

(11) Número de Publicação: **PT 1428878 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 15/11** (2007.10) **C07K 14/505** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2002.12.13</b>	(73) Titular(es): <b>BIOCEUTICALS ARZNEIMITTEL AG</b> <b>STADASTRASSE 2-18 61118 BAD VILBEL DE</b>
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.06.16</b>	(72) Inventor(es): <b>MICHAEL BAVAND CH</b> <b>HORST BLASEY CH</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2008.08.20</b> <b>226/2008</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ERITROPOIETINA**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ERITROPOIETINA"

A presente invenção refere-se à produção de glicoproteínas recombinantes, em particular, eritropoietina humana recombinante, em células de mamíferos, bem como a métodos de purificação das glicoproteínas produzidas a partir do meio de cultura.

Com algumas excepções, as proteínas secretadas e associadas à membrana de todas as células eucarióticas são glicosiladas. É bem conhecido que as porções de hidrato de carbono de tais glicoproteínas são importantes para exercer as suas actividades e funções biológicas, tais como secreção, tempo de meia vida biológico, antigenicidade e estabilidade. A maioria das potenciais e actuais terapêuticas recombinantes para aplicações em humanos são glicoproteínas. A modificação da porção glicídica de uma proteína humana recombinante pode conduzir a um produto com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas, tais como um tempo de meia vida em circulação aumentado, direccionamento para o local de acção (biodisponibilidade e especificidade aumentada), bem como estabilidade *in vivo* e *in vitro* aumentada, heterogeneidade diminuída e antigenicidade/imunogenicidade diminuída. Foram demonstradas relações estrutura-função para as porções glicídicas, para várias glicoproteínas humanas recombinantes terapêuticas, tais como eritropoietina, Factor VIII e  $\beta$ -glucocerebrosidase.

Em geral, não foi identificada qualquer função biológica específica associada com nenhuma estrutura definida de hidrato de carbono. Em vez disso, devem ser procuradas relações estrutura-função para o contexto de padrões de glicosilação analíticos e abundância relativa de cadeias de hidratos de carbono. Estas, por sua vez, são caracterizadas por propriedades físico-químicas, tais como o número e tipo de estrutura ramificada (antenaridade), estruturas repetidas e conteúdo em ácido siálico. Como um resultado de avaliações exaustivas de estrutura-função de algumas proteínas modelo, surgiram algumas regras para a classificação da qualidade de uma glicoproteína recombinante com base nas características da sua porção glicídica.

A eritropoietina é uma hormona glicoproteica bem estudada, envolvida na maturação de células eritróides progenitoras em eritrócitos. É essencial na regulação dos níveis de glóbulos vermelhos em circulação. A eritropoietina que ocorre naturalmente é produzida no fígado durante a vida fetal e pelo rim de adultos, circula no sangue e estimula a produção de glóbulos vermelhos na medula óssea. A anemia é quase sempre, invariavelmente, uma consequência de uma insuficiência renal provocada pela produção diminuída de eritropoietina pelo rim.

A eritropoietina recombinante produzida através de técnicas de engenharia genética, envolvendo a transferência e expressão de um gene codificando a eritropoietina numa célula hospedeira de mamífero, mostrou ser eficaz quando utilizada no tratamento de anemia resultante de insuficiência renal crónica. A eritropoietina é uma glicoproteína com um peso molecular que varia desde 34 a 38 kDa, do qual, aproximadamente, 40 a 50% consiste em porções de hidrato de carbono. O volume das cadeias

de hidrato de carbono está ligado em N a 3 asparaginas e os pequenos hidratos de carbono estão ligados em O a uma serina. A glicosilação do tipo complexo com glicoe estruturas de elevada antenaridade pode ser observada com a eritropoietina e a galactose terminal é altamente sialilada. A glicosilação ou sialilação não parece ser um pré-requisito para a ligação ao receptor e actividade da eritropoietina *in vitro*, no entanto, a eritropoietina desglicosilada ou dessializada exerce um tempo de meia vida curto *in vivo*. Deste modo, são necessárias características da glicosilação e sialilação da eritropoietina para potenciar o tempo de meia vida *in vivo* e, também, para influenciar a via de eliminação e o direccionamento para os órgãos da molécula.

A preparação de glicoe estruturas adequadas ligadas à proteína de eritropoietina deve ser o foco dos esforços de desenvolvimento para obter uma preparação de eritropoietina terapêuticamente possível. Além do tempo de meia vida, via de eliminação e direccionamento para os órgãos, estudos físico-químicos demonstraram que a glicosilação também aumenta a estabilidade da eritropoietina contra a degradação química e biológica. A glicosilação e sialilação da eritropoietina natural (eritropoietina urinária) e da eritropoietina recombinante foi estudada exaustivamente ao nível analítico descritivo, no entanto, estão apenas disponíveis poucos dados para correlacionar os dados analíticos com o resultado final terapêutico. A partir de dados disponíveis, parece que as seguintes características parecem ser desejáveis, de modo a obter um bom produto que seja terapêuticamente eficaz.

