0028] Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine Herstellung im großen Maßstab (große Mengen) von biologisch wirksamem EPO mit hoher Reinheit und einem gewünschten Profil der EPO Glycoisoformen. Es ist daher zur industriellen Herstellung von EPO geeignet.

[0029] Mit der vorliegenden Erfindung können mehrere Vorteile zur gleichen Zeit erhalten werden. Das Verfahren der Erfindung liefert ein gewünschtes Profil der EPO Glycoisoformen. Die EPO Reinheit ist hoch durch das Erreichen einer Reinheit, die zumindest 99% der gesamten Proteine überschreitet und vorteilhafterweise 99,9% der gesamten Proteine überschreitet, wie dies durch HPLC und Gelelektrophorese bestimmt wird. Das Verfahren ist zur Herstellung von EPO im großen Maßstab geeignet. Da es nicht erforderlich ist, den RP-HPLC Reinigungsschritt auszuführen, können toxische unpolare organische Lösemittel vermieden werden. Ferner werden weder Proteine noch andere Substanzen tierischen Ursprungs verwendet. Daher wird das Kontaminationsrisiko durch Viren und dergleichen und somit das Infektionsrisiko von Patienten vermieden und die klinische Sicherheit wird verbessert. Das erhaltene EPO ist zur Verwendung in der Humanmedizin geeignet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0030] Die [Fig. 1](#) zeigt die Trennung der EPO Glycoisoformen in den Proben von Überständen am 6., 10. und 11. Tag der Kultivierung der CHO Zellen, die EPO exprimieren. Die Trennung wird mittels IEF und Immundetektion auf einer Membran gemäß Beispiel 1 ausgeführt.

[0031] Die [Fig. 2](#) zeigt die Profile der relativen Anteile der EPO Glycoisoformen in den Proben, die von CHO Zellsuspensionskulturen abgeleitet sind, die in [Fig. 1](#) gezeigt sind.

[0032] Die [Fig. 3](#) zeigt die Profile der relativen Anteile der EPO Glycoisoformen nach der Elution aus einer Farbstoffaffinitätschromatographiesäule in Abhängigkeit der pH Bedingungen, die für den Elutionspuffer in Beispiel 2a verwendet werden.

[0033] Die [Fig. 4](#) zeigt das Elektrophoretogramm der EPO Glycoisoformen nach IEF und Immundetektion von EPO auf einer Membran, wie dies in Beispiel 2b erhalten wurde.

Spur 1: Probe nach Elution aus einer Farbstoffaffinitätschromatographiesäule (1. Schritt des Reinigungsverfahrens) (Beispiel 2a, Puffer B, pH 7,0)

Spur 2: Zellkulturüberstand (vor dem 1. Schritt des Reinigungsverfahrens)

Spur 3: Probe nach der Elution aus einer hydrophoben Chromatographiesäule.

[0034] Die [Fig. 5](#) zeigt die Profile der relativen Anteile von verschiedenen EPO Glycoisoformenfraktionen nach der Ausführung der hydrophoben Chromatographie mit einer Gradientenelution aus der Säule, wie dies in Beispiel 2c erhalten wurde.

[0035] Die [Fig. 6](#) zeigt das Elektrophoretogramm der EPO Glycoisoformen nach der Ausführung einer Anionenaustauschchromatographie DEAE Säule, wie dies in Beispiel 2d erhalten wurde und durch IEF und Immundetektion von EPO auf einer Membran analysiert wurde.

Spur 1: Eluat von der DEAE Säule

Spur 2: EPO BRP Standard

[0036] Die [Fig. 7](#) zeigt Profile der relativen Anteile an unterschiedlichen EPO Glycoisoformenfraktionen nach der Ausführung einer Anionenaustauschchromatographie mit einer Gradientenelution aus der DEAE Säule, wie dies in Beispiel 2e erhalten wurde.

[0037] Die [Fig. 8](#) zeigt die Profile der relativen Anteile von unterschiedlichen EPO Glycoisoformenfraktionen nach der Ausführung einer weiteren Anionenaustauschchromatographie mit einer Gradientenelution von der Source 15Q Säule, wie dies in Beispiel 2f erhalten wurde.

[0038] Die [Fig. 9](#) zeigt die Profile der relativen Anteile von unterschiedlichen EPO Glycoisoformenfraktionen nach der Ausführung einer Gelchromatographie, gefolgt von IEF Analyse (Beispiel 2g).

[0039] Die [Fig. 10](#) zeigt die Profile der relativen Anteile der EPO Glycoisoformen, die in den vereinigten Fraktionen nach der Gradientenelution aus DEAE und Source 15 Q Säulen vorhanden sind, im Vergleich mit EPO Standards (Beispiel 2h).

[0040] Die [Fig. 11](#) zeigt die Profile der relativen Anteile der EPO Glycoisoformen nach 3 aufeinanderfolgenden Chromatographieschritten, die Farbstoffaffinitäts-, hydrophobe und Anionenaustauschchromatographieschritte umfassen, wie dies mit IEF analysiert wird. Zum Vergleich werden EPO alpha und nicht gereinigtes EPO aus dem Zellkulturüberstand eines Bioreaktors durch IEF analysiert. In diesem besonderen Fall wird die Isoform 8 aufgrund einer geringen Menge des auf das Gel aufgetragenen Materials nicht detektiert.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0041] Die Erfindung betrifft unterschiedliche Wege der Anwendung spezifischer chromatographischer Methoden. Gemäß des Grundkonzepts der Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Erythropoetin (EPO) in Form eines Glycoisomengemisches das Unterziehen einer EPO enthaltenden Zusammensetzung der chromatographischen Schritte aus (a) Farbstoffaffinitätschromatographie und (b) hydrophober Chromatographie und (c) Anionenaustauschchromatographie, worin das EPO Glycoisomengemisch nach den chromatographischen Schritten relativ zu der EPO enthaltenden Ausgangszusammensetzung verändert ist. Der Ausdruck EPO Glycoisomengemisch gemäß der Erfindung meint ein Gemisch aus definierten EPO Glycoisomeren.

men, die in verschiedenen Anteilen im Gesamtgemisch enthalten sind. Es wurde festgestellt, dass es durch diese Schritte (a) und (b) möglich ist, das Profil durch die Verringerung und vorzugsweise Eliminierung des Anteils an EPO Glycoisoformen mit einer geringen Anzahl von beispielsweise bis zu 3, vorzugsweise bis zu 4 und vor allem bis zu 5 (einschließlich 5) Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül zu verringern und vorzugsweise zu eliminieren. Die Verringerung oder vorzugsweise Eliminierung des Anteils dieser EPO Glycoisoformen mit geringer Anzahl ist für das erhaltene EPO Produkt in Bezug auf Stabilität und biologischer Aktivität hilfreich.

[0042] Die EPO enthaltende Ausgangszusammensetzung, die den chromatographischen Schritten und so der Veränderungen des Profils unterzogen wird, ist geeigneterweise eine Zusammensetzung, die aus dem Überstand einer Zellkultur oder eines Wachstumsmediums erhalten wird, in das rekombinantes humanes EPO (rHuEPO) exprimiert wird. rHuEPO wird aus genetisch transfizierten Säugerwirtszellen exprimiert, beispielsweise Quarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO) oder Babyhamsternierenzellen (BHK). Die Zellen können in Rollflaschen, Rollkolben oder Bioreaktoren kultiviert werden. Das Zellwachstum und die Kultivierung können durch ein Batchverfahren oder durch kontinuierliches Verfahren ausgeführt werden. Wenn ein kontinuierliches Verfahren ausgeführt wird, kann es als Perfusionskultur in einem Bioreaktor und einem kontinuierlichen Ernten für einen angemessenen Zeitraum ausgeführt werden. Um die Zellen und möglicherweise andere kontaminierende Materialien aus dem Kulturmedium zu entfernen, kann der Überstand einem Fällungsschritt unterzogen werden, beispielsweise mittels Ammoniumsulfat. Vorzugsweise wird der Überstand einer Filtration unterzogen. Die EPO enthaltende Lösung oder das Filtrat werden dann auf die Farbstoffaffinitätssäule aufgetragen.

[0043] Die Farbstoffaffinitätschromatographie in Schritt (a) wird mit einem geeigneten Matrixgebundenen Farbstoff, vorzugsweise mittels eines Triazinfarbstoffs ausgeführt. Der besonders bevorzugte Matrix-gebundene Farbstoff ist Cibachron 3G und ein geeignetes Säulenmaterial ist Blue Sepharose 6 Fast Flow. Ein Faktor, durch den das EPO Glycoisoformenprofil beeinflusst werden kann, ist der pH des Elutionspuffers. Der pH des Elutionspuffers wird vorzugsweise auf einen Bereich von 5,0 bis 9,0, bevorzugter 6,0 bis 8,0 eingestellt. Es können unterschiedliche Elutionen verwendet werden, vorzugsweise lineare (Gradienten-) oder Stufenelution, am bevorzugtesten Stufenelution. Es können unterschiedliche Salze für die Elution verwendet werden, vorzugsweise NaCl und KCl, am bevorzugtesten NaCl.

[0044] Die hydrophobe Chromatographie in Schritt (b) wird mit einer hydrophoben Matrix ausgeführt. Ein geeignetes Matrixmaterial ist Sepharose, das durch hydrophobe Gruppen modifiziert wird, wie Alkylgruppen, wie dies beispielhaft dargestellt wird durch Butyl- oder Arylgruppen, wie dies beispielhaft durch Phenyl dargestellt wird. Eine gute Verringerung oder Eliminierung des Anteils an EPO Glycoisoformen mit einer geringeren Anzahl an Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül kann durch die Verwendung von Sourcematrix (Polystyroldivinylbenzol) Materialien erhalten werden, die hydrophobe Gruppen aufweisen, wie Isopropyl, Phenyl oder Ether, Toyopearlmatrixes mit hydrophoben Gruppen, wie Phenyl, Butyl und Ether, vorzugsweise Butyl-modifizierte Träger, wie Butyl Sepharose 4 Fast Flow. Es können unterschiedliche Elutionstypen verwendet werden, vorzugsweise lineare (Gradienten-) oder Stufenelution, am bevorzugtesten Stufenelution.

