



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 1/18 (2006.01); C07K 14/505 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016123352, 28.11.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.11.2014

Дата регистрации:
01.02.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.11.2013 KR 10-2013-0148026

(43) Дата публикации заявки: 11.01.2018 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 01.02.2018 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 29.06.2016

(86) Заявка РСТ:
KR 2014/011527 (28.11.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/080509 (04.06.2015)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ЛИ Йоон Джун (KR),
КИМ Кьюн Хва (KR),
ЯНГ Йоо Хее (KR),
ЙОО Джун Мин (KR),
КИМ Се Джун (KR),
МООН Джи Хьюн (KR),
ОХ Хоо Кеун (KR),
ЛИ Донг Еок (KR),
ЛИ Вон Джеон (KR),
ЛИ Джун Рок (KR),
ЛИ Чун Мин (KR),
ЧОЙ Еун Янг (KR),
ХА Гьон Сик (KR)

(73) Патентообладатель(и):

СиДжей ХЕЛТКЕР КОРПОРЕЙШН (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013058485 A1, 25.04.2013.
EJIMA D. ET AL. "Improved column
chromatography performance using Arginine.",
AMERICAN LABORATORY., 200702. RU
2009106083 A, 20.10.2010.

(54) Способ очистки дарбэпоетина альфа

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к способу очистки дарбэпоетина альфа с помощью селективного выделения из смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих различное содержание сиаловой кислоты, только структурной изоформы, которая имеет высокое содержание сиаловой кислоты. Способ очистки дарбэпоетина альфа заключается в (а) связывании дарбэпоетина альфа на колонке для анионообменной хроматографии путем загрузки смеси, включающей дарбэпоетин альфа, имеющий различное содержание сиаловой кислоты, на колонку для анионообменной хроматографии; (б) промывании хроматографической колонки с

помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, для удаления структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих более высокие изоэлектрические точки, чем целевая изоэлектрическая точка, и (с) элюировании дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке, из этой колонки, при этом дарбэпоетин альфа, выделенный на стадии (с), имеет изоэлектрическую точку от рI 2,0 до 4,0. Способ позволяет увеличить производительность, а также получить высокочистый дарбэпоетин альфа в промышленном масштабе. 2 н. и 14 з.п. ф-лы, 1 табл., 6 ил., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C07K 1/18 (2006.01); *C07K 14/505* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016123352, 28.11.2014**

(24) Effective date for property rights:
28.11.2014

Registration date:
01.02.2018

Priority:

(30) Convention priority:
29.11.2013 KR 10-2013-0148026

(43) Application published: **11.01.2018 Bull. № 2**

(45) Date of publication: **01.02.2018 Bull. № 4**

(85) Commencement of national phase: **29.06.2016**

(86) PCT application:
KR 2014/011527 (28.11.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/080509 (04.06.2015)

Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**LEE Yoon Jung (KR),
KIM Kyung Hwa (KR),
YANG Yoo Hee (KR),
YOO Jung Min (KR),
KIM Se Jun (KR),
MOON Ji Hyun (KR),
OH Hoo Keun (KR),
LEE Dong Eok (KR),
LEE Won Jeong (KR),
LEE Jung Rok (KR),
LEE Chung Min (KR),
CHOI Eun Young (KR),
HA Gyong Sik (KR)**

(73) Proprietor(s):

CJ HEALTHCARE CORPORATION (KR)

(54) **METHOD FOR PURIFYING DARBEPOETIN ALPHA**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the method of purifying darbepoetin alpha using a selective allocation from a mixture of the structural darbepoetin alpha isoforms having different contents of sialic acid, a structural isoform only, which has a high content of sialic acid. The method of purifying darbepoetin alpha is (a) binding darbepoetin alpha on the column for the anion-exchange chromatography by loading the mixture comprising darbepoetin alpha having different contents of sialic acid, on the column for the anion-exchange chromatography; (b) washing the chromatographic

column with the wash buffer solution containing arginine, to remove structural isoforms of darbepoetin alpha having a higher isoelectric point than the isoelectric point of the target, and (c) eluting darbepoetin alpha, which remains bound to the chromatographic column, from the column. Darbepoetin alfa isolated in step (c) has an isoelectric point from pI 2.0 to 4.0.

EFFECT: method allows to increase productivity, and to obtain high-purity darbepoetin alfa on an industrial scale.

16 cl, 1 tbl, 6 dwg, 4 ex

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Область техники

Настоящее изобретение относится к способу очистки дарбэпоетина альфа с помощью селективного выделения из смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих
5 различное содержание сиаловой кислоты, только структурной изоформы, имеющей высокое содержание сиаловой кислоты.

2. Описание уровня техники

Дарбэпоетин альфа (NESP) является аналогом эритропоетина (ЭПО), который содержит пять заместителей в аминокислотной последовательности молекулы
10 эритропоетина, обеспечивая две дополнительные N-гликозилированные цепочки (международная публикация No. WO 2001076640). Хотя дарбэпоетин альфа отличается от ЭПО с точки зрения биохимических характеристик, таких как, например, молекулярная масса, изоэлектрическая точка и т.д., он также, как ЭПО, является эритропоэз-стимулирующим протеином.

Известно, что дарбэпоетин альфа имеет период полувыведения в сыворотке крови, который примерно втрое длиннее, чем период полувыведения эритропоетина у мышей, крыс, собак, человека и т.д. из-за высокого содержания сиаловой кислоты (Pedrazzoli P, Cinieri S, Lorusso V, Gamucci T, Secondino S, Silvestris N 2007 Nov-Dec, 27(6C), 4419-24; Anticancer Res.), и, таким образом, его *in vivo* разложение ингибируется, тем самым
15 обеспечивая более высокую биологическую активность в сравнении с ЭПО в нативном состоянии.

Из-за различия в содержании сиаловой кислоты в результате гликозилирования дарбэпоетин альфа максимально имеет 22 различных типа структурных изоформ, и чем выше содержание сиаловой кислоты, тем ниже изоэлектрическая точка и тем выше
25 терапевтическая ценность. Соответственно, селективное выделение и очистка только тех структурных изоформ, которые имеют высокое содержание сиаловой кислоты, очень важно в области терапии, применяющей дарбэпоетин альфа.

Примеры традиционного способа очистки ЭПО и аналогов ЭПО включают анионообменную и катионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного
30 взаимодействия, эксклюзионную хроматографию и т.д. В частности, в международной публикации WO 2010/027869 описан способ очистки ЭПО путем последовательного применения хроматографии гидрофобного взаимодействия, анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. В Международной публикации WO 2003/045996 описан способ очистки рекомбинантного
35 человеческого ЭПО методом обращено-фазной хроматографии, анионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии.

В частности, в качестве способов очистки дарбэпоетина альфа в международной публикации WO 1995/005465 описан способ применения анионообменной смолы и C4 смолы, а в международной публикации WO 2010/008823 предложен проточный режим
40 для очистки дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты, с изоэлектрической точкой, составляющей 4,5 или менее, в которых целевой протеин не связывается на колонке из катионообменной смолы, а вымывается в раствор хроматографической обработки. Однако эти способы чрезвычайно дорогостоящи и затратны по времени из-за их использования на различных стадиях с использованием смол, и, таким образом, не подходят для производства в промышленном масштабе.