Primeiro, a qualidade do produto de eritropoietina parece ser influenciada pelo tipo e nível de sialilação da galactose

terminal. Imai *et al.* (1990, *Eur. J. Biochem.* 194:457-462) mostraram que as isoformas de eritropoietina com elevado conteúdo em ácido siálico exercem uma actividade específica superior àquelas com conteúdo em ácido siálico inferior. Rush *et al.* (1995, *Anal. Chem.* 67:1442-1452) descreveram a O-acetilação de resíduos de ácido siálico da eritropoietina e seu efeito no aumento do tempo de circulação. Os estudos de eliminação efectuados por Fukuda *et al.* (1989, *Blood* 73:84-89) em ratos, mostraram que a eritropoietina derivada de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) foi eliminada do sangue com um tempo de meia vida de, aproximadamente, 2 horas, seguindo um mecanismo de eliminação bifásico. A eritropoietina asialo foi eliminada em dez minutos, sugerindo um mecanismo de ligação à galactose das células hepáticas como sendo responsável pela eliminação da eritropoietina asialo. Spivak e Hogans (1989, *Blood* 73:90-99) mostraram que com a eritropoietina comercial, a eliminação plasmática da eritropoietina foi multiexponencial com uma fase de distribuição inicial rápida ( $T_{1/2}=53$  min) e uma fase de eliminação mais lenta ( $T_{1/2}=180$  min.). A acumulação nos órgãos nos rins, medula óssea e baço iniciou-se ao 30 min após injeção de eritropoietina comercial. A eritropoietina asialo foi rapidamente eliminada através da via hepática.

Deste modo, evidências publicadas sobre a sialilação da eritropoietina revelaram três efeitos principais da sialilação da eritropoietina na actividade *in vivo*:

- A eliminação da eritropoietina na circulação diminui quando a eritropoietina é sialilada. A extensão da sialilação depende da extensão das estruturas antenárias presentes que proporcionam o substrato para a sialilação de galactoses terminais.

- As isoformas de eritropoietina com o número mais elevado de ácidos siálicos parecem exercer uma actividade específica mais elevada.
- A eritropoietina asialo é rapidamente eliminada através da via hepática, a eritropoietina pouco sialilada (estruturas biantenárias) são direccionadas para os rins e baço. As estruturas antenárias mais sialidadas (triantenárias e tetraantenárias) são principalmente direccionadas para as células da medula óssea.
- Um elevado grau de O-acetilação dos resíduos de ácido siálico aumenta o tempo de circulação ao reduzir a eliminação hepática.

É deste modo desejável utilizar condições durante a cultura de células de mamíferos que permitam, de um modo consistente, a sialilação máxima da maioria das estruturas de hidratos de carbono ligadas em N. As condições para a sialilação máxima seriam uma vantagem considerável para a preparação de terapêuticas com glicoproteínas. Considerando os efeitos benéficos das glicoproteínas altamente sialiladas, em particular, a eritropoietina, é um objectivo da presente invenção proporcionar métodos para aumentar o nível de sialilação de glicoproteínas, em particular da eritropoietina, através da modificação das condições de cultura celular durante a produção de glicoproteínas.

De um modo surpreendente, verificou-se que o nível de sialilação das glicoproteínas, em particular da eritropoietina, pode ser optimizado por cultura de células de mamífero

produtoras de glicoproteínas a pH que suporte a produção de proteínas altamente sialiladas.

Tradicionalmente, o pH de um meio de cultura é manipulado com o objectivo de alcançar o máximo de crescimento e/ou produção celular. Os meios de cultura celular são tipicamente preparados com pH ajustado para 7,4, semelhante ao pH do sangue humano. O pH óptimo está, no entanto, dependente da linha celular e pode variar desde pH 6,9-7,6 (revisto em Eagle (1973) J. Cell Physiol. 82:1-89).

Deste modo, o efeito do pH no crescimento e/ou produção celular e, não o seu efeito na natureza de um produto celular tem sido o factor determinante na selecção de valores de pH na cultura celular tradicional. Por exemplo, a técnica anterior revelou a variação do pH, glucose e produção de lactose nas fases de crescimento e produção do processo de cultura celular, de modo a otimizar o crescimento e produção, respectivamente (ver, por exemplo, o documento WO 88/01643, cuja referência não refere a natureza dos produtos celulares produzidos). A patente US 5096816 revela o efeito da amónia na glicosilação dos produtos celulares, através do controlo do pH. O método preferido descreve uma estratégia de multi-pH para o crescimento celular óptimo a pH superior e, depois, a utilização de pH baixo para minimizar a inibição da sialilação terminal dos produtos celulares através de níveis elevados de amónia.

De um modo surpreendente, verificou-se agora um efeito oposto ao descrito na patente US 5096816. A produção do produto celular descrito contendo um nível máximo de sialilação é melhor na gama de pH mais elevada.

Como apresentado na Figura 1, a cultura celular empregando o controlo de pH entre pH 7,2-7,5, resulta na formação de produto com um nível superior de sialilação. As Figuras 1A e 1B mostram os resultados dos perfis de distribuição das isoformas do produto da eritropoietina humana recombinante, obtidos após o cultivo sob diferentes condições de pH controlado. O produto produzido sob as condições de cultura a diferentes pH, foi isolado através de um processo de purificação em 2 passos (produto capturado com uma Q-Sepharose XL (Amersham Lifesciences, Alemanha) e um passo de eluição de sal, seguido por um passo de Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) com Butil-Sepharose FF (Amersham Lifesciences, Alemanha) e analisado por electroforese capilar (CE). A CE separa as isoformas de eritropoietina pela carga e, deste modo, é uma ferramenta analítica para avaliar o estado de sialilação de um produto celular.