[0045] Die gewünschte Veränderung des Glycoisoformenprofils wird weiter durch die Ausführung eines Schritts (c) der Anionenaustauschchromatographie verbessert. Durch diese Maßnahme wird das Profil signifikant verändert, um ein reineres und kontrollierteres EPO Glycoisoformengemisch bereitzustellen, wie dies gewünscht wird. Ein bevorzugtes Anionenaustauschchromatographiematerial ist DEAE Sepharose, wie DEAE Sepharose Fast Flow oder Source 30Q (quarternäre, geladener Aminoethyllygand) oder Source 15Q (quarternärer geladener Ammoniumlygand), vorzugsweise Source 15Q.

[0046] Wenn das erfindungsgemäße Verfahren ferner den chromatographischen Schritt (d) einer Gelchromatographie umfasst, kann ein weiterer Selektionsprozess in Bezug auf das gewünschte EPO Glycoisoformengemisch realisiert werden. Die EPO Glycoisoformen unterscheiden sich in Bezug auf die Fraktion, die von der Gelchromatographiesäule vereinigt wird. Ein bevorzugtes Gelchromatographiesäulenmaterial ist Superdex 200 oder Sephacryl S-200.

[0047] Im obigen Verfahren zur Herstellung von EPO, wie dies oben beschrieben ist, bestehen die chromatographischen Schritte vorzugsweise aus den folgenden Schritten in der angegebenen Reihenfolge: (a), (b), (c) oder (a), (c), (b), jeweils optional mit (d).

[0048] Die angegebenen Reihenfolgen der chromatographischen Schritte sind in Bezug auf sowohl eine effektive Reinigung als auch eine gewünschte EPO Glycoisoformenanpassung wirksam. Als Zwischenschritte werden Pufferaustausch und speziell Filtration, Ultrafiltration und/oder Diafiltration ausgeführt. Es besteht aber

kein Bedarf für eine Veränderung des Puffers zwischen den Schritten (a) und (b). Insbesondere werden Ultrafiltrations- und Diafiltrationsschritte zwischen den Schritten (b) und (c) ausgeführt und ein weiterer Ultrafiltrationsschritt wird zwischen den Schritten (c) und (d) ausgeführt. Andere herkömmliche Reinigungsverfahren können zusätzlich angewendet werden, können aber auch weggelassen werden. Insbesondere können chromatographische Schritte, wie HPLC und Hydroxyapatit vermieden werden, die ferner die Verwendung organischer Lösemittel erfordern. Die ausschließliche Anwendung der Schritte (a) bis (d), optional supplementiert durch Pufferaustausch- oder Filtrationstechniken, ermöglicht bereits die Isolierung von hochqualitativem EPO in hoher Ausbeute, hoher Reinheit und einem gewünschten Profil an EPO Glycoisofomen. Das Produkt kann so direkt zur klinischen Anwendung in der Humanmedizin verwendet werden.

[0049] Im erfindungsgemäßen Herstellverfahren richtet sich die Veränderung des EPO Glycoisofomenprofils auf die Herstellung eines Gemisches aus EPO Glycoisofomen mit einer definierten Anzahl an Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül. Das gewünschte EPO Glycoisofomengemisch wird geeigneterweise hergestellt und genau kontrolliert durch (i) Selektion der geeigneten Matrices, (ii) durch Einstellung der chromatographischen Bedingungen und/oder (iii) durch Sammlung der gewünschten Fraktionen, die aus der Säule in den obigen chromatographischen Schritten (a) bis (c), optional mit (d) eluiert werden.

[0050] Um ein gleichförmiges und gut definiertes EPO Glycoisofomengemisch herzustellen, das eine hohe biologische Aktivität und Stabilität aufweist, werden die chromatographischen Schritte vorzugsweise auf eine Weise eingestellt, dass ein spezifischer Gehalt an Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül erhalten wird, der einem Bereich von 6 bis 14 entspricht. Erforderlichenfalls kann das hergestellte EPO Glycoisofomengemisch dann EPO alpha (Anzahl der Sialinsäuregruppen 8 bis 13) oder EPO beta (6–13) oder EPO entsprechen, das eine Anzahl an Sialinsäuregruppen von 7 bis 13 aufweist. Darüberhinaus kann der Anteil einer spezifischen EPO Isoform oder aller Isoformen in einem Gemisch ebenfalls variiert werden.

[0051] Die Bedingungen der jeweiligen oben beschriebenen chromatographischen Schritte können unter Verwendung einer geeigneten Chromatographiematrix, Einstellung der chromatographischen Bedingungen und/oder Auswahl der eluierten Fraktionen eingestellt werden. Geeignete chromatographische Bedingungen in Bezug auf pH Bereich, Salzkonzentration oder Gradient und Temperatur sind in den folgenden Tabellen gezeigt.

Allgemeine Bereiche:

Chromatographie	pH Bereich	Salzkonzentrationsbereich/Gradient	Temperaturbereich °C
Farbstoffaffinität	5–9	0–2,5 M	2–20
Hydrophobe	6–8	2,5–0 M	4–25
Anionenaustausch	6–8	0–0,30 M	4–25
Gelchromatographie	6–8	0,15–1 M	2–20

Bevorzugte Bereiche:

Chromatographie	pH Bereich	Salzkonzentrationsbereich/Gradient	Temperaturbereich °C
Farbstoffaffinität	6,5–7,5	0–2,5 M	2–6
Hydrophobe	6,5–7,5	2,5–0 M	18–23
Anionenaustausch	6,5–7,5	0–0,30 M	18–23
Gelchromatographie	7,2–7,5	0,15–0,5 M	2–6

[0052] Das erhaltene EPO Produkt mit dem gewünschten Glycoisofomengemisch ist zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet, die eine therapeutisch wirksame Menge an EPO umfasst. Das gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene EPO wird mit einem herkömmlichen pharmazeutisch annehmbaren Träger gemischt. Eine bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung umfasst EPO, Puffer, Polysorbate, unterschiedliche Aminosäuren, optional Zucker und Salze.

[0053] Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise mit einem Verfahren zur Bestimmung des Erythropoetin (EPO) Glycoisoprofils in einer EPO enthaltenden Zusammensetzung kombiniert, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellung einer EPO enthaltenden Zusammensetzung aus dem Kulturüberstand und/oder ein Zwischenschritt oder am Ende eines EPO Isolierungs- und Reinigungsverfahrens, das mehrere chromatographische Schritte umfasst und/oder aus einer pharmazeutischen Zusammensetzung
- Unterziehung der EPO enthaltenden Zusammensetzung einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) in einer Gelmatrix
- Transfer von Proteinen aus dem Gel auf eine Membran
- Immundetektion von EPO auf der Membran

[0054] Eine geeignete Gelmatrix, die für IEF verwendet wird, ist Polyacrylamid. Der Transfer aus dem Gel auf eine Membran, die vorzugsweise eine Nitrocellulosemembran ist, kann durch einen einfachen Diffusionstransfer oder Elektroblob ausgeführt werden. Die Immundetektion wird geeigneterweise durch die Verwendung von EPO spezifischen Antikörpern und geeignet markierten sekundären Antikörpern ausgeführt. Die Verwendung von IEF kombiniert mit der Immundetektion, die für EPO auf der Membran spezifisch ist, ermöglicht eine verlässliche Analyse des Profils der EPO Glycoisoprofils in den Proben der Säugerzellkulturen und in den Proben nach jedem Chromatographieschritt der vorliegenden Erfindung, wie dies oben beschrieben ist. Dieses Verfahren ermöglicht die Kontrolle der Proben während des Reinigungsprozesses, welche eine in-Prozess Kontrolle ist. Sie kann daher für Forschung, Optimierungsverfahren und industrielle Anwendung der Verfahren zur Herstellung von EPO mit einem spezifischen Profil der EPO Glycoisoprofils verwendet werden. Das Profil der EPO Glycoisoprofils kann in den konzentrierten Proben des gereinigten EPO, in komplexen Proteingemischen (Zellkulturen) und in Lösungen mit einer geringen Konzentration an EPO und nach einem bestimmten Chromatographieschritt und in allen Proben und Lösungen bestimmt werden, die andere Proteine umfassen. Die Analyse ist für EPO und einige EPO Analoga spezifisch und empfindlich. Das bestimmte EPO Glycoisoprofil ermöglicht einen direkten Vergleich der EPO Glycoisoprofilzusammensetzungen und quantitativen Anteile in unterschiedlichen Proben, die entweder aus einer Zellkultur oder aus verschiedenen Eluaten der chromatographischen Schritte stammen. Das Verfahren zur Bestimmung des EPO Glycoisoprofils wird vorzugsweise in einer in-Prozesskontrolle während des Verfahrens der Herstellung von Erythropoetin (EPO) der Erfindung angewendet, wie dies oben beschrieben ist.

[0055] Die folgenden Beispiele sind zum Zweck der Erläuterung von verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung angegeben und sollen die vorliegende Erfindung in keiner Weise beschränken.

Beispiel 1

IEF in Polyacrylamidgel und Immundetektion auf Nitrocellulosemembran

[0056] Dieses Verfahren wird für die Analyse des Profils der EPO Glycoisoprofils verwendet. Es kann das Profil der EPO Glycoisoprofils in unterschiedlichen Proben bestimmt werden (in komplexen Proteingemischen, in den Proben mit geringen Konzentrationen an EPO). Das Analyseergebnis ermöglicht den direkten Vergleich der EPO Qualität in unterschiedlichen Proben. Das vorliegende Beispiel 1 zeigt die IEF Analyse und die Immundetektion von EPO aus Zellkulturen und die anschließenden Beispiele 2 und 3 zeigen die Ergebnisse von Eluaten nach einem bestimmten Chromatographieschritt der Isolierung und/oder Reinigung von EPO.

[0057] Für eine zur IEF Analyse präparierende Probe wird diese einer Diafiltration unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran unterzogen (MGCO (Molekulargewichtsausschlussgrenze) 10 000 Da). Der Diafiltrationsschritt eliminiert Moleküle, die kleiner als 10 kDa sind und führt zu einem Entsalzen und Konzentrieren der Probe. Die Endkonzentration der Probe beträgt 0,5 bis 1,5 µg EPO, wobei 15–20 µl der Probe auf das Gel aufgetragen werden.