Вместе с тем, в публикации Корейской патентной заявки No. 10-2013-0042107 описан способ, который более упрощен в сравнении с указанным выше четырехстадийным способом за счет внедрения трехстадийного способа, в котором последовательно

применяют анионную, гидроксипатитовую, анионообменную хроматографию, а адсорбцию и промывание осуществляют при специфических условиях рН, когда применяют вторичную хроматографию на анионообменной смоле для селективного разделения изоформ, имеющих низкие изоэлектрические точки. В частности, для

5 получения изоформ с низкими изоэлектрическими точками дарбэпоетин альфа связывают на колонке при рН, находящемся в области от 4,0 до 5,0, с последующим промыванием буферным раствором, имеющим рН в области от 2,0 до 2,4.

Вышеуказанный способ может обладать преимуществами с точки зрения времени и затрат, необходимых для производства в промышленном масштабе, потому что

10 способ в некоторой степени упрощен в сравнении с традиционными способами, однако, для воплощения в условиях с низким значением рН (рН в области от 2,2 до 2,4), как предлагается в указанной выше опубликованной патентной заявке, необходимо, чтобы токсичный раствор кислоты, такой как HCl, использовали в большом количестве, а значит такой способ не желателен. Кроме того, поскольку реакции изоформ при данных

15 условиях рН не являются постоянными, когда количество, подлежащее обработке с помощью колонки, возрастает при масштабировании, возможность воспроизводимости при производстве в промышленном масштабе является низкой, если изоформы с целевым диапазоном изоэлектрических точек нужно получать путем регулирования рН среды буферного раствора.

То есть поскольку традиционный способ очистки дарбэпоетина альфа требует комплексного подхода с применением хроматографии, включающей различные стадии с использованием смол, он требует чрезвычайно высоких материальных и временных затрат, а если осуществлять очистку с помощью способа, который упрощен в сравнении с традиционным способом, необходимо, чтобы условия, такие как рН, точно

20 регулировались для компенсации возможного снижения эффекта очистки, но такое регулирование условий усложняется по мере увеличения масштаба производства.

Следовательно, существует растущая необходимость в улучшенном способе очистки дарбэпоетин альфа, который будучи упрощенным в сравнении с традиционными способами и имея более просто регулируемые условия, может стабильно воспроизводить

30 успешные условия способа при снижении стоимости и временных затрат при использовании способа в условиях производства в промышленном масштабе.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения стремились разработать способ очистки дарбэпоетина альфа, который был бы более удобным и простым в сравнении с

35 традиционными способами, и в результате неожиданно обнаружили, что простой способ применения только анионов и аргинина может отделять дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание сиаловой кислоты, за короткий период времени, тем самым завершив настоящее изобретение.

Соответственно, задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить

40 способ очистки дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты, из смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих различное содержание сиаловой кислоты.

ПРЕИМУЩЕСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ по настоящему изобретению представляет собой новый способ очистки

45 дарбэпоетина альфа, который можно удобно и просто осуществить и в котором возможно значительно увеличить производительность из-за улучшения эффективности способа, а также выхода высокочистого дарбэпоетина альфа в процессе производства в промышленном масштабе согласно настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлена чистота элюатов дарбэпоетина альфа, которые получены путем очистки методом анионообменной хроматографии на гидроксипатитовой смоле при анализе методом С4 ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

5 На Фиг. 2 представлен ИЭФ (изоэлектрическое фокусирование) результата очистки методом анионообменной хроматографии, в процессе которой применяли буферный раствор глицина-HCl, содержащий аргинин.

На Фиг. 3 представлен ИЭФ результата очистки методом анионообменной хроматографии, в процессе которой применяли буферный раствор ацетата натрия, содержащий аргинин.

10 На Фиг. 4 представлен ИЭФ результата очистки методом анионообменной хроматографии, в процессе которой применяли буферный раствор глицина-HCl, не содержащий аргинина.

На Фиг. 5 представлены результаты гель-фильтрующей хроматографии фракций дарбэпоетина альфа, которые получены методом анионообменной хроматографии.

15 На Фиг. 6 представлен результат ИЭФ, демонстрирующий изоэлектрические точки для каждой из фракций, представленных на ФИГ. 5.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВОПЛОЩЕНИЙ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Для достижения вышеуказанной цели в одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ очистки дарбэпоетина альфа из смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих различное содержание сиаловой кислоты.

В частности, для селективного выделения структурных изоформ, имеющих высокое содержание сиаловой кислоты, из смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа в настоящем изобретении предложен способ очистки дарбэпоетина альфа методом анионообменной хроматографии, включающим промывание с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин.

Предпочтительно способ очистки дарбэпоетина альфа по настоящему изобретению включает осуществление по меньшей мере одной стадии хроматографирования методом анионообменной хроматографии, осуществление которой включает связывание смеси структурных изоформ дарбэпоетина альфа на анионообменной смоле, промывание этой смолы буферным раствором, содержащим аргинин, и элюирование дарбэпоетина альфа, связанного на хроматографической колонке, из этой колонки.

30 В другом типовом воплощении настоящего изобретения предложен способ очистки дарбэпоетина альфа, включающий стадии: (а) связывания дарбэпоетина альфа на анионообменной хроматографической колонке путем загрузки смеси, содержащей дарбэпоетин альфа, имеющий различное содержание сиаловой кислоты, на анионообменную хроматографическую колонку; (b) промывания хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин; и (с) элюирования дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке, из этой колонки.

45 В типовом воплощении настоящего изобретения предложен способ очистки дарбэпоетина альфа, включающий стадии: (а) элюирования фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем использования биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, на стадии хроматографирования методом анионообменной хроматографии; (b) элюирования фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем использования элюата, полученного на стадии (а), на стадии хроматографирования на гидроксипатитовой смоле; (с) связывания дарбэпоетин альфа на анионообменной

хроматографической колонке путем загрузки элюата, полученного на стадии (b), на анионообменную хроматографическую колонку; (d) промывания колонки, обработанной на стадии (c), с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин; и (e) элюирования дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке при промывании на стадии (d), из этой колонки. Настоящее изобретение подробно описано ниже.