Como pode ser observado na Figura 1A, ocorre um desvio na distribuição das isoformas em direcção às isoformas mais carregadas (maior número de picos) em condições de cultura empregando um pH de 7,2-7,5. Uma preparação purificada de uma preparação de referência altamente glicosilada e sialilada, o Padrão BRP de eritropoietina da Farmacopeia Europeia (Ph. Eur. (2002) 4ª edição), foi incluída na análise, para comparação. Em particular, as formas superiores do produto de eritropoietina sialilada, representadas pelas isoformas nos picos 7 e 8 estão presentes numa proporção significativamente inferior nos produtos derivados da cultura celular a pH 6,9. Deste modo, a cultura celular empregando um controlo de pH entre pH 7,2-7,5 resulta na formação de produto com um nível superior de sialilação dos produtos. É preferido o pH de 7,2, a qual proporcionou um bom rendimento do produto e um nível elevado de



sialilação. Embora a densidade celular total a este pH seja inferior a, e. g., pH 6,9, a qualidade da glicoproteína (neste caso, eritropoietina), no que se refere ao conteúdo em sialilo, é melhor a pH entre 7,2 e 7,5.

Além disso, a verificação surpreendente que o cultivo celular, a valores de pH comparativamente elevados, tal como pH 7,2 a 7,5, conduz a eritropoietina com um conteúdo superior em grupos glicosilo e sialilo, embora a massa celular seja reduzida, pode também ser utilizada na produção de outras glicoproteínas, tais como t-PA, Factor XIII, Factor VIII, Interferão- $\beta$ , IL-2.

O valor de pH óptimo pode ser específico para o tipo de célula e linha celular e pode ser determinado através das experiências apresentadas na Figura 2. No caso de células CHO será um pH de 7,2, como exemplificado pelas células CHO que produzem EPO.

O termo "isoforma", como aqui utilizado, refere-se a uma preparação/fracção de eritropoietina que contém glicoproteínas que apresentam uma sequência de aminoácidos idêntica ou muito semelhante e um ponto isoelétrico comum, mas que podem diferir em relação à extensão, complexidade, natureza, antenaridade e ordem de grupos glicosilo e sialilo ligados. As isoformas, de acordo com a invenção, podem também compreender múltiplas formas de eritropoietina com uma sequência de aminoácidos idêntica ou muito semelhante e um ponto isoelétrico que difere, adicionalmente, noutras modificações que apresentam carga, tais como acetilação e sulfatação. O termo "sequência de aminoácidos muito semelhante" indica que a sequência de aminoácidos de uma

proteína também compreende as sequências que são funcionalmente equivalentes à sequência de aminoácidos do tipo selvagem.

Deste modo, as isoformas de glicoproteína, de acordo com a invenção, são definidas pelo seu ponto isoelétrico e sequência de aminoácidos e, por isso, cada isoforma pode, na realidade, compreender múltiplas isoformas no sentido estritamente químico.

A presente invenção refere-se também a um método para a purificação de glicoproteínas altamente glicosiladas e, particularmente, sialiladas, em particular eritropoietina humana recombinante, a partir de cultura celular.

A eritropoietina humana recombinante, quando analisada a partir do sobrenadante da cultura celular, através de focagem isoelétrica (IEF), mostra um perfil de isoformas com um ponto isoelétrico (pI) amplo, com mais de 14 isoformas diferentes ao longo de uma gama de pH de 3-9 (Gokana *et al.* (1997) *J. Chromatogr.*, 791 (1-2): 109-18). As isoformas de eritropoietina surgem principalmente devido ao seu variado conteúdo em glicosilo com variados números de resíduos de ácido siálico terminal carregados negativamente. Pensa-se que as formas de eritropoietina com mais resíduos de ácido siálico e, assim, um perfil pI mais ácido tenham um valor terapêutico superior porque os resíduos de ácido siálico terminal nas glicoestruturas previnem a rápida eliminação *in vivo* através da via do receptor asialo.

O pedido de patente internacional WO-A1-86/07594 revela um método de purificação da eritropoietina a partir de um fluido compreendendo os passos de submeter o referido fluido a uma separação por cromatografia líquida de fase reversa, envolvendo

um resina C<sub>4</sub> ou C<sub>6</sub> imobilizada, para ligar selectivamente a eritropoietina no referido fluido à referida resina, seguida por uma eluição selectiva da eritropoietina ligada da referida resina com uma solução aquosa de etanol de 50 a 80 por cento a um pH de cerca de 4,5 a 8,0 e isolamento das fracções contendo eritropoietina do eluente.

O pedido de patente internacional WO-A1-96/35718 descreve uma preparação proteica com actividade de eritropoietina que é obtida a partir de meio de cultura sem soro, utilizando um processo de purificação envolvendo cromatografia com corante, cromatografia hidrofóbica num veículo alquilado ou arilado, cromatografia em hidroxapatite, cromatografia hidrofóbica e uma cromatografia de permuta aniónica.

Inoue N. *et al.* (1994, Biol. & Pharm. Bulletin 17(2):180-184) descrevem um método para a purificação de eritropoietina humana com elevada actividade *in vivo* a partir de urina que envolve a permuta iónica, permeação em gel, cromatografia de afinidade e cromatografia de fase reversa, mas que não envolve processos de estabilização.