Herstellung des IEF Polyacrylamidgels

[0058] Die Gesamtkonzentration an Acrylamid beträgt 5%, das Maß an Quervernetzung beträgt 3%, die Dicke beträgt 0,5 mm und die Endkonzentrationen an Harnstoff und Gesamtampholiten betragen jeweils 5 M und 2%. Die Rolle der Ampholiten ist es, einen pH Gradienten von pH 3 bis 6 im Gel zu erhalten (beispielsweise 70% des Gesamtampholiten ergibt pH 3–5, 30% der Gesamtampholiten ergibt pH 3–10). Die Elektrodenlösungen werden an die Wahl der Ampholite angepasst, beispielsweise besteht der Elektrolyt an der Anode aus 0,1 M Glutaminsäure und 0,5 M Phosphorsäure und der Elektrolyt an der Kathode besteht aus 0,1 M β-Alaninlösung.

[0059] Wie in [Fig. 1](#) gezeigt werden die EPO Glycoisoformen in den Proben der Überstände der Zellkulturen mittels IEF getrennt. In den Spuren 1 bis 3 werden Proben der EPO bildenden Zellkultursuspension (CHO Zellen) am 6. Tag (Spur 1), am 10. Tag (Spur 2) und am 11. Tag (Spur 3) vom Beginn der Kultivierung an entnommen und auf das Gel aufgetragen. In Spur 4 wird EPO BRP Batch 1 auf das Gel aufgetragen.

Vorfokussierung

[0060] 25 Minuten bei konstanter Leistung $P = 12 \text{ W}$ (für die Gelgröße von $25 \times 11 \text{ cm}$). Die Proben (15–20 μl) werden nahe an der Kathode aufgetragen.

Fokussierung

[0061] 75 Minuten bei konstanter Leistung $P = 15 \text{ W}$ (für die Gelgröße $25 \times 11 \text{ cm}$). Während der Elektrophorese wird das Gel bei 15°C gehalten. Die Bedingungen für die Elektrophorese können verändert werden, indem man die unterschiedlichen Eigenschaften der Ampholiten aus unterschiedlichen Quellen in Betracht zieht.

Diffusionstransfer

[0062] Der Diffusionstransfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wird folgendermaßen ausgeführt: Die Membran wird auf das Gel gelegt und es werden mehrere Lagen an Filterpapier auf die Membran gelegt. Die Gelmembran und das Filterpapier haben dieselbe Größe. Die Membran und das Filterpapier werden in Transferpuffer vorbenetzt.

Transferpuffer: 48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,037% SDS, 20 Volumenprozent Methanol, pH 8,3. Die Transferzeit beträgt 90 Minuten bei 40°C

Immundetektin auf Nitrocellulosemembran

[0063] Nach dem Transfer wird die Nitrocellulose mittels einer 5% Lösung an Magermilchpulverblockierungslösung blockiert. Dann wird die Membran mit monoklonalem Maus-anti-hEPO Antikörper (IgG) als primäre Antikörper inkubiert. Die Membran wird mit 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 gewaschen. Dann wird die Membran mit polyklonalen Kaninchenantikörpern (IgG) inkubiert, die mit Meerrettichperoxidase als sekundäre Antikörper konjugiert sind. Für die Färbereaktion wird ein Substrat für die Peroxidase verwendet, beispielsweise 4-Chlor-1-naphthol.

[0064] Es werden spezifische EPO Glycoisoformen durch den Vergleich mit EPO BRP identifiziert. Die Intensität der Banden wird mittels Densitometrie bestimmt. Es wird dann das Profil der spezifischen EPO Glycoisoformen berechnet.

[0065] Das erhaltene Elektrophoretogramm ist in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0066] Getrennte Banden, die auf dem Elektrophoretogramm beobachtet werden, werden mit willkürlichen Zahlen von 3 bis 9 markiert. Sie werden gemäß der ansteigenden Azidität der Isoform von der negativen Kathode zur positiven Anode markiert (höhere Nummern zeigen Isoformen mit mehr Sialinsäuren und daher einem geringeren $p\text{I}$ an). In der [Fig. 1](#) und in den anschließenden Figuren ist die Korrelation zwischen den willkürlichen Nummern im Elektrophoretogramm und den Nummern der Sialinsäuregruppen pro EPO Molekül wie folgt: Isoformen 9, 8, 7, 6 werden jeweils 14, 13, 12, 11 ... Sialinsäuregruppen pro Molekül zugeordnet.

[0067] Die [Fig. 2](#) zeigt die Profile der relativen Anteile der EPO Glycoisoformen in den Proben, die von Suspensionskulturen der CHO Zellen abgeleitet sind, die in [Fig. 1](#) gezeigt sind. Die Intensität der Banden auf der Membran ([Fig. 1](#)) wird durch Densitometrie gemessen. Die Intensität jeder Bande ist ein relativer Teil (relative Intensität, %) der Summe der Intensitäten aller detektierten Banden aus jeder Probe (Spur) angegeben.

[0068] Die [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) zeigen, dass die IEF Analyse in Kombination mit der Immundetektion gemäß der Erfindung eine gute und spezifische Kontrolle über die EPO Glycoisoförmung aus der rohen Zellkultur erlaubt, in der viele andere Proteine vorkommen. Durch diese Analyse kann ein geeigneter Zeitpunkt für die Ernte gefunden werden, die eine gute Basis zur weiteren Isolierung und Reinigung in Bezug auf das angestrebte Glycoisoförmprofil bereitstellt.

[0069] Die [Fig. 4](#) und [Fig. 6](#) zeigen weitere Elektrophoretogramme für die EPO Glycoisoförmunganalyse während des Verfahrens zur Herstellung des EPO Glycoisoförmungsgemisches gemäß der Erfindung (siehe jeweils

Beispiele 2b und 2d).

Beispiel 2

Veränderung der EPO Glycoisofornenprofile durch unterschiedliche chromatographische Schritte

Beispiel 2a: Chromatographie auf Matrix-gebundenem Farbstoff Cibachron Blue 3G

[0070] Die EPO bildende CHO Zellkultursuspension wird in einem Bioreaktor hergestellt, zuerst durch ein 10 µm Vorfilter und dann durch ein 0,2 µm Membransterilfilter unter Antrennung der Zellen filtriert.

[0071] Das Filtrat wird auf die erste Chromatographiesäule unter Verwendung eines Matrixgebundenen Farbstoffs Cibachron Blue 3G aufgetragen. Die Chromatographie wird unter den folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix Blue Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech Partikelgröße 45 bis 165 µm SV (Säulenvolumen) = 7,85 ml, H (Säulenhöhe) = 10 cm, D (Säulendurchmesser) = 1 cm
Temp	Raumtemperatur
Flussrate	1,5 ml/min, 115 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat, 2,5 M NaCl, pH = 7,0
Probe	150 ml, 6 mg

[0072] Die Probe wird mit 5 SV (Säulenvolumina) Puffer A äquiliert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule zuerst mit 3 SV an Puffer A und dann mit 5 SV eines Gemisches aus Puffer A und B (90:10) gewaschen. Das meiste EPO eluiert mit Puffer B (5 SV). Dieselbe Trennung wird mittels der Puffer A und B bei pH 6,4 und 8,0 ausgeführt.

[0073] Vereinigte Fraktionen nach der Elution mit Puffer B werden mittels IEF in Polyacrylamidgel, Überführung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran und Ausführung der Immundetektion analysiert, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Die Intensität der Banden auf der Membran wird densitometrisch gemessen. Die Intensität jeder Bande ist als relativer Teil (relative Intensität, %) der Summe der Intensitäten aller detektierten Banden für jede Probe (Spur) angegeben. Die getrennten Banden, die auf dem Elektrophoretogramm sichtbar sind, werden mit willkürlichen Nummern von -3 bis 9 markiert (mit der Korrelation zwischen den angegebenen Nummern und des Gehalts an Sialinsäuren pro EPO Molekül, wie dies in Beispiel 1 definiert ist). Die Analyse zeigt, dass unterschiedliche Profile an EPO Glycoisofornen unter Verwendung eines unterschiedlichen pHs der Wasch- und Elutionspuffer erhalten werden können, wie dies in [Fig. 3](#) gezeigt ist.

Beispiel 2b: Hydrophobe Chromatographie (1)

[0074] Das Eluat aus der Blue Sepharose 6 Fast Flow Säule (Puffer B bei pH 7) mit einem gewünschten Glycoisofornenprofil wird auf eine Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) Säule aufgetragen. Die hydrophobe Chromatographie wird unter den folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, mittlere Partikelgröße 90 µm SV = 1 ml, H = 2,5 cm, D = 0,7 cm
Temp.	Raumtemperatur
Flussrate	1 ml/min, 150 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, 2,5 M NaCl, pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat, 1,0 M NaCl, 30% (V/V) Isopropanol, pH = 7,0
Puffer C	10 mM Na-Phosphat, 30% (V/V) Isopropanol, pH = 7,0
Probe	1,5 ml, 0,9 mg

[0075] Die Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 3 SV Puffer A und dann mit 8 SV Puffer B gewaschen. Das meiste EPO wird mit Puffer C eluiert. Das Profil der EPO Glycoisoformen, das durch das Waschen der Säule mit Puffer C erhalten wird, wird mit IEF in Polyacrylamidgel und Immundetektion von EPO auf Nitrocellulosemembran analysiert, wie dies in [Fig. 4](#) gezeigt ist.

Spur 1: Probe nach Elution von der Blue Sepharose Fast Flow Chromatographiesäule (1. Schritt des Reinigungsverfahrens) (Beispiel 2a, Puffer B, pH 7)

Spur 2: Zellkulturüberstand (vor dem 1. Schritt des Reinigungsverfahrens)

Spur 3: Probe nach der Elution von der Butyl Sepharose 4 Fast Flow Säule (vereinigte Fraktionen nach Elution mit Puffer C).

[0076] IEF und Immundetektionsanalyse werden wie in Beispiel 1 ausgeführt und evaluiert.