В данной заявке термин "дарбэпоетин альфа", представляя собой рекомбинантную форму эритропоетина (ЭПО), который представляет собой гликопротеин, относится к гликопротеину, который имеет пять замещений в аминокислотной последовательности молекулы эритропоетина, тем самым обеспечивая две дополнительные N-гликозилированные цепочки. Дарбэпоетин альфа отличается от эритропоетина по биохимическим характеристикам, таким как молекулярная масса, изоэлектрическая точка и т.д. Дарбэпоетин альфа стимулирует эритропоз и, значит, может применяться в качестве лекарственного средства при почечной недостаточности и анемии, которые связаны с химиотерапией рака. Благодаря добавленным в него гликанам, дарбэпоетин альфа имеет период полувыведения в сыворотке крови, который примерно втрое длиннее, чем у эритропоетина, и может присутствовать в различных изоформах в соответствии с содержанием сиаловой кислоты. Структурные изоформы дарбэпоетина альфа, имеющие высокое содержание гликанов и сиаловой кислоты, имеют низкие изоэлектрические точки, и эти структурные изоформы обладают высокой биологической активностью *in vivo*. Соответственно, селективное отделение и очистка только тех структурных изоформ, которые имеют высокое содержание гликанов и сиаловой кислоты, очень важно для лекарственных протеиновых средств, использующих дарбэпоетин альфа, однако, традиционные способы очистки имеют сложности, состоящие в том, что они требуют чрезвычайно высоких материальных и временных затрат из-за использования смол на нескольких стадиях. В этой связи, авторы настоящего изобретения разработали способ очистки дарбэпоетина альфа, имеющего высокую степень гликозилирования, только с помощью упрощенного способа за короткий период времени.

Поскольку дарбэпоетин альфа имеет более высокую степень гликозилирования в сравнении с ЭПО, содержание сиаловой кислоты на 1 моль дарбэпоетина альфа выше, чем у ЭПО, который имеет максимум 13 молей на 1 моль ЭПО, а, как известно, максимальное теоретическое значение содержания сиаловой кислоты на 1 моль дарбэпоетина альфа составляет 22 моля (Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), British Journal of Cancer (2001) 84 (Supplement 1), 3-10).

В частности, дарбэпоетин альфа, будучи выделенным и очищенным согласно способу очистки по настоящему изобретению, имеет высокое содержание гликанов и сиаловой кислоты и предпочтительно представляет собой дарбэпоетин альфа, имеющий структурные изоформы с низкой изоэлектрической точкой в диапазоне от pI 2,0 до pI 4,0, более предпочтительно с изоэлектрической точкой 3,5 или менее.

В данной заявке термин "биологическая жидкость" относится к культуре, содержащей клетки, компонентам клетки или клеточным продуктам или их производным и, хотя не ограничивается указанным, может включать клеточные культуры, супернатанты клеточных культур, клеточные лизаты, клеточные экстракты, тканевые экстракты, кровь, сыворотку крови, молоко, мочу, ее фракции и т.д. В способе очистки по настоящему изобретению используемая биологическая жидкость может представлять собой различные типы. Предпочтительно биологическая жидкость может представлять

собой дрожжи, растение или культуру животной клетки, более предпочтительно культуру животной клетки генетически модифицированного животного, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая дарбэпоетин альфа, трансфицирована путем генетической рекомбинации, и еще более предпочтительно культуру животной клетки, в которой животная клетка получена из яичника китайского хомячка (СНО). Как известно в уровне техники, когда используют культуру животной клетки, более предпочтительно использовать супернатант, полученный путем центрифугирования культуры.

Предпочтительно биологическую жидкость согласно настоящему изобретению можно получить при использовании способа ультрафильтрации/диафильтрации. Способ ультрафильтрации/диафильтрации может не только удалять в культуре материалы с низкой молекулярной массой с границей отсечки по молекулярной массе задерживаемых компонентов (MWCO) 10000 (например, поверхностно-активные вещества, красители, малые пептиды, компоненты сахаров и т.д.), но также могут улучшать адсорбционную эффективность колонки путем последовательного замещения буферного раствора хроматографически уравновешенным буферным раствором.

В типовом воплощении настоящего изобретения культивировали СНО клетки, трансфицированные вектором, содержащим дарбэпоетин альфа, а супернатант культуры диафильтровали с помощью ультрафильтрации (используя 10 ммольный буферный раствор фосфата натрия) и использовали в качестве биологической жидкости.

В данной заявке термин "анионообменная хроматография" относится к способу, разделяющему молекулы на основе их зарядов путем связывания отрицательно заряженных (или кислотных) молекул с положительно заряженным твердым носителем, и с помощью этой методики легко можно разделить гомологичные молекулы (кислотные, основные, нейтральные). В настоящем изобретении без ограничения можно использовать как сильную анионообменную смолу, так и слабую анионообменную смолу, например, Sephadex™, Sepharose™, SOURCE™, Mono Q™ и Mini Q™ (производства GE healthcare), а также можно использовать, не ограничиваясь указанными, смолы, в которых функциональной группой является четвертичный амин (Q), диэтиламиноэтил (DEAE, ДЭАЭ) или четвертичный аминоэтил (QAE, ЧАЭ). Предпочтительно функциональная группа может представлять собой Q или ДЭАЭ и наиболее предпочтительно Q-Sepharose™, которая является сильной анионообменной смолой.

Анионообменную хроматографию можно осуществлять с помощью колоночной хроматографии. Кроме того, анионообменная смола, применяемая в анионообменной хроматографии по настоящему изобретению, может быть уравновешена с помощью водного буферного раствора перед адсорбированием на нее культуры, и примеры буферного раствора могут включать Tris-HCl (трис-(гидроксиэтил)аминометан-HCl), буферный раствор фосфата натрия и т.д.

Кроме того, анионообменная смола, применяемая в анионообменной хроматографии по настоящему изобретению, может быть уравновешена с помощью водного буферного раствора перед адсорбированием на нее культуры.

Неподвижная фаза в методе адсорбционной хроматографии, применяемой в настоящем изобретении, может включать силикагель, оксид алюминия, оксид магния и гидроксиапатит, и наиболее предпочтительно гидроксиапатит. В частности, известно, что гидроксиапатит широко используют для традиционного извлечения нуклеиновых кислот, таких как ДНК.

После удаления биологических примесей из фракции дарбэпоетина альфа фракцию дарбэпоетина альфа, включающую структурные изоформы с различным содержанием

сиаловой кислоты, подвергают анионообменной хроматографии, осуществляя тем самым селективное отделение дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты. В способе очистки по настоящему изобретению промывание с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, может осуществляться для вымывания структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих более высокие изоэлектрические точки, чем целевая изоэлектрическая точка, для получения структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих целевую изоэлектрическую точку.

Для цели настоящего изобретения анионообменную хроматографическую колонку промывают с помощью промывающего раствора, содержащего аргинин.

В настоящем изобретении содержащий аргинин промывающий буферный раствор может предпочтительно иметь рН в области от 3,0 до 5,0 и дополнительно может включать по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, состоящей из NaCl и мочевины. В частности, промывающий буферный раствор может содержать NaCl с концентрацией от 5×10^{-3} М до 90×10^{-3} М и может содержать мочевину с концентрацией от 3 М до 8 М.

Предпочтительно способ очистки по настоящему изобретению может дополнительно включать промывание с помощью промывающего буферного раствора, содержащего или не содержащего аргинин, перед или после промывания хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, после загрузки смеси, содержащей дарбэпоетин альфа, имеющий различное содержание сиаловой кислоты, в анионообменную хроматографическую колонку и связывания дарбэпоетина альфа на этой колонке, и более предпочтительно может дополнительно включать первичное промывание хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, имеющего рН в области от 6 до 8, перед промыванием хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, а промывание хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, может представлять собой вторичное промывание хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, имеющего рН в области от 3 до 5.