Deste modo, é um objectivo da invenção desenvolver um processo de purificação a jusante (DSP), em que, no geral, as isoformas acídicas de glicoproteínas, em particular, isoformas acídicas de eritropoietina, são enriquecidas.

De acordo com a invenção, as "isoformas acídicas" de eritropoietina compreendem as isoformas que apresentam um elevado nível ou conteúdo de grupos glicosilo e, de um modo preferido, sialilo.

Um nível superior de sialilação de uma glicoproteína pode ser geralmente obtido, se um número crescente de cadeias de açúcar seja terminado por grupos sialilo. Deste modo, se o conteúdo global em glicosilo de uma glicoproteína está aumentado, pode ser obtido um nível superior de sialilação, uma vez que podem estar disponíveis mais cadeias de açúcar para sialiação.

De acordo com a invenção, a eritropoietina apresenta um nível ou conteúdo elevado de grupos glicosilo e, de um modo preferido, sialilo, caso apresentem um padrão de isoforma comparável aos respectivos padrões da Eur. Ph., tal como o padrão de eritropoietina BRP da Eur. Ph., como determinado por IEF.

De acordo com a invenção, o termo "mistura proteica complexa" refere-se a uma mistura compreendendo várias proteínas diferentes e as suas isoformas, tal como, e. g., extractos celulares.

Os produtos proteicos são geralmente isolados a partir de fluidos de cultura biológicos, utilizando uma sequência de passos de purificação. Cada passo de purificação contém um ou mais passos de lavagem. As condições de lavagem, geralmente, não proporcionam uma selectividade elevada para a separação quantitativa de impurezas relacionadas (e. g., impurezas de isoformas proteicas) das moléculas do produto desejado. Os métodos de purificação com selectividade superior, tal como focagem cromatográfica, utilizam gradientes de pH utilizando anfólitos, no entanto, não são geralmente adequados para produção a grande escala devido aos seus custos elevados e aumento de escala limitado. Os passos de lavagem com sal único

proporcionam uma selectividade limitada para o enriquecimento das moléculas desejadas. Os passos de lavagem agressiva irão proporcionar um enriquecimento para as moléculas desejadas, no entanto, à conta de uma perda do rendimento global.

Verificou-se agora, de um modo surpreendente, que as isoformas de eritropoietina com um ponto isoeléctrico baixo ou ácido, *i. e.*, com um elevado conteúdo em porções sialilo, podem ser enriquecidas selectivamente através de um processo de DSP, caso seja a cromatografia de permuta aniónica combinada com, pelo menos, um passo de lavagem ácida durante o processo de purificação.

Deste modo, de acordo com a presente invenção, um modo de superar a selectividade limitada dos passos de lavagem salina é utilizar, pelo menos, um passo de lavagem ácido, proporcionando, deste modo, uma selectividade global superior do processo de purificação.

O processo de purificação, de acordo com a invenção, utiliza múltiplos passos de cromatografia aniónica com, pelo menos, um passo de lavagem ácida no processo de DSP, proporcionando uma elevada selectividade em relação à selecção de isoformas proteicas ácidas a partir de um conjunto de isoformas proteicas.

Noutra forma de realização preferida da invenção, o passo de captura de cromatografia aniónica é seguido por um passo de lavagem ácida e outros passos de cromatografia de princípio diferente, tais como HIC ou cromatografia de afinidade. Isto permite reduzir as impurezas e proteínas que são co-purificadas com o passo de captura de cromatografia aniónica. O especialista

na técnica percebe que a sequência e a natureza dos passos de cromatografia, após o passo de captura de cromatografia aniónica, dependem da glicoproteína a ser purificada e podem ser facilmente determinados pelo especialista na técnica.

Numa forma de realização ainda mais preferida da invenção, um passo de captura de cromatografia aniónica e um passo de lavagem acídica adicional, são seguidos por passos de cromatografia de princípio diferente. Num último passo, é depois aplicada outra cromatografia de permuta aniónica e um passo obrigatório de lavagem acídica para enriquecer selectivamente a preparação para glicoproteínas com elevado conteúdo em glicosilo e sialilo.

Consequentemente, o processo DSP da invenção, para a purificação de isoformas de eritropoietina humana recombinante com um elevado conteúdo em glicosilo e sialilo, a partir de fluidos de cultura celular, compreende o seguinte processo de purificação:

- a) um passo de cromatografia de permuta aniónica como um passo de captura e um passo de lavagem acídica.

De um modo preferido, o processo para a purificação de isoformas de eritropoietina humana recombinante com um elevado conteúdo em glicosilo e sialilo, a partir de fluidos de cultura celular, compreende os seguintes passos:

- a) um primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica como um passo de captura e um passo de lavagem acídica,

- b) passos de cromatografia baseados num princípio que não o da cromatografia de permuta aniónica, tais como HIC e cromatografia de afinidade.

Outro método preferido para a purificação de isoformas de eritropoietina humana recombinante com um elevado conteúdo em glicosilo e sialilo, a partir de fluidos de cultura celular, compreende os seguintes passos:

- a) um primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica como um passo de captura,
- b) passos de cromatografia baseados num princípio que não o da cromatografia de permuta aniónica, tais como purificação por HIC e cromatografia de afinidade,
- c) um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica,

em que, pelo menos, um passo de lavagem acídica é combinado com um subpasso a) e/ou subpasso c).