[0077] Wie es aus [Fig. 4](#) deutlich wird, werden solche chromatographischen Bedingungen etabliert, so dass die meisten EPO Glycoisoformen mit einem geringeren Gehalt an Sialinsäuren eliminiert werden.

[0078] Die vereinigten Fraktionen werden mittels des Ultrafiltrationssystems MINITAN (Millipore) konzentriert. Die Diafiltration wird mittels 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 als Puffer ausgeführt.

[0079] Das Eluat aus der Blue Sepharose 6 Fast Flow Säule (Puffer B bei pH 7) mit einem erwünschten Glycoisoformenprofil wird auf eine Butyl Sepharose 4 Fast Flow Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die hydrophobe Chromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix ButylSepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, mittlere Partikelgröße 90 µm SV = 1 ml, H = 2,5 cm, D = 0,7 cm
Temp.	Raumtemperatur
Flussrate:	1 ml/min, 150 cm/h
Puffer A	10 mM Na-Phosphatpuffer, 2,5 M NaCl, pH = 7,0
Puffer C	10 mM Na-Phosphatpuffer, 30% (V/V) Isopropanol, pH = 7,0
Probe	EPO BRP Standard gelöst in Puffer A, 0,5 ml, 0,25 mg

[0080] Die Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Beladen der Säule wird die Säule mit 3 SV Puffer A und dann mit 5 SV eines Gemisches der Puffer A und C (50:50) gewaschen. EPO wird von der Säule mit einem linearen Gradienten an Puffer C in Puffer A (linearer Gradient von 50 bis 100% von Puffer C in 45 Minuten (= 45 SV)) eluiert. Es können 3 überlappende Peaks auf dem Chromatogramm gesehen werden. EPO wird in den Fraktionen 15 bis 23 eluiert. Die Fraktionen 15, 19 und 21 werden dann mittels IEF und Immundetektion analysiert, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Die in [Fig. 5](#) gezeigten Ergebnisse zeigen, dass das Profil der EPO Glycoisoformen sich von Fraktion zu Fraktion unterscheidet.

[0081] Die EPO Glycoisoformen mit geringerem pI (höherer Gehalt an Sialinsäuren) werden in früheren Fraktionen eluiert, als die mit höherem pI . Dieses Merkmal zeigt an, dass es dieses Verfahren ermöglicht, die Fraktionen mit dem gewünschten Profil an EPO Glycoisoformen zu sammeln.

Beispiel 2d: Anionenaustauschchromatographie (1)

[0082] Das Eluat aus der Butyl Sepharose 4 Fast Flow Säule, wie dies in Beispiel 2c beschrieben ist, mit einem gewünschten Glycoisoformenprofil wird auf eine DEAE Sepharose Fast Flow Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Anionenaustauschchromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Probe	0,2 mg
Säule	Matrix DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech mittlere Partikelgröße 90 µm SV = 1 ml, H = 2,5 cm, D = 0,7 cm
Flussrate	1 ml/min, 158 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0, 0,03 M NaCl
Puffer C	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0, 0,1 M NaCl
Puffer D	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0, 0,3 M NaCl

[0083] Die Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 3 SV Puffer A gewaschen und dann mit 5 SV Puffer B. Das meiste EPO wird mit Puffer C (8 SV) eluiert. Die verbleibenden Proteine werden mit Puffer D eluiert. Die Säule wird mit 2 M NaCl regeneriert.

[0084] Das Profil der durch das Waschen der Säule mit Puffer C erhaltenen EPO Glycoisofomern wird mit IEF und Immundetektion von EPO auf einer Nitrocellulosemembran analysiert, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in [Fig. 6](#) gezeigt.

Spur 1: Eluat von DEAE Sepharose Fast Flow (vereinigte Fraktionen nach der Elution mit Puffer C)

Spur 2: EPO BRP Batch 1.

[0085] Die beschriebenen Bedingungen ermöglichen es, ein Profil zu erhalten, das im wesentlichen zu dem Profil des EPO BRP Standards ähnlich ist.

Beispiel 2e: Anionenaustauschchromatographie (2)

[0086] Das Eluat von der Butyl Sepharose Fast Flow Säule, wie dies in Beispiel 2c beschrieben ist, mit einem gewünschten Glycoisofomernprofil wird auf eine DEAE Sepharose Fast Flow Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Anionenaustauschchromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, mittlere Partikelgröße 90 µm SV = 1 ml, H = 2,5 cm, D = 0,7 cm
Temp	Raumtemperatur
Flussrate	1 ml/min, 150 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0,
Puffer B	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0, 1 M NaCl
Probe	EPO BRP Standard gelöst in Puffer A, 0,5 ml, 0,25 mg

[0087] Die Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 3 SV Puffer A gewaschen und dann mit 5 SV eines Gemisches aus Puffer A und B (94:6). Das EPO wird aus der Säule eluiert, wobei der Anteil an Puffer B in Puffer A (linearer Gradient von 6 bis 11,5% an Puffer B in 60 Minuten (= 60 SV)) erhöht wird. Man sieht 3 überlappende Peaks auf dem Chromatogramm. Es wird EPO in den Fraktionen 8 bis 24 eluiert.

[0088] Die Fraktionen 11, 14, vereinigte Fraktionen 21 und 22 (21 + 22) und 24 werden mittels IEF analysiert. Die Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran überführt und das EPO wird immundetektiert und die Intensität der Banden wird densitometrisch gemessen, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist.

[0089] Die IEF Analyse zeigt, dass das Profil der EPO Glycoisofomern sich von Fraktion zu Fraktion unterscheidet ([Fig. 7](#)). Die EPO Glycoisofomern mit höherem pI (mit weniger Sialinsäuren) werden schneller von der Säule eluiert. Daher kann das Verfahren zur Herstellung des gewünschten Profils an EPO Glycoisofomern verwendet werden.

Beispiel 2f: Anionenaustauschchromatographie (3)

[0090] Das Eluat von der Butyl Sepharose Fast Flow Säule, wie es in Beispiel 2c beschrieben ist, mit einem

erwünschten Glycoisofornenprofil, wird auf eine SOURCE 15Q Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Anionenaustauschchromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix SOURCE 15Q, Amersham Pharmacia Biotech, Partikelgröße 15 µm SV = 1 ml, H = 3 cm, D = 0,64 cm
Temp	Raumtemperatur
Flussrate	1 ml/min, 180 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat pH = 7,0, 1 M NaCl
Probe	EPO BRP Standard gelöst in Puffer A, 0,5 ml, 0,25 mg

[0091] Die Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 3 SV Puffer A gewaschen und dann mit 5 SV eines Gemisches aus Puffer A und B (94:6). Das EPO wird von der Säule eluiert, wobei der Anteil an Puffer B in Puffer A (linearer Gradient von 6 bis 11,5% an Puffer B in 60 Minuten (= 60 SV) kontinuierlich erhöht wird. Man sieht 3 überlappende Profile auf dem Chromatogramm. Es wird EPO in den Fraktionen 8 bis 31 eluiert. Eine IEF Analyse zeigt, dass das Profil der EPO Glycoisofornen sich von Fraktion zu Fraktion unterscheidet ([Fig. 8](#)). Die Fraktionen 13, 19 und 26 werden mit IEF analysiert, die Proteine werden dann auf die Nitrocellulosemembran überführt und EPO wird wie in Beispiel 1 beschrieben immundetektiert.

[0092] Die EPO Glycoisofornen mit höherem pI (geringer Gehalt an Sialinsäuren) werden schneller von der Säule eluiert. Daher kann das Verfahren zur Isolierung des gewünschten Profils der EPO Glycoisofornen verwendet werden.

Beispiel 2g: Gelfiltration

[0093] Das Eluat von der DEAE Sepharose Fast Flow Säule (Amersham Pharmacia Biotech) wird, wie dies in Beispiel 2d beschrieben ist, auf eine Superdex 200 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Es wird eine Gelfiltration unter den folgenden Bedingungen ausgeführt:

Probe	0,09 mg, 0,5 ml
Säule	Matrix Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech mittlere Partikelgröße 13 µm SV = 24 ml, H = 30 cm, D = 1 cm
Flussrate	0,2 ml/min, 15,2 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, 0,15 M NaCl pH = 7,2

[0094] Das EPO wird von der Säule in den Fraktionen 59 bis 68 eluiert.

[0095] Die [Fig. 9](#) zeigt die Profile der EPO Glycoisofornen nach der Elution von der Superdex 200 Säule. Die Fraktionen 61, 63, 65 und 67 werden mit IEF analysiert, die Proteine werden dann auf Nitrocellulosemembran überführt, das EPO wird immundetektiert und die Intensität der Banden wird densitometrisch gemessen, wie dies in Beispiel 1 beschrieben wurde.

[0096] Die IEF Analyse zeigt, dass EPO Glycoisofornen sich zwischen bestimmten Fraktionen unterscheiden. Die EPO Glycoisofornen mit einem geringeren pI (mit einem hohen Gehalt an Sialinsäuren) werden schneller von der Säule eluiert. Daher ermöglicht dieses Verfahren die Isolierung eines erwünschten Profils der EPO Glycoisofornen durch die Auswahl der geeigneten Fraktion nach Elution von der Säule.

Beispiel 2h: Herstellung eines gewünschten EPO Glycoisofornengemisches

[0097] Die [Fig. 10](#) zeigt die Profile der EPO Glycoisofornen nach der Gradientenelution von den Säulen DEAE Sepharose Fast Flow von Beispiel 2e und Source 15Q von Beispiel 2f. Der EPO BRP Batch 1 wird auf die Säulen aufgetragen. Die vereinigten Fraktionen 13 bis 31 aus Source Q und die vereinigten Fraktionen von 14 bis 28 der DEAE Sepharose Fast Flow werden mittels IEF analysiert. Zum Vergleich werden EPO BRP und EPO alpha (Eprex) ebenfalls analysiert. Die Proteine werden dann auf die Nitrocellulosemembran überführt, das EPO wird immundetektiert und die Intensität der Banden wird densitometrisch gemessen, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Es wird eine gute Übereinstimmung mit dem gewünschten EPO alpha Isoformenprofil mit beiden Anionenaustauschchromatographiesäulen erhalten.