Примеры промывающего буферного раствора, предназначенного для использования при промывании, могут включать буферный раствор фосфата натрия, буферный раствор ацетата натрия, буферный раствор цитрата, буферный раствор глицина-HCl, буферный раствор лимонной кислоты-фосфата натрия и т.д. Более предпочтительно промывающий буферный раствор, применяемый в первичном промывании, может представлять собой раствор фосфата натрия, имеющий рН в области от 6 до 8, а промывающий буферный раствор, используемый при вторичном промывании, может представлять собой раствор глицина-HCl, имеющий рН в области от 3 до 5, а также NaCl, мочевина и т.д. могут дополнительно включаться для достижения необходимой рН области или ионной силы подвижной фазы.

Применяемый в настоящем изобретении промывающий буферный раствор, содержащий аргинин, играет важную роль для извлечения дарбэпоетина альфа, имеющего низкое содержание сиаловой кислоты. На Фиг. 2 представлен результат хроматографирования, осуществленного с использованием раствора глицина-HCl, содержащего аргинин, в качестве промывающего буферного раствора, а на Фиг. 3 представлен результат хроматографирования, осуществленного с использованием раствора ацетата натрия, содержащего аргинин, в качестве промывающего буферного раствора. В обоих случаях было подтверждено, что элюировали дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание сиаловой кислоты. То есть показано, что, когда

применяют рН буферный раствор, содержащий аргинин, элюируют высококачественный дарбэпоетин альфа, имеющий изоэлектрическую точку от 2 до 3, и в частности, главным образом сосредоточенную в области изоэлектрической точки 2 (обозначенные стрелками участки на Фиг. 2 и Фиг. 3).

5 Напротив, когда промывающий буферный раствор не содержал аргинин, хотя другие условия оставались теми же, в большом количестве элюировали структурные изоформы дарбэпоетина альфа, имеющие низкое содержание сиаловой кислоты, с изоэлектрической точкой примерно 3 и выше, подтверждая таким образом значительное снижение очищающего действия промывающего буферного раствора на структурные изоформы
10 дарбэпоетина альфа (Фиг. 4).

После осуществления промывания с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание сиаловой кислоты, элюировали с помощью ступенчатого изменения градиента соли с помощью буферного раствора, имеющего рН в области от 6 до 8.

15 В другом типовом воплощении настоящего изобретения предложен способ очистки дарбэпоетина альфа, в котором можно селективно отделить только структурные изоформы с высоким содержанием сиаловой кислоты с помощью дополнительного применения гель-фильтрующей хроматографии. То есть способ может представлять собой способ очистки, дополнительно включающий фракционирование элюата со
20 стадии анионообменного хроматографирования, полученного выше, путем применения гель-фильтрующей хроматографии.

Гель-фильтрующая хроматография представляет собой способ разделения протеинов в соответствии с их размером и может применяться для разделения протеиновых полимеров. Примеры смолы, используемой в гель-фильтрующей хроматографии, могут
25 включать Sephadex™, Sepharose™, Sephacryl™ и т.д. (производства GE healthcare), и наиболее предпочтительно может использоваться Sephacryl S-100, S-200 и S-300.

Когда элюат со стадии анионообменного хроматографирования, полученный путем осуществления анионного хроматографирования с использованием промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, дополнительно подвергают гель-
30 фильтрующей хроматографии, можно элюировать дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание сиаловой кислоты и чистоту 99% или выше.

Элюат, имеющий целевую изоэлектрическую точку, можно получить путем уравнивания в достаточной степени колонки для гель-фильтрующей хроматографии буферным раствором, загрузкой элюата, полученного на стадии анионного
35 хроматографирования с использованием промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, в уравнивленную колонку для гель-фильтрующей хроматографии с последующим фракционированием этого элюата. В порядке выхода фракций фракция, элюируемая раньше, может иметь более высокое содержание сиаловой кислоты.

40 В другом типовом воплощении настоящего изобретения около 1,7 л смолы Sephacryl от S-100 до S-200 (производства GE Healthcare) заполняли внутрь колонки XK-50/90 (производства GE Healthcare) и пропускали через нее достаточное количество 20×10^{-3} М буферного раствора фосфата натрия, содержащего 140 ммоль NaCl (рН 6,2), для уравнивания колонки для гель-фильтрации. Затем раствор, содержащий
45 дарбэпоетин альфа, концентрировали, и около 60 мл концентрата пропускали через колонку со скоростью 7,5 мл/мин, а 20×10^{-3} М буферный раствор фосфата натрия, содержащий 140 ммоль NaCl, (рН 6,2), в достаточном количестве пропускали через колонку, тем самым осуществляя фракционирование элюата, содержащего дарбэпоетин

альфа с высоким содержанием сиаловой кислоты (Фиг. 5). Было подтверждено, что фракции элюата дарбэпоетина альфа имели более высокое содержание сиаловой кислоты в порядке выхода фракций (Таблица 1 и Фиг. 6).

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ очистки дарбэпоетина альфа, включающий стадии: (а) элюирования фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем хроматографирования биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, методом анионообменной хроматографии; (b) элюирования фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем хроматографирования элюата, полученного на стадии (а), методом хроматографии на гидроксипатитовой смоле; (с) связывания дарбэпоетина альфа на анионообменной хроматографической колонке путем загрузки элюата, полученного на стадии (b), на анионообменную хроматографическую колонку; (d) промывания колонки, обработанной на стадии (с), с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин; и (е) элюирования дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке при промывании на стадии (d), из этой колонки.

Каждую стадию способа можно подробно объяснить, как показано ниже.

Стадия (а) представляет собой элюирование фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем хроматографирования биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, методом анионообменной хроматографии и предпочтительно может представлять собой адсорбцию биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, на уравновешенную анионообменную хроматографическую колонку путем добавления на нее биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, промывание колонки с помощью промывающего буферного раствора, который имеет рН в области от 6 до 8 и содержит от 10 ммоль до 100 ммоль NaCl, и элюирование фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, с помощью элюирующего буферного раствора, который имеет рН в области от 6 до 8 и содержит от 100 ммоль до 300 ммоль NaCl.

Анионообменная хроматография и смола, наполняющая соответствующую колонку, такие же, как описаны выше.

В типовом воплощении настоящего изобретения около 1 л культуры, которая получена методом экспрессирования дарбэпоетина альфа в СНО клетки, трансфицированные вектором, содержащим дарбэпоетин альфа, диафильтровали методом ультрафильтрации (MWCO равен 10000) с использованием 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0) для получения биологической жидкости, которую хроматографировали на ХК-50 колонке, наполненной анионообменной смолой (Q быстрый поток, производства GE Healthcare), уравновешенной с помощью 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0), а потом примерно 2 колоночными объемами (CV) 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0) были пропущены через колонку для уравновешивания колонки. Затем колонку промывали с помощью промывающего буферного раствора, содержащего NaCl от 0 ммоль до 100 ммоль, и после проводили элюирование с использованием элюирующего буферного раствора, который имеет рН в области от 6 до 8 и содержит от 100 ммоль до 300 ммоль NaCl. В результате анионообменной хроматографии, как было показано методом ОФ-ВЭЖХ (обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии), примеси, находящиеся в биологической жидкости, удалялись, а элюат очищали в раствор, содержащий большое количество дарбэпоетина альфа (Фиг. 1В).