Num processo ainda mais preferido para a purificação de isoformas de eritropoietina humana recombinante com um elevado conteúdo em glicosilo e sialilo, a partir de fluidos de cultura celular, compreende os seguintes passos:

- a) um primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica como um passo de captura e um passo de lavagem acídica opcional,
- b) HIC,

c) cromatografia de afinidade,

d) um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica e um passo de lavagem acídica.

A cromatografia de interacção hidrofóbica do passo b) é, de um modo preferido, utilizando uma resina de cromatografia butil-sepharose. A cromatografia de afinidade do passo c) é, de um modo preferido, utilizando uma resina de cromatografia de hidroxiapatite. A ordem dos subpassos b) e c) também pode ser inversa. A eluição nos subpassos a) a d) pode ser efectuada como eluição com gradiente ou descontínua, dependendo das circunstâncias específicas.

De seguida, serão descritos em detalhe os diferentes passos do processo DSP.

*Preparação da amostra:*

Os fluidos de cultura celular foram, geralmente, de fermentações, efectuadas a um pH preferido de 7,2, proporcionando glicoproteínas altamente sialiladas, estando assim aptas para posterior enriquecimento da isoforma de pI ácido através da sequência acima especificada. Na secção dos exemplos é apresentada uma forma de realização preferida para a preparação de fluido de cultura celular.

Geralmente, os fluidos de cultura celular ou, geralmente, as misturas proteicas complexas, foram concentrados por ultra-centrifugação e submetidos a diálise contra um tampão que permite a ligação da glicoproteína à resina de permuta aniónica.



*Passo a) Cromatografia de permuta aniónica como passo de captura*

### *Resinas*

A cromatografia de permuta aniónica como passo de captura pode ser efectuada com todas as resinas e membranas de permuta aniónicas comuns, disponíveis comercialmente. As resinas de permuta aniónica podem ser utilizadas na forma de colunas prontas a utilizar. Alternativamente, as colunas podem ser preparadas no momento.

Além das limitações habituais, não existem limitações específicas, relativamente à capacidade e geometria das colunas. O especialista na técnica sabe que a quantidade de resina de permuta aniónica a ser utilizada depende do conteúdo total em proteína no fluido de cultura celular aplicado na coluna no passo de captura.

As resinas de permuta aniónica típicas que podem ser utilizadas para o objectivo da invenção compreendem grupos funcionais, tais como:

- Porções dietilaminoetilo (DEAE), as resinas incluem, e. g., DEAE-Sepahrose (Amersham Biosciences, Alemanha), suporte Macroprep DEAE (Bio-Rad, Alemanha), Fractorgel EMD DEAE (Merck, Alemanha) e outras
- Porções aminoetilo quaternário (QAE), as resinas incluem, e. g., Toyopearl QAE (Toyo Biosep, Alemanha) e outras.

- Porções de amónio quaternário (Q), as resinas incluem, e. g., Q-Sepahrose XL (Amersham Biosciences, Alemanha), Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences, Alemanha), Resource Q (Amersham Biosciences, Alemanha), Macro Prep High Q (Biorad, Alemanha), Toyopearl Super Q (Toyo Biosep, Alemanha)
- Porções dimetilaminoetilo (DMAE), as resinas incluem, e. g., Fractogel EMD DMAE (Merck AG, Alemanha)
- Porções trimetilaminoetilo (TMAE), as resinas incluem, e. g., Fractogel EMD TMAE (Merck AG, Alemanha)
- Sartobind Membraneadsorber (MA) Q100 (Sartorius, Alemanha)

#### Temperatura

Normalmente, a captura pode ser efectuada entre 2 °C e a temperatura ambiente. De um modo preferido, é efectuada a 2-8 °C.

#### Composição do tampão

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender todos os tipos de tampão normalmente utilizados para a cromatografia de permuta aniónica (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NI). Deste modo, os agentes de tamponamento compreendem Fosfato de Na, Acetato de Na, Tris/HCl, HEPES ou outros agentes de tamponamento adequados. Além disso,

os tampões podem conter entre NaCl 5 mM e 1 M, KCl ou outros sais adequados, dependendo se o tampão é utilizado para equilíbrio, lavagem ou eluição. Os tampões de equilíbrio e lavagem contêm concentrações inferiores dos sais acima mencionados, relativamente aos tampões de eluição. Os tampões também podem conter entre 1 e 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ou CaCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, os tampões podem conter entre 0,5 e 10 mM de EDTA e outros inibidores de protease, tal como Fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF). O pH dos tampões será normalmente ajustado para um pH entre 6,8 e 7,8, de um modo preferido, entre 7,0 e 7,6 e, de um modo mais preferido, entre 7,2 e 7,5 e, de um modo ainda mais preferido, para pH 7,5. Para a composição tampão dos tampões utilizados para os passos de lavagem acídica ver abaixo.

De um modo preferido, os tampões de equilíbrio e lavagem contêm entre 5-50 mM de Fosfato de Na, pH 7,5 e, de um modo mais preferido, 20 mM de Fosfato de Na, pH 7,5. Os tampões de eluição contêm entre 150-500 mM de NaCl e 5-50 mM de Fosfato de Na, pH 7,5 e, de um modo preferido, 300 mM de NaCl, 20 mM de Fosfato de Na, pH 7,5.