Beispiel 3

[0098] Verfahren zur Erhaltung eines gewünschten Profils an EPO Glycoisofomen: Profil von EPO alpha Es wird eine EPO bildende CHO Zellkultursuspension in einem Bioreaktor hergestellt, zuerst durch einen 10 µm Vorfilter und dann durch eine Membran eines sterilisierenden 0,2 µm Filters, um die Zellen abzutrennen. Das Filtrat wird auf die erste Chromatographiesäule mit einem Matrixgebundenen Farbstoff Cibachron Blue 3G aufgetragen. Die Chromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule	Matrix Blue Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech Partikelgröße: 45–165 µm Säulenvolumen (SV) = 30 ml, Säulenlänge (H) = 15 cm Säulendurchmesser (D) = 1,6 cm
Temp	Raumtemperatur
Flussrate	5 ml/min, 150 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat, 2,5 M NaCl, pH = 7,0
Probe	400 ml, 36 mg Protein

[0099] Die Säule wird mit 5 SV Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 5 SV Puffer A gewaschen und dann mit 4 SV eines Gemisches aus Puffer A und Puffer B (92:8). Das Eluat, worin EPO durch Waschen der Säule mit Puffer B eluiert wird (6 SV), wird für weitere chromatographische Schritte verwendet.

[0100] Das Eluat aus dem ersten Chromatographieschritt wird auf die Säule des zweiten Chromatographieschritts aufgetragen (hydrophobe Chromatographie). Die hydrophobe Chromatographie wird unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule	Matrix Butyl Sepharose Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech mittlere Partikelgröße 90 µm SV = 1 ml, H = 2,5 cm, D = 0,7 cm
Temp	Raumtemperatur
Flussrate	1 ml/min, 150 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, 2,5 M NaCl, pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat, 30% (V/V) Isopropanol, pH = 7,0
Probe	90 ml, 1,5 mg

[0101] Die Säule wird mit 5 SV Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 5 SV Puffer A und dann mit 12 SV eines Gemisches der Puffer A und B (1:1) gewaschen. Das Eluat, worin EPO mit Puffer B (15 SV) eluiert wird, wird für anschließende Chromatographie Schritte verwendet.

[0102] Das Eluat vom zweiten chromatographischen Schritt wird konzentriert und der Puffer B wird durch 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0 unter Verwendung des Ultrafiltrationssystems Centricon YM-10 (Millipore) ersetzt. Das Konzentrat wird auf die Säule des dritten Chromatographieschritts (Anionenaustauschchromatographie) aufgetragen. Die Chromatographie wird unter den folgenden Bedingungen tauschchromatographie aufgetragen. Die Chromatographie wird unter den folgenden Bedingungen ausgeführt:

Säule:	Matrix Source 15Q, Amersham Pharmacia Biotech Partikelgröße 15 µm SV = 1 ml, H = 3 cm, D = 0,64 cm
Temp.	Raumtemperatur
Flussrate	1 ml/min, 180 cm/Stunde
Puffer A	10 mM Na-Phosphat, pH = 7,0
Puffer B	10 mM Na-Phosphat, pH = 7,0, 1 M NaCl
Probe	2 ml, 0,4 mg

[0103] Die Säule wird mit 5 SV an Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wird die Säule mit 5 SV an Puffer A gewaschen. EPO wird mit einem linearen Gradienten an Puffer B in Puffer A eluiert (linearer

Gradient von 0 bis 13% an Puffer B in 60 min (= 60 SV). Das EPO wird in den Fraktionen 20 bis 56 eluiert, während das gewünschte Glycoisoformenprofil in den Fraktionen 37 bis 51 gefunden wird. Das schließliche Profil der Glycoisoformen des isolierten EPO nach 3 aufeinanderfolgenden Chromatographieschritten mittels Blue Sepharose 6 Fast Flow, Butyl Sepharose 4 Fast Flow und Source 15Q ist in der [Fig. 11](#) gezeigt.

[0104] Die vereinigten Fraktionen 37 bis 51 von der Source 15Q werden mit IEF analysiert, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist. Zum Vergleich werden 2 andere Proben aufgetragen: EPO alpha (Eprex) und ungereinigter Überstand aus der Zellkultur des Bioreaktors. Wie es aus [Fig. 11](#) ersichtlich ist, erhält man eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen dem EPO Glycoisoformenprofil und EPO alpha, wie dies gewünscht wird, nur unter Verwendung der 3 charakterisierten Chromatographieschritte. Zur selben Zeit beträgt die Reinheit des erhaltenen EPO Produkts über 99%, wie dies durch HPLC und Gelelektrophorese bestimmt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Erythropoetin, wobei das Verfahren die Unterziehung einer Erythropoetin-haltigen Zusammensetzung den folgenden chromatographischen Schritten umfasst:

- (a) Farbstoffaffinitätschromatographie
- (b) Hydrophobe Chromatographie und
- (c) Anionenaustauschchromatographie,

dadurch gekennzeichnet, dass die chromatographischen Schritte nur aus den folgenden Schritten in der angegebenen Reihenfolge bestehen (a), (b), (c) oder (a), (c), (b), jeweils optional mit (d) Gelchromatographie.

2. Verfahren nach Anspruch 1, das zusätzlich zumindest einen Zwischenschritt des Pufferaustausches, der Filtration, der Ultrafiltration und/oder der Diafiltration umfasst.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das Erythropoetin in Form eines Glycoisoformengemisches hergestellt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das Glycoisoformenprofil des hergestellten Erythropoetins nach den chromatographischen Schritten relativ zur Erythropoetin-enthaltenden Ausgangszusammensetzung verändert ist.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Farbstoffaffinitätschromatographie mit einem Matrixgebundenen Triazinfarbstoff ausgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin im Farbstoffaffinitätschromatographieschritt der pH des Elutionspuffers auf einen Bereich von 5,0 bis 9,0 eingestellt wird.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin im Farbstoffaffinitätschromatographieschritt der pH des Elutionspuffers auf einen Bereich von 6,0 bis 8,0 eingestellt wird.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die hydrophobe Chromatographie mit einem butylierten Matrixträger ausgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE Sepharosematrix ausgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Gelchromatographie auf einer Superdex 200 oder einer Sephacryl S-200 Säule ausgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, worin das Glycoisoformenprofil des Erythropoetingemisches vor und/oder nach zumindest einem ausgewählten Chromatographieschritt bestimmt wird, wobei die Erythropoetin-enthaltende Zusammensetzung einer isoelektrischen Fokussierung in einer Gelmatrix unterzogen wird, die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen werden und das Erythropoetin auf der Membran immundetektiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin die gewünschten Fraktionen, die von der Säule eluieren, vereinigt werden.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin in der hergestellten Erythropoetin-enthaltenden Zusammensetzung der Anteil an Erythropoetin enthaltenden Glycoisofomen mit bis zu 3 Sialinsäuregruppen pro Erythropoetinmolekül relativ zur Erythropoetin-enthaltenden Ausgangszusammensetzung verringert ist.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin in der hergestellten Erythropoetin-enthaltenden Zusammensetzung der Anteil an Erythropoetin enthaltenden Glycoisofomen mit bis zu 4 Sialinsäuregruppen pro Erythropoetinmolekül relativ zur Erythropoetin-enthaltenden Ausgangszusammensetzung verringert ist.

15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin in der hergestellten Erythropoetin-enthaltenden Zusammensetzung der Anteil an Erythropoetin enthaltenden Glycoisofomen mit bis zu 5 Sialinsäuregruppen pro Erythropoetinmolekül relativ zur Erythropoetin-enthaltenden Ausgangszusammensetzung verringert ist.

16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin ein Erythropoetinglycoisofomengemisch mit einem spezifischen Gehalt an Molekülen mit einer Anzahl an Sialinsäuregruppen, die von 6 bis 14 pro Erythropoetinmolekül reicht, hergestellt wird.

17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin ein Erythropoetinglycoisofomengemisch mit einem spezifischen Gehalt an Molekülen mit einer Anzahl an Sialinsäuregruppen, die von 7 bis 13 pro Erythropoetinmolekül reicht, hergestellt wird.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin ein Erythropoetinglycoisofomengemisch mit einem spezifischen Gehalt an Molekülen mit einer Anzahl an Sialinsäuregruppen, die von 8 bis 13 pro Erythropoetinmolekül reicht, hergestellt wird.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