Стадия (b) представляет собой загрузку элюата, выделенного на стадии (а), на неподвижную фазу уравновешенной колонки для адсорбционной хроматографии, более предпочтительно на уравновешенную гидроксипатитовую смолу, промывание

полученной в результате смолы с помощью промывающего буферного раствора, имеющего рН в области от 6 до 8, в котором содержание фосфата натрия составляет от 0 ммоль до 100 ммоль, тем самым получая фракцию, содержащую дарбэпоетин альфа, из жидкости, выделенной без адсорбирования на смолу во процессе загрузки и промывания.

Примеры неподвижной фазы для адсорбционной хроматографии, применяемые в настоящем изобретении, могут включать силикагель, оксид алюминия, оксид магния и гидроксиапатит, и наиболее предпочтительно гидроксиапатит. В данной заявке термин "хроматография на гидроксиапатитовой смоле" или "хроматография на гидроксиапатите" относится к адсорбционной хроматографии, включающей неподвижную фазу, наполненную гидроксиапатитовой смолой, и может использоваться взаимозаменяемо с термином "гидроксиапатитовая колонка".

Примеры буферных растворов, применяемых на каждой из стадий промывания и элюирования, предпочтительно включают буферный раствор фосфата натрия, буферный раствор фосфата калия, и буферный раствор, содержащий Tris (трис(гидроксиэтил)аминометан).

В типовом воплощении настоящего изобретения элюат, полученный путем хроматографирования на анионообменной смоле, наносили на ХК-50 колонку, заполненную гидроксиапатитовой смолой, уравновешенную 7 ммольным буферным раствором фосфата натрия (рН 7,0), и пропускали через нее около трех колоночных объемов 7 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0), тем самым выделяя связанный на ней дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание гликанов. В результате хроматографирования на гидроксиапатитовой смоле, как было показано методом ОФ-ВЭЖХ, примеси, находящиеся в биологической жидкости, удаляли, а элюат очищали в раствор, содержащий большое количество дарбэпоетина альфа (Фиг. 1С).

Примеры воплощения изобретения

Здесь и далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Однако эти примеры приведены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения.

Пример 1. Получение смеси изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих различное содержание сиаловой кислоты, методом анионообменной хроматографии и адсорбционной хроматографии на гидроксиапатитовой смоле

Около 1 л культуры, которую получали методом экспрессирования дарбэпоетина альфа в СНО клетки, трансфицированные вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую дарбэпоетин альфа, диафильтровали методом ультрафильтрации (MWCO равен 10000) с использованием 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0) для получения биологической жидкости. Полученный в результате фильтрат последовательно подвергали обработке на двух колонках анионообменной и адсорбционной хроматографии на гидроксиапатитовой смоле.

Во-первых, анионообменную хроматографию проводили следующим образом. Колонку ХК-50 (производства GE Healthcare) заполняли примерно 100 мл анионообменной смолы (Q быстрый поток, производства GE Healthcare) и пропускали через нее 10 ммольный буферный раствор фосфата натрия (рН 7,0) для уравновешивания колонки. Диафильтрат в количестве от примерно 0,1 л до 0,2 л пропускали через подготовленную для этого колонку Q Sepharose FF со скоростью 15 мл/мин, и затем около 2 колоночных объемов (CV) 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (рН 7,0) снова пропускали через нее для уравновешивания колонки. Колонку промывали с помощью

промывающего буферного раствора, содержащего от 10 ммоль до 100 ммоль NaCl, и затем элюировали с помощью элюирующего буферного раствора, который имеет pH от 6 до 8 и содержит от 100 ммоль до 300 ммоль NaCl.

Во-вторых, элюат, который подвергали анионообменной хроматографии, подвергали адсорбционной хроматографии на гидроксиапатитовой смоле, как описано ниже. Колонку XK-50 (производства GE Healthcare) заполняли примерно 100 мл гидроксиапатитовой смолы (производства GE Healthcare) и пропускали через нее 7 ммольный буферный раствор фосфата натрия (pH 7,0) для уравнивания колонки. Около 0,1 л диафильтрата пропускали через подготовленную для этого гидроксиапатитовую колонку со скоростью 10 мл/мин, и затем снова пропускали через нее около 3 колоночных объемов (CV) 7 ммольного буферного раствора фосфата натрия (pH 7,0).

В частности, растворы, выделенные без адсорбирования на смолу в процессе загрузки и промывания, содержали дарбэпоетин альфа с различным содержанием сиаловой кислоты, и эти растворы собирали и подвергали обработке следующим способом. После промывания буферный раствор фосфата калия с концентрацией от 0,1 М до 0,7 М (pH 7) пропускали через смолу и фракцию(и), содержащую(ие) дарбэпоетин альфа с низким содержанием гликанов и примеси, извлекали путем элюирования. Извлечение примесей биологического происхождения и большого количества дарбэпоетина альфа в эти растворы подтверждали методом ОФ-ВЭЖХ (Фиг. 1).

Пример 2. Очистка дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты, с помощью способа промывания с применением аргинина в анионообменной хроматографии

Около 20 мл смолы Q Sepharose FF (производства GE Healthcare) заполняли внутрь XK-26 колонки (производства GE Healthcare) и пропускали через нее достаточное количество 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия (pH 7,0) для уравнивания колонки.

Около 0,2 л раствора, содержащего дарбэпоетин альфа, полученный в примере 1, пропускали через колонку со скоростью 5 мл/мин, и затем пропускали через нее 10 ммольный буферный раствор фосфата натрия (pH 7,0), который представляет собой равновесный буферный раствор, для уравнивания колонки. Затем колонку подвергали первичному промыванию 10 ммольным буферным раствором фосфата натрия (pH 7,0), содержащим 50 ммоль NaCl, а затем последовательно вторичному промыванию буферным раствором глицина-HCl, который имел pH от 3 до 5 и содержал мочевины, аргинин и NaCl, тем самым вымывая фракции, содержащие дарбэпоетин альфа с низким содержанием сиаловой кислоты. При использовании буферного раствора фосфата натрия, содержащего 190 ммоль NaCl (pH 6,2) выделяли протеины только с высокой степенью гликозилирования и низкими изоэлектрическими точками. Методом ИЭФ было показано, что дарбэпоетин альфа, полученный с помощью указанных способов промывания, является высококачественным (Фиг. 2).

Пример 3. Определение действия промывающего раствора, содержащего аргинин, на содержание сиаловой кислоты

Было подтверждено, что способ промывания с применением аргинина в примере 2 играет важную роль в очистке дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты.