#### Processamento:

O equilíbrio das colunas é normalmente efectuado com 5 a 20 volumes da coluna (CV) de tampão de equilíbrio. A lavagem das colunas após a carga é normalmente efectuada com 2 a 5 CV de tampão de lavagem. A eluição é, normalmente, efectuada através de um passo de eluição com 2 a 5 CV de tampão de eluição.

O fluxo nos vários passos depende da geometria das colunas e da resina utilizada. Pode ser calculado de acordo com as instruções do fabricante ou princípios gerais. O fluxo durante a eluição é, geralmente, inferior ao fluxo durante o equilíbrio, carga e lavagem.

*Passo b) Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC)*

O material eluído do passo de captura contém, normalmente, elevadas concentrações de sal (entre 100 e 500 mM de NaCl ou KCl). Deste modo, uma continuação útil, como o passo seguinte, é uma cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) como o primeiro passo de polimento. O eluído do passo de captura é carregado após ter sido diluído, normalmente, com tampão de fosfatos e isopropanol.

A HIC pode ser efectuada com todas as resinas de HIC comuns, disponíveis comercialmente. A HIC pode ser utilizada na forma de colunas prontas a utilizar. Alternativamente, as colunas podem ser preparadas no momento.

Além das limitações habituais, não existem limitações específicas relativamente à capacidade e geometria das colunas. O especialista na técnica sabe que a quantidade de resina de HIC a ser utilizada depende do conteúdo total em proteína na preparação proteica aplicada na coluna.

## Resinas

As resinas de HIC que podem ser utilizadas para o objectivo da invenção compreendem matrizes, tais como Butil-, Fenil-, Propil- ou Octil-Sepharose (Amersham Bioscience, Alemanha), suporte de HIC Metilo ou t-butilo Macro-Prep (Biorad, Alemanha) ou Fractogel EMD com ligandos Propilo ou Fenilo (Merck AG, Alemanha). O material de cromatografia de interacção hidrofóbica preferido é Butil-sepharose.

## Temperatura

A HIC pode ser efectuada, normalmente, entre 2 e 35 °C. De um modo preferido, é efectuada a 15-25 °C. No caso da eritropoietina, a temperatura não deverá ser inferior a 18 °C, uma vez que a eritropoietina não se liga quantitativamente à resina de HIC a temperaturas inferiores.

## Composição de Tampão

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender todos os tipos de tampão normalmente utilizados para HIC (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NI). Deste modo, os agentes de tamponamento compreendem Fosfato de Na, Acetato de Na, Tris/HCl, HEPES ou outros agentes de tamponamento adequados. Além disso, os tampões podem conter entre NaCl 0,5 mM e 3 M, KCl ou outros sais adequados, dependendo se o tampão é utilizado para equilíbrio, lavagem ou eluição. Os tampões de equilíbrio e lavagem contêm concentrações

superiores dos sais acima mencionados relativamente aos tampões de eluição.

O tampão de equilíbrio e de lavagem contém até 30%, de um modo preferido, até 10% de um álcool, tal como Isopropanol. O tampão de eluição contém até 50%, de um modo preferido, até 19% de um álcool, tal como Isopropanol.

Os tampões também podem conter entre 1 e 10 mM de  $MgCl_2$  ou  $CaCl_2$ . Adicionalmente, os tampões podem conter entre 0,5 e 10 mM de EDTA e outros inibidores de protease, tal como Fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF).

O pH dos tampões de diluição, equilíbrio e lavagem será normalmente ajustado para um pH entre 6,8 e 7,8, de um modo preferido, entre 7,0 e 7,7, de um modo mais preferido, entre 7,2 e 7,6 e, de um modo ainda mais preferido, para pH 7,5. O pH do tampão de eluição será normalmente ajustado para um pH entre 6,5 e 7,5, de um modo preferido, entre 6,7 e 7,2 e, de um modo ainda mais preferido, para pH 6,9.

O tampão de diluição contém, de um modo preferido, entre NaCl 2-6 M, Fosfato de Na 5-50 mM, pH 7,5 e, de um modo mais preferido, NaCl 4 M, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5. De um modo preferido, os tampões de equilíbrio e lavagem contém entre NaCl 1-2,5 M, Fosfato de Na 5-50 mM, pH 7,5, isopropanol a 5-15% e, de um modo mais preferido, NaCl 2 M, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5, Isopropanol a 10%. O tampão de eluição contém entre NaCl 0,5-1 M, Tris/HCl 5-50 mM, pH 6,9, Isopropanol a 10-50%,  $CaCl_2$  5-10 mM e, de um modo preferido, NaCl 0,75 M, Tris/HCl 20 mM, pH 6,9, Isopropanol a 19%,  $CaCl_2$  5 mM.

#### Processamento:

O equilíbrio das colunas é normalmente efectuado com 5 a 15 volumes da coluna (CV) de tampão de equilíbrio. A lavagem das colunas após a carga é normalmente efectuada com 3 a 7 CV de tampão de lavagem. A eluição é normalmente efectuada através de um passo de eluição com 2 a 5 CV de tampão de eluição.

O fluxo nos vários passos depende da geometria das colunas e da resina utilizada. Pode ser calculado de acordo com as instruções do fabricante ou princípios gerais.