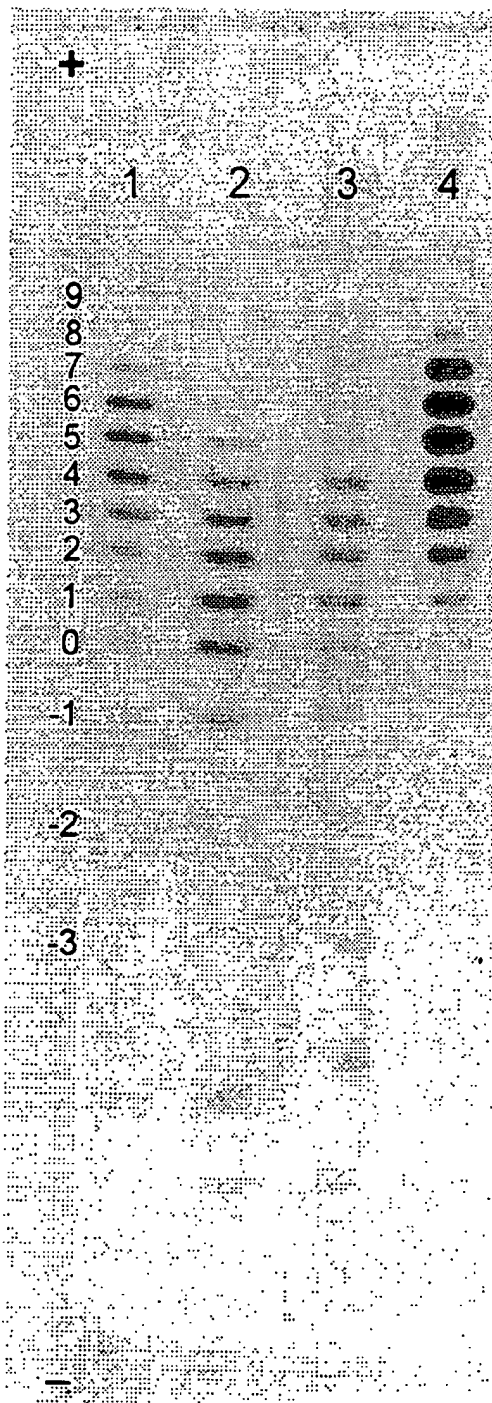


Fig. 2

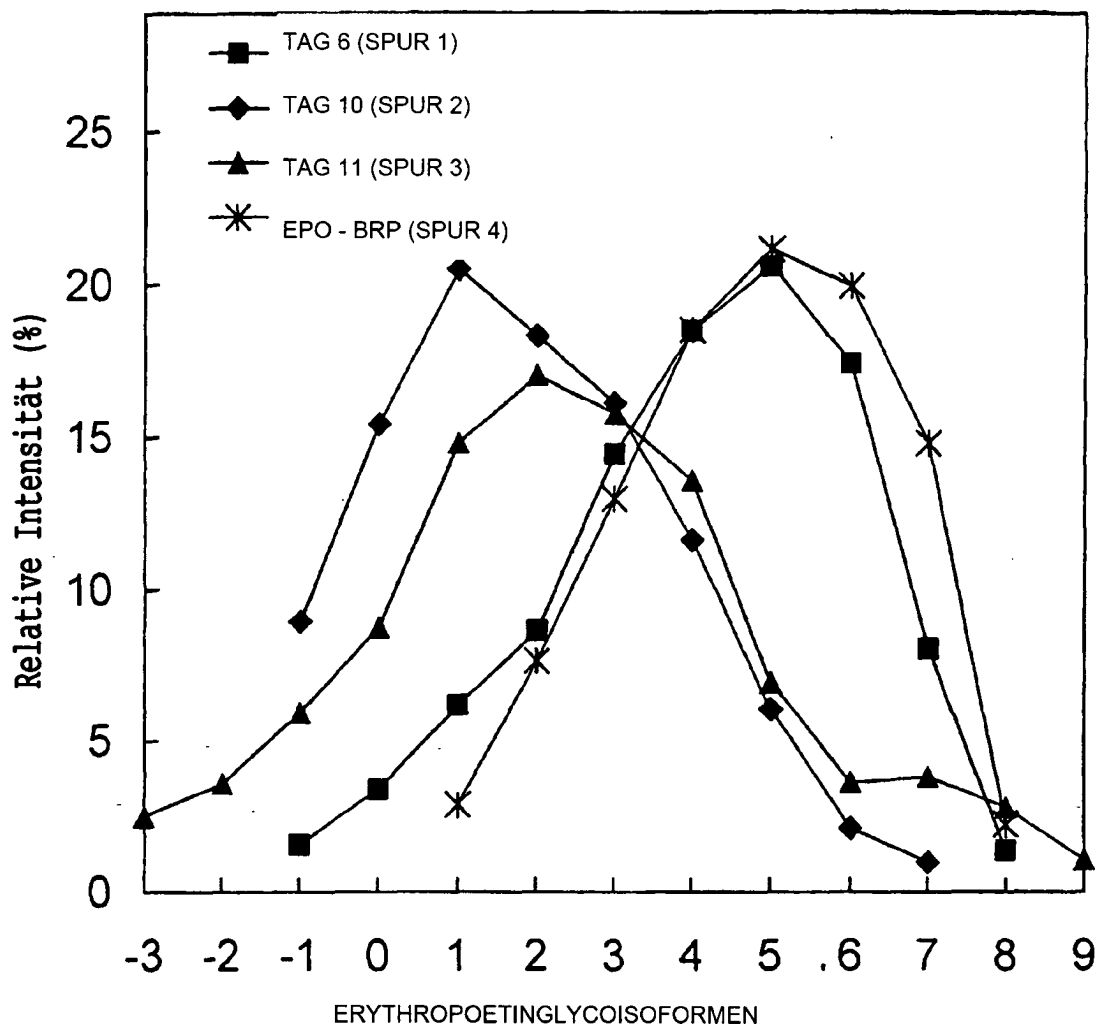


Fig. 3

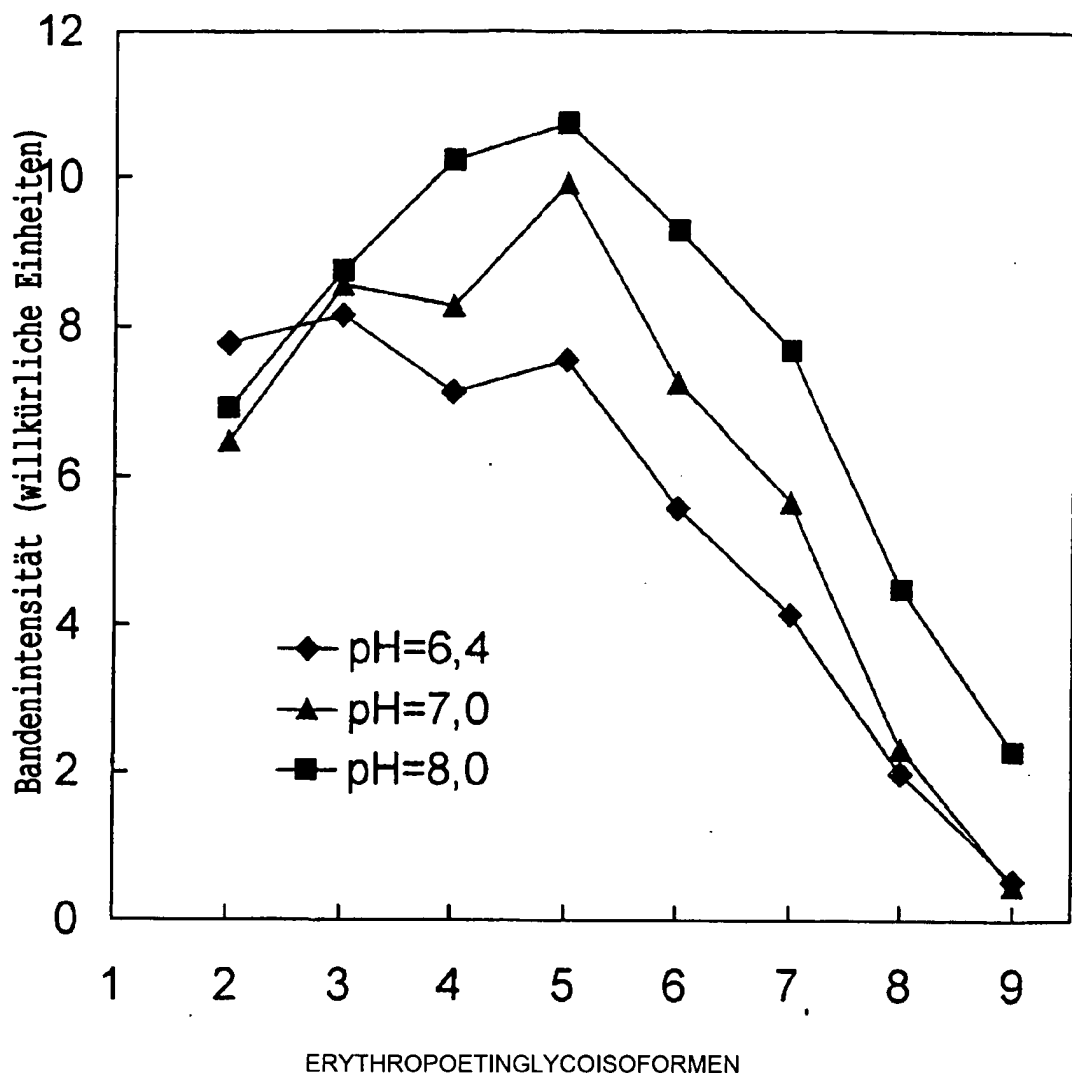


Fig. 4