Раствор, содержащий дарбэпоетин альфа, полученный в примере 1, тем же способом, что и в Примере 2, адсорбировали на колонку Q Sepharose FF и пропускали через нее около 2 колоночных объемов (CV) 10 ммольного буферного раствора фосфата натрия

(рН 7,0), представляющего собой равновесный буферный раствор, для осуществления первичного промывания. Однако вторичное промывание осуществляли с использованием буферного раствора ацетата натрия с рН от 3 до 5 или менее вместо буферного раствора глицина-HCl, используемого в Примере 2. Было подтверждено, что в результате элюирования был получен дарбэпоетин альфа с высоким содержанием сиаловой кислоты, имеющий изоэлектрическую точку, равную 2~3 или менее (выделенные стрелками участки на Фиг. 3).

В другом аспекте настоящего изобретения первичное промывание и вторичное промывание осуществляли таким же способом, как в Примере 2, но без аргинина. В результате элюирования выделяли даже дарбэпоетин альфа с низким содержанием сиаловой кислоты, имеющий изоэлектрическую точку, равную 2~3 или выше, подтверждая таким образом существенное ухудшение качества продукта (выделенные стрелками участки на Фиг. 4).

В этом примере подтвердили, что аргинин является важным фактором в получении дарбэпоетина альфа, содержащего сиаловую кислоту, с низкой изоэлектрической точкой.

Пример 4. Очистка дарбэпоетина альфа, имеющего высокое содержание сиаловой кислоты, с помощью гель-фильтрующей хроматографии

Около 1,7 л смол Q Sephacryl от S-100 до S-200 (производства GE Healthcare) заполняли внутрь ХК-50/90 колонки (производства GE Healthcare) и пропускали через нее достаточное количество 20 ммольного буферного раствора фосфата натрия, содержащего 140 ммоль NaCl (рН 6,2), для уравнивания колонки.

Раствор, содержащий дарбэпоетин альфа, полученный в примере 2, концентрировали и около 5 мл этого концентрата пропускали через колонку со скоростью 7,5 мл/мин, а достаточное количество 20 ммольного буферного раствора фосфата натрия, содержащего 140 ммоль NaCl (рН 6,2), пропускали через колонку для осуществления фракционирования элюата, содержащего дарбэпоетин альфа с высоким содержанием сиаловой кислоты (Фиг. 5). Было подтверждено, что фракции элюата дарбэпоетина альфа имели более высокое содержание сиаловой кислоты в порядке выхода фракций (Таблица 1 и Фиг. 6). Результаты, полученные методом ВЭЖХ на слабо анионообменной смоле (Wax-ВЭЖХ), демонстрирующие содержание сиаловой кислоты, соответствующее каждой фракции, приведены ниже в Таблице 1.

Таблица 1.

тетра-сиалированный N-гликан (%)				
Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4	Фракция 5
53,6	71,1	70,7	64,9	46,7

Суммируя вышеуказанные результаты, было подтверждено, что в случаях применения анионообменной колонки дарбэпоетин альфа, имеющий высокое содержание сиаловой кислоты, можно очистить с помощью способа промывания с использованием буферного раствора, содержащего аргинин. Кроме того, было показано, что в результате фракционирования после дополнительного осуществления гель-фильтрующей хроматографии дарбэпоетин альфа, имеющий высоким содержанием сиаловой кислоты и высокую чистоту, можно очистить согласно способу по настоящему изобретению.

На основании вышеизложенного, специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение, сможет понять, что настоящее изобретение может быть реализовано в других специфических формах без изменения технической концепции или существенных признаков настоящего изобретения. В связи с этим, типовые воплощения изобретения приведены здесь только в качестве иллюстрации и не должны

восприниматься в качестве основания для ограничения объема настоящего изобретения. Наоборот, настоящее изобретение предназначено охватить не только типовые воплощения, но и различные варианты, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые составляют объем и сущность настоящего изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ очистки дарбэпоетина альфа, включающий:
 - (а) связывание дарбэпоетина альфа на колонке для анионообменной хроматографии путем загрузки смеси, включающей дарбэпоетин альфа, имеющий различное содержание сиаловой кислоты, на колонку для анионообменной хроматографии;
 - (б) промывание хроматографической колонки с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, для удаления структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих более высокие изоэлектрические точки, чем целевая изоэлектрическая точка, и
 - (с) элюирование дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке, из этой колонки, при этом дарбэпоетин альфа, выделенный на стадии (с), имеет изоэлектрическую точку от рI 2,0 до 4,0.
2. Способ по п. 1, в котором промывающий буферный раствор, содержащий аргинин, имеет рН в области от 3,0 до 5,0.
3. Способ по п. 1, в котором промывающий буферный раствор, содержащий аргинин, дополнительно включает по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, состоящей из NaCl и мочевины.
4. Способ по п. 3, в котором промывающий буферный раствор включает NaCl с концентрацией от 5 ммоль до 90 ммоль.
5. Способ по п. 3, в котором промывающий буферный раствор включает мочевину с концентрацией от 3 моль до 8 моль.
6. Способ по п. 1, дополнительно включающий до или после стадии (б) промывание с помощью промывающего буферного раствора, содержащего или не содержащего аргинин.
7. Способ по п. 1, дополнительно включающий перед стадией (б) первичное промывание колонки с помощью промывающего буферного раствора, имеющего рН в области от 6 до 8, при этом на стадии (б) происходит вторичное промывание колонки содержащим аргинин промывающим буферным раствором, имеющим рН в области от 3 до 5.
8. Способ по п. 7, в котором промывающий буферный раствор для первичного промывания представляет собой раствор фосфата натрия, а промывающий буферный раствор для вторичного промывания представляет собой раствор глицина-HCl.
9. Способ по п. 1, в котором смесь представляет собой дрожжевую культуру, культуру растительной клетки или культуру животной клетки.
10. Способ по п. 1, в котором колонка для анионообменной хроматографии содержит смолу, имеющую функциональную группу, которая выбрана из группы, состоящей из четвертичного амина (Q), диэтиламиноэтила (DEAE) и четвертичного аминоэтила (QAE).
11. Способ по п. 1, дополнительно включающий (d) фракционирование элюата анионообменного хроматографирования, полученного на стадии (с), путем применения к нему гель-фильтрующей хроматографии.

12. Способ очистки дарбэпоетин альфа, включающий:

(а) элюирование фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем использования биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, на стадии анионообменного хроматографирования;

5 (b) элюирование фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, путем использования элюата, полученного на стадии (а), на стадии адсорбционной хроматографии;

(с) связывание дарбэпоетина альфа на анионообменной хроматографической колонке путем загрузки элюата, полученного на стадии (b), на анионообменную хроматографическую колонку;

10 (d) промывание колонки, обработанной на стадии (с), с помощью промывающего буферного раствора, содержащего аргинин, для удаления структурных изоформ дарбэпоетина альфа, имеющих более высокие изоэлектрические точки, чем целевая изоэлектрическая точка, и

(е) элюирование дарбэпоетина альфа, который остается связанным на хроматографической колонке, при промывании на стадии (d), из этой колонки, при этом дарбэпоетин альфа, выделенный на стадии (с), имеет изоэлектрическую точку от рI 2,0 до 4,0.