#### Condutividade:

O ajuste da condutividade da carga foi identificado como sendo crítico para que não se perca eritropoietina ou outras glicoproteínas no fluxo de saída. De acordo com a invenção, a condutividade da carga durante a HIC, deverá ser comparável com a do tampão de equilíbrio. A condutividade da carga foi, tipicamente, ajustada para 95-105 mS/cm.

#### Concentração de isopropanol e temperatura:

Em alguns casos, foi observada a formação de precipitação imediatamente após a eluição da resina de HIC, possivelmente devido ao conteúdo em Isopropanol. Mesmo quando o eluído foi diluído para 10% de Isopropanol ou menos (ver abaixo), ocorreu precipitação.

Deste modo, caso tenha ocorrido precipitação da eritropoietina após eluição da coluna de Butil-Sepharose (ver abaixo). Além disso, quando o eluído foi diluído para 6,3% de isopropanol com tampão à temperatura ambiente e armazenado de um dia para o outro, a 4 °C, a precipitação também aumentou. Foi assumido que a precipitação foi induzida através de um efeito combinado da concentração de solvente e temperatura. A precipitação conduziu a perdas substanciais (< 30% de perdas de eritropoietina).

Deste modo, de acordo com a invenção, as fracções de eluído do passo de HIC contendo eritropoietina ou a glicoproteína desejada deverão ser imediatamente diluídas com tampão frio para uma concentração inferior a 10%, de um modo preferido, inferior a 7% e, de um modo ainda mais preferido, inferior a 5% de Isopropanol. No caso da eritropoietina, a diluição para uma concentração de  $\leq 6,3\%$  de isopropanol previne a formação de precipitado.

#### *Passo c): Cromatografia de Afinidade*

A purificação por afinidade pode ser efectuada com todas as resinas comuns, disponíveis comercialmente que são apropriadas para a purificação de glicoproteínas. As resinas de afinidade também podem ser preparadas especificamente para determinadas glicoproteínas. As resinas de afinidade podem ser utilizadas na forma de colunas prontas a utilizar. Alternativamente, as colunas podem ser preparadas no momento.

Além das limitações habituais, não existem limitações específicas relativamente à capacidade e geometria das colunas.



O especialista na técnica sabe que a quantidade de resina de afinidade a ser utilizada depende do conteúdo total em proteína na preparação proteica aplicada na coluna.

### Resinas

As resinas de afinidade que podem ser utilizadas para o objectivo da invenção compreendem matrizes, tais como Macro-Prep (Bio-Rad, Alemanha), Dye-Sepharose (Biotechnol. Appl. Biochem. 29, 151-156, 1999), Resinas de afinidade péptido-ligando (Kaufmann D.B., Biotech. Bioeng., Vol. 77, N° 3, Fev. 5, 278-288, 2002), resinas de afinidade de anticorpos (Ben Ghanem *et al.*, Preparative Biochemistry 24(2): 127-142, 1994), resinas de afinidade de lectina (Amersham Biosciences, Alemanha).

### Temperatura

A cromatografia de afinidade pode, normalmente, ser efectuada entre 2 °C e a temperatura ambiente. De um modo preferido, é efectuada à temperatura ambiente.

### Composição do tampão

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender todos os tipos de tampão normalmente utilizados para as respectivas resinas de afinidade (Deutscher (1990) Protein Purification, Academic Press, NI). Deste modo, os agentes de tamponamento para, e. g., cromatografia de hidroxapatite, podem compreender Fosfato de Na, Acetato de Na, Tris/HCl, HEPES e

outros agentes de tamponamento adequados. Além disso, os tampões podem conter entre 0 e 1 M de NaCl, KCl e outros sais adequados, dependendo se o tampão é utilizado para equilíbrio, lavagem ou eluição. Os tampões de eluição irão compreender entre 0 e 200 mM de  $K_2HPO_4$  para formar um gradiente. O tampão de equilíbrio pode também conter entre 1 e 10 mM de  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ . Adicionalmente, os tampões podem conter entre 0,5 e 10 mM de EDTA e outros inibidores de protease, tal como Fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF).

O pH dos tampões será normalmente ajustado para um pH entre 6,8 e 7,8, de um modo preferido, entre 6,8 e 7,5, de um modo mais preferido, entre 6,8 e 7,2 e, de um modo ainda mais preferido, para pH 6,9. Se a cromatografia de afinidade foi precedida por HIC, o tampão de equilíbrio e o primeiro tampão de lavagem podem compreender até 250 mM de NaCl e até 9% de Isopropanol. O segundo tampão de lavagem pode não conter isopropanol, NaCl e  $CaCl_2$ .

No caso de cromatografia com hidroxiapatite, os tampões de equilíbrio e eluição contêm, de um modo preferido, entre 5-50 mM de Tris/HCl pH 6,9 e, de um modo mais preferido, 10-20 mM de Tris/HCl pH 6,9. De um modo preferido, o tampão de equilíbrio também compreende 250 mM de NaCl e 9% de Isopropanol, caso a eritropoietina seja purificada e a purificação de afinidade tenha sido precedida por uma HIC. Os tampões de eluição contêm entre 0-150 mM de  $K_2HPO_4$  e 5-50 mM de Tris/HCl pH 6,9 e, de um modo preferido, 0 a 40 mM de  $K_2HPO_4$  e 20 a 16 mM de Tris/HCl pH 6,9, para formar um gradiente.