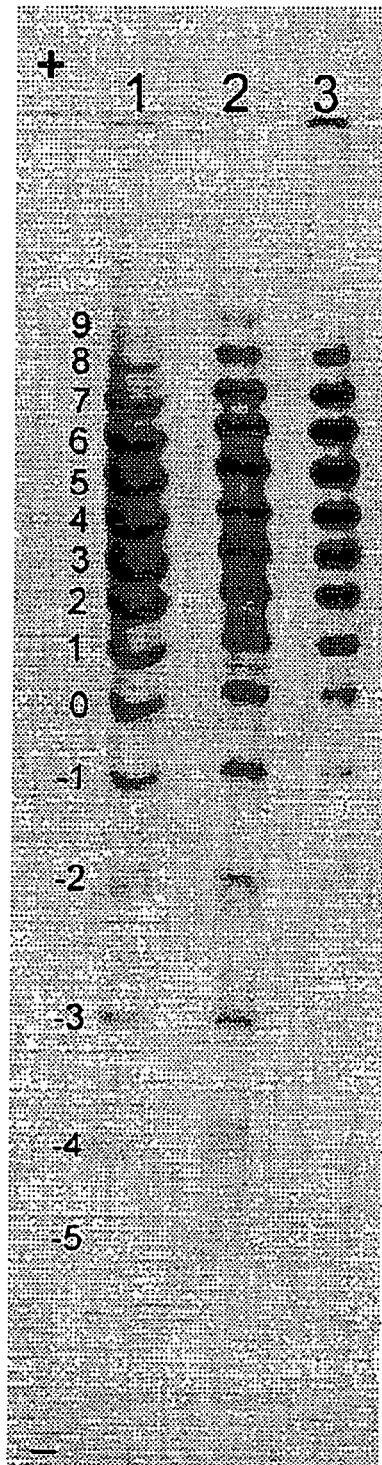


Fig. 5

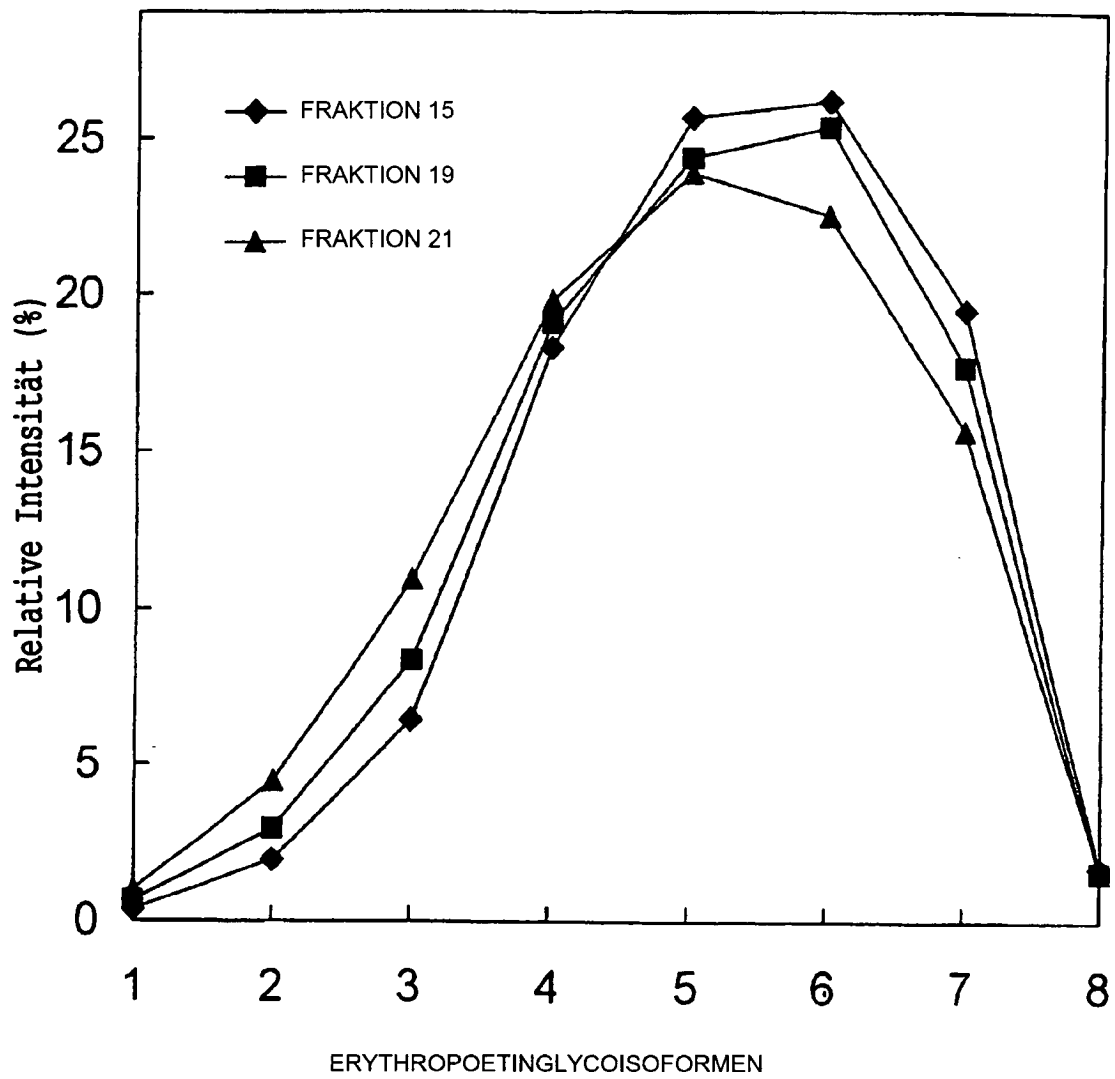


Fig. 6

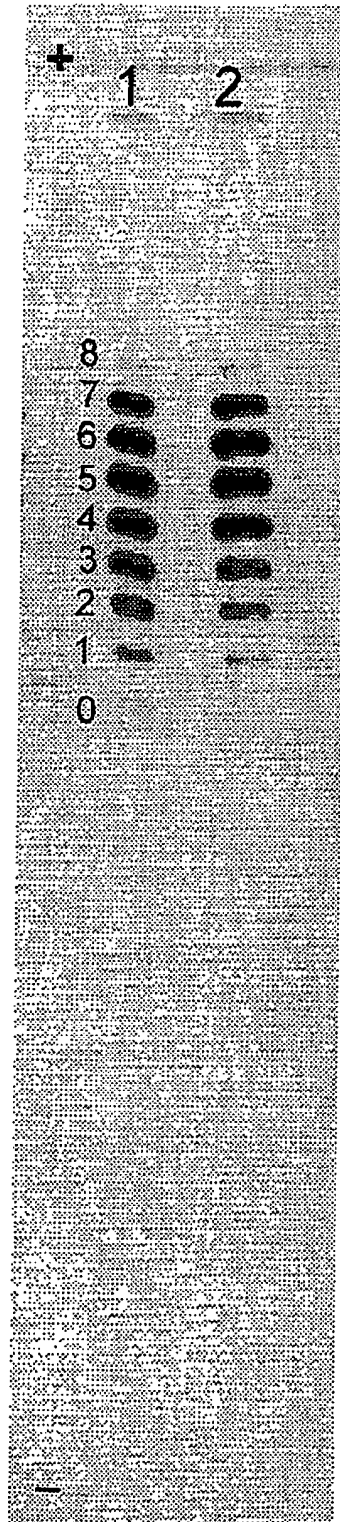


Fig. 7

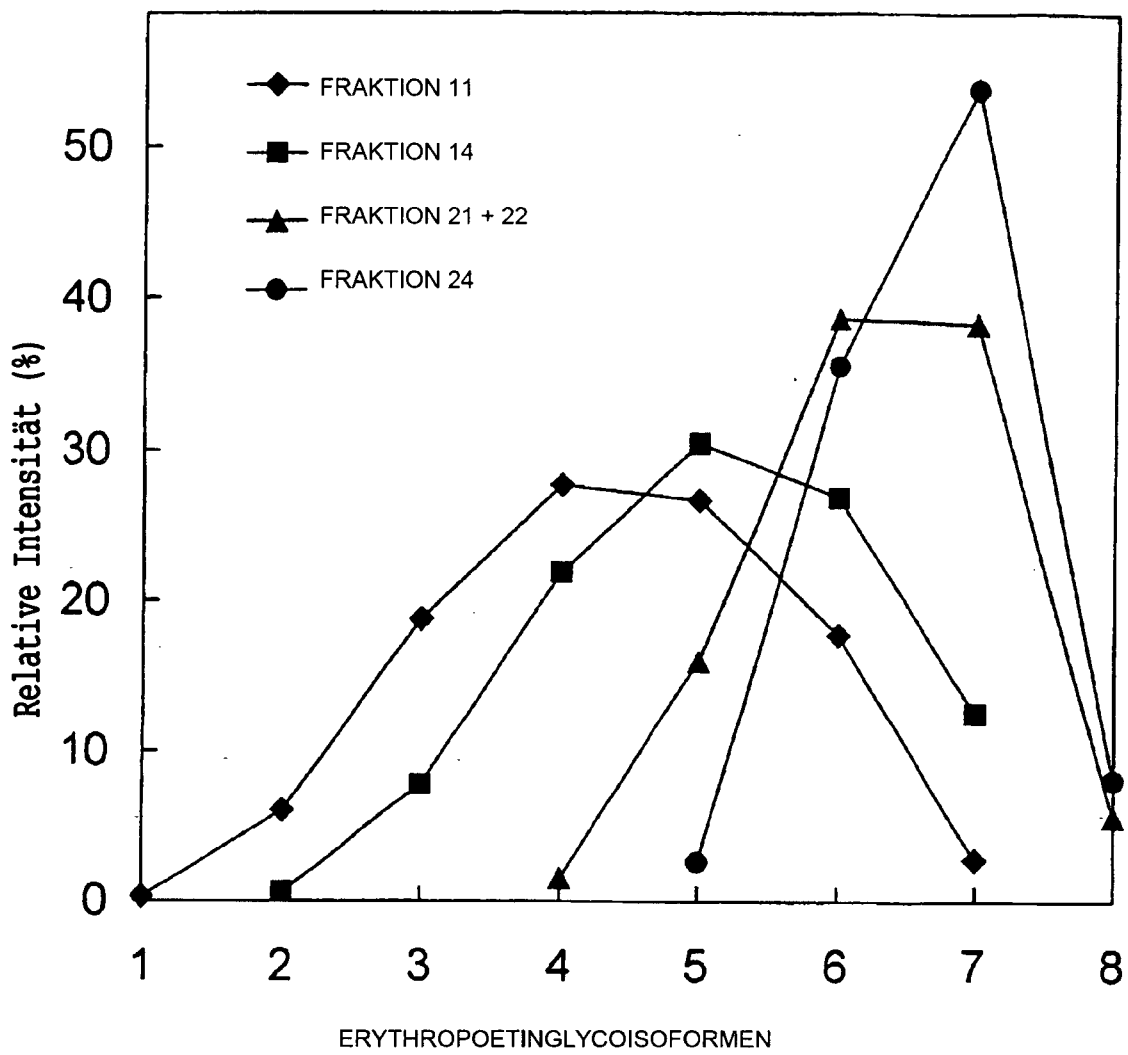