13. Способ по п. 12, в котором неподвижная фаза на стадии адсорбционной хроматографии представляет собой гидроксипатитовую смолу.

20 14. Способ по п. 12, дополнительно включающий (f) фракционирование элюата со стадии анионообменного хроматографирования, полученного на стадии (е), путем его использования на стадии гель-фильтрующей хроматографии.

15. Способ по п. 12, стадия (а) которого включает адсорбирование биологической жидкости, содержащей дарбэпоетин альфа, на уравновешенную анионообменную смолу путем добавления на нее указанной жидкости, промывание полученной смолы с помощью промывающего буферного раствора, который имеет рН от 6 до 8 и содержит от 0 ммоль до 100 ммоль NaCl, и элюирование фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, с помощью элюирующего буферного раствора, который имеет рН от 6 до 8 и содержит от 100 ммоль до 300 ммоль NaCl.

30 16. Способ по п. 12, стадия (b) которого включает загрузку элюата, выделенного на стадии (а), на уравновешенную гидроксипатитовую смолу, промывание полученной смолы с помощью промывающего буферного раствора, который имеет рН от 6 до 8 и содержит от 0 ммоль до 100 ммоль фосфата натрия, и получение фракции, содержащей дарбэпоетин альфа, из жидкости, вымываемой со смолы, которая не адсорбируется на нее во время загрузки и промывания.

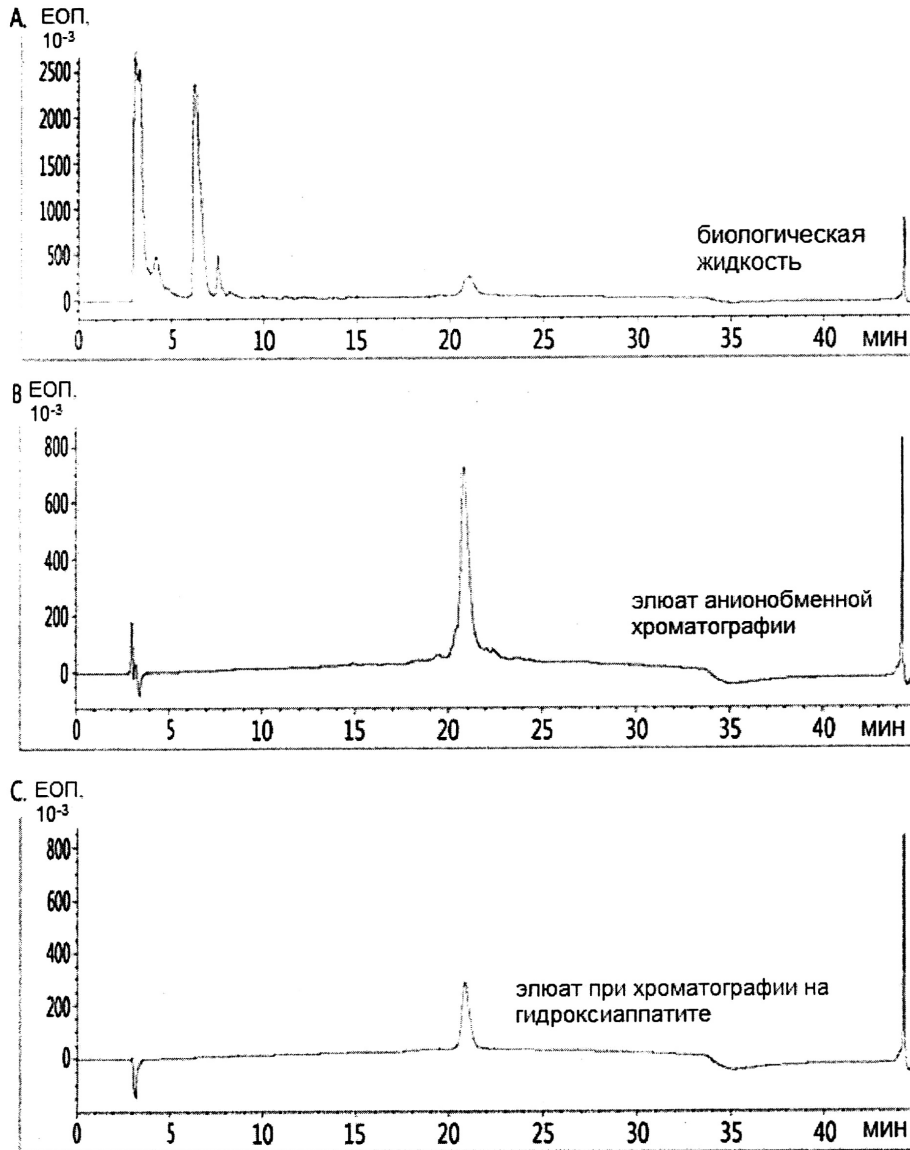
40

45

СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА

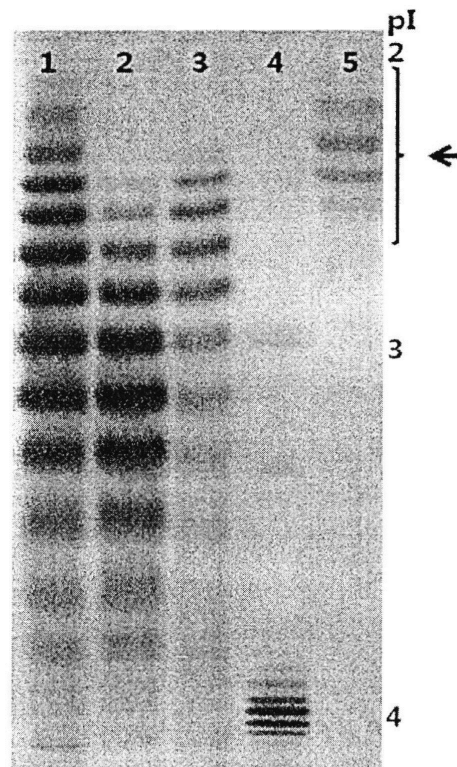
1/6

ФИГ. 1



СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА
2/6

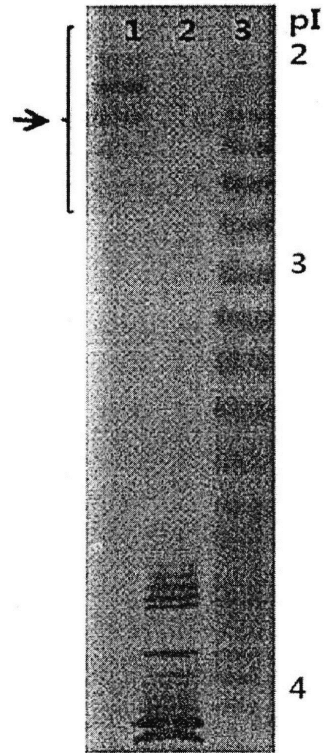
ФИГ. 2



1. Загрузка раствора для анионообменной хроматографии
2. 1^{ый} промывающий раствор для анионообменной хроматографии
3. 2^{ой} промывающий раствор для анионообменной хроматографии
(Gly/HCl буферный раствор, содержащий L-аргинин)
4. Маркер
5. Элюат анионообменной хроматографии

СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА
3/6

ФИГ. 3



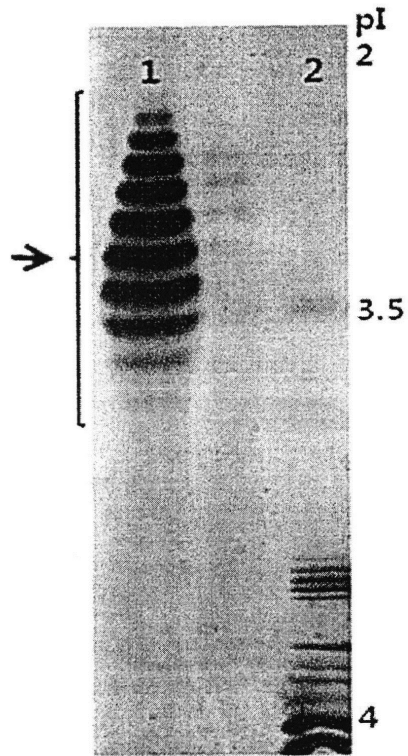
Применение промывающего раствора, содержащего L-аргинин, в буферном растворе ацетата натрия

1. Элюат анионообменной хроматографии
2. Маркер
3. Загрузка раствора для анионообменной хроматографии

СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА

4/6

ФИГ. 4



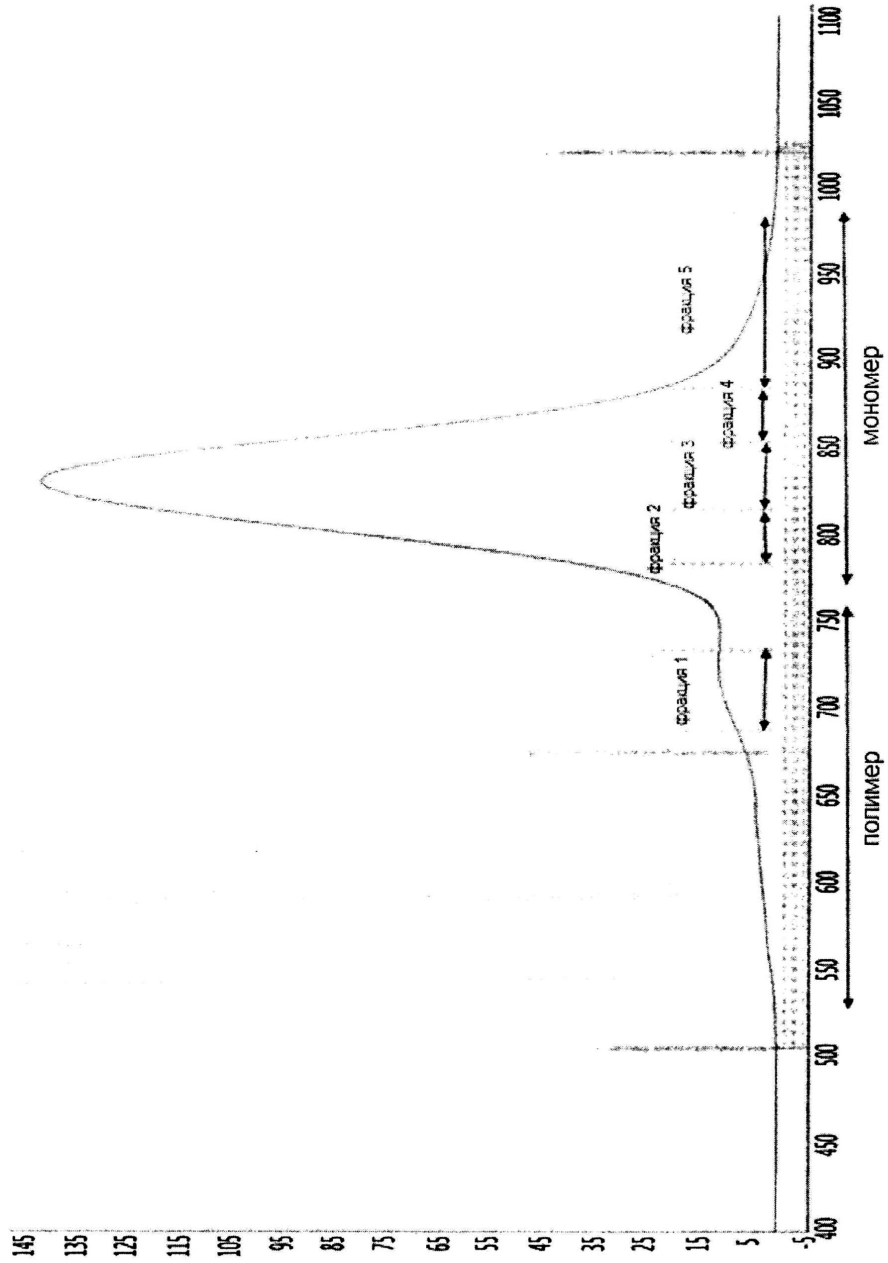
Применение глицин-HCl буферного раствора, не содержащего аргинин, в качестве промывающего раствора

1. Элюат хроматографирования на анионообменной смоле
2. Маркер

СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА

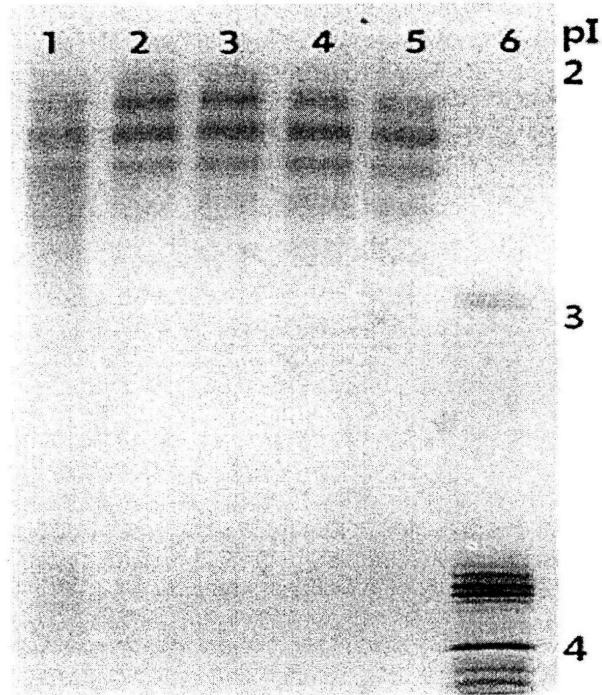
5/6

ФИГ. 5



СПОСОБ ОЧИСТКИ ДАРБЭПОЕТИНА АЛЬФА
6/6

ФИГ. 6



1. Фракция 1
2. Фракция 2
3. Фракция 3
4. Фракция 4
5. Фракция 5
6. МАРКЕР