Fig. 8

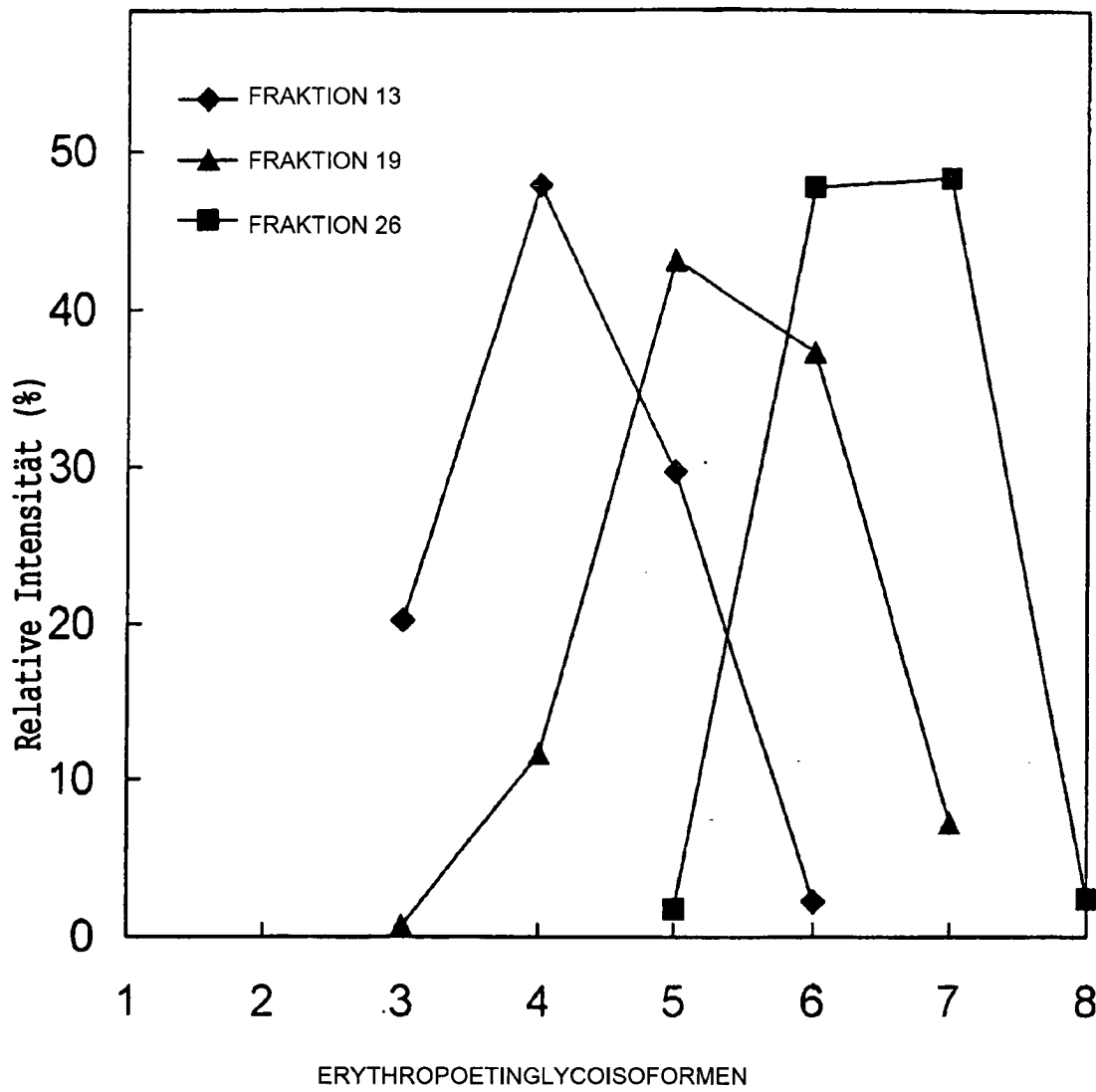


Fig. 9

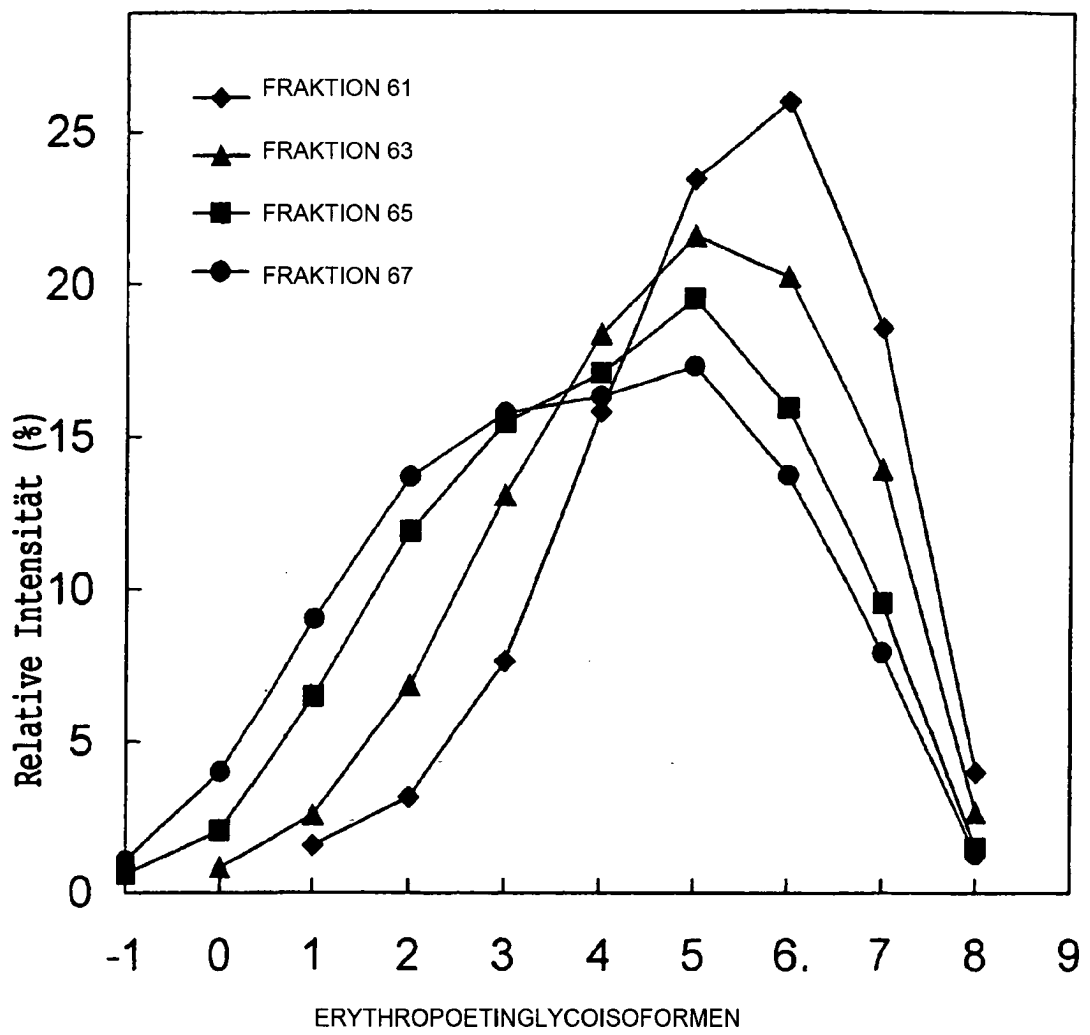


Fig. 10

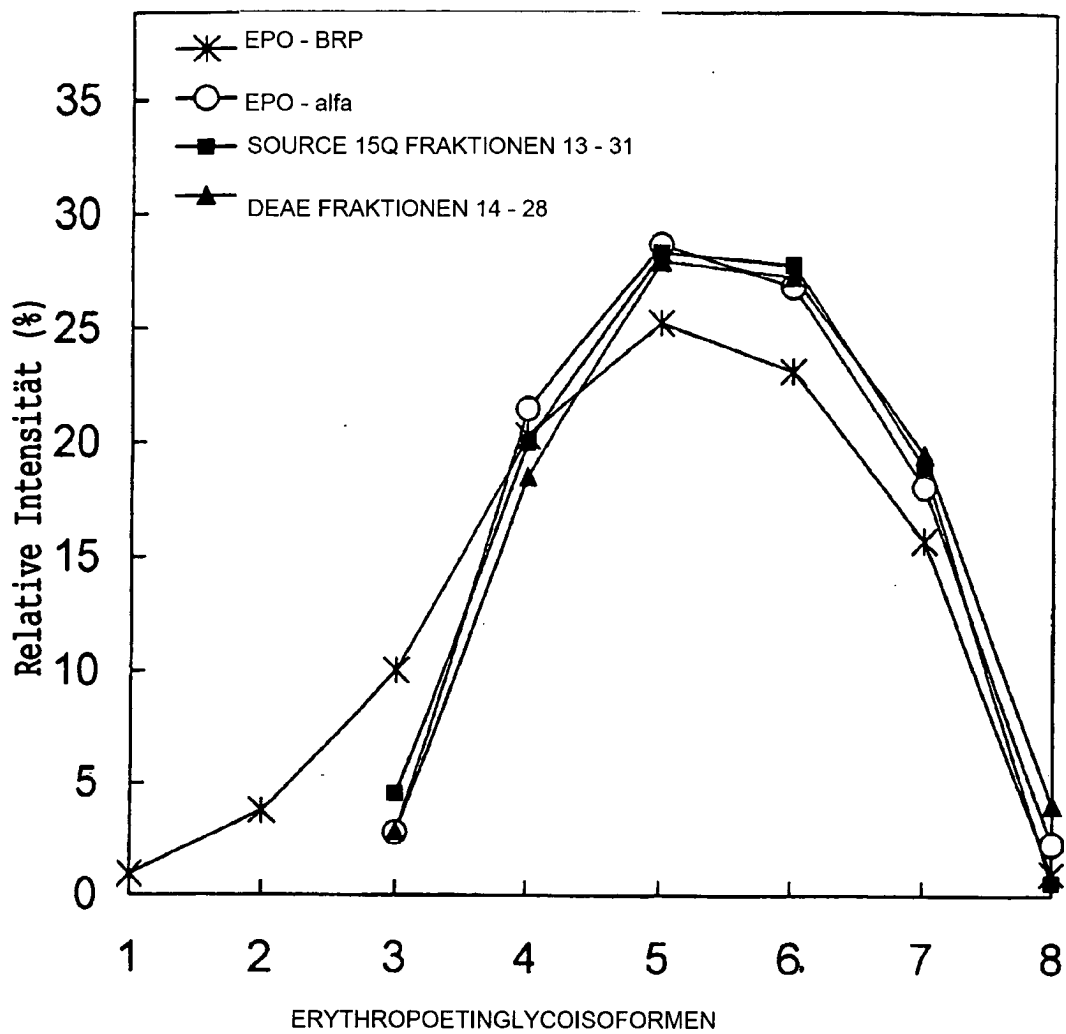


Fig. 11