Processamento:

O equilíbrio das colunas é, normalmente, efectuado com 5 a 20 volumes da coluna (CV) de tampão de equilíbrio. A lavagem das colunas após a carga é normalmente efectuada com 2 a 6 CV de tampão de lavagem. Isto pode ser seguido por uma segunda lavagem com 1 a 2 e, de um modo preferido, 1 a 1,2 volumes de coluna de um tampão de lavagem. A eluição é normalmente efectuada através de um passo de eluição com gradiente com 2 a 6 CV de tampão de eluição.

O fluxo nos vários passos depende da geometria das colunas e da resina utilizada. Pode ser calculado de acordo com as instruções do fabricante ou princípios gerais. O fluxo, durante a eluição, carga e lavagem é, normalmente, de 80 cm/h e, normalmente, de 113 cm/h durante o equilíbrio.

#### *Passo d) Cromatografia de permuta aniónica*

Como acima indicado, pode ser efectuado um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica no fim do processo de DSP que define a composição da isoforma do produto final. Este passo inclui um passo de lavagem acídica para remover, especificamente, as isoformas de EPO com um pI mais básico.

#### *Resinas*

Nesta fase, a cromatografia de permuta aniónica pode ser efectuada com todas as resinas e membranas de permuta aniónica comuns, disponíveis comercialmente. As resinas de permuta

aniónica podem ser utilizadas na forma de colunas prontas a utilizar. Alternativamente, as colunas podem ser preparadas no momento.

Além das limitações habituais, não existem limitações específicas, relativamente à capacidade e geometria das colunas. O especialista na técnica sabe que a quantidade de resina de permuta aniónica a ser utilizada depende do conteúdo total em proteína na preparação proteica aplicada na coluna.

De um modo geral, todas as resinas que podem ser utilizadas para o passo de captura por cromatografia de permuta aniónica (tal como as listadas no passo A), podem ser utilizadas neste segundo passo de cromatografia de permuta aniónica. Uma vez que nesta fase do processo de DSP já foi removida uma quantidade substancial de proteínas, podem ser aplicadas as resinas de permuta aniónica permitindo, especificamente, a separação de elevada resolução das proteínas.

Deste modo, as resinas como Resource Q (Amersham Biocsciences, Alemanha) são, de um modo preferido, utilizadas nesta fase do processo de DSP. Consequentemente, os fluxos serão, geralmente, inferiores aos utilizados durante o passo de captura por cromatografia de permuta aniónica (ver exemplos).

#### Temperatura

A captura pode, normalmente, ser efectuada entre 2 °C e a temperatura ambiente. De um modo preferido, é efectuada a 2-8 °C.

## Composição do tampão

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição podem compreender todos os tipos de tampão normalmente utilizados para a cromatografia de permuta aniônica (Deutscher (1990) *Protein Purification*, Academic Press, NI). Deste modo, os agentes de tamponamento compreendem Fosfato de Na, Acetato de Na, Tris/HCl, HEPES ou outros agentes de tamponamento adequados. Além disso, os tampões podem conter entre 0 e 1 M de NaCl, KCl ou outros sais adequados, dependendo se o tampão é utilizado para equilíbrio, lavagem ou eluição. Os tampões de equilíbrio e lavagem contêm concentrações inferiores dos sais acima mencionados, relativamente aos tampões de eluição. Os tampões também podem conter entre 1 e 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ou CaCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, os tampões podem conter entre 0,5 e 10 mM de EDTA e outros inibidores de protease, tal como Fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF). O pH dos tampões será normalmente ajustado para um pH entre 6,8 e 7,8, de um modo preferido, entre 7,0 e 7,6 e, de um modo mais preferido, entre 7,2 e 7,5 e, de um modo ainda mais preferido, para pH 7,5. Para a composição tampão dos tampões utilizados para os passos de lavagem ácida ver abaixo.

De um modo preferido, os tampões de equilíbrio e lavagem contêm entre 5-50 mM de Fosfato de Na, pH 7,4 e, de um modo mais preferido, 10 mM de Fosfato de Na, pH 7,4. Os tampões de eluição contêm entre 150-750 mM de NaCl e 5-50 mM de Fosfato de Na, pH 7,5 e, de um modo preferido, 500 mM de NaCl, 15 mM de Fosfato de Na, pH 7,4.

Processamento:

O equilíbrio das colunas é, normalmente, efectuado com 5 a 20 volumes da coluna (CV) de tampão de equilíbrio. A lavagem das colunas após a carga é, normalmente, efectuada com 5 a 15 CV de tampão de lavagem. A eluição é normalmente efectuada através de um passo de eluição com gradiente ou descontínua com 3 a 10 CV de tampão de eluição.

O fluxo nos vários passos depende da geometria das colunas e da resina utilizada. Pode ser calculado de acordo com as instruções do fabricante. O fluxo é, geralmente de, aproximadamente, 200 cm/h durante o equilíbrio, carga, lavagem e eluição.

*Passos de lavagem acídica na cromatografia de permuta aniónica*

De acordo com a invenção, deve ser efectuado, pelo menos, um passo de lavagem acídica durante o processo de GSP, num dos passos de cromatografia de permuta aniónica. A fase do processo de DSP onde este passo de lavagem acídica deve ser efectuado depende da glicoproteína purificada. No entanto, se for efectuado um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica durante o processo de DSP, como é preferido para a purificação de formas altamente sialiladas da eritropoietina, o passo de lavagem acídica é efectuado, de um modo preferido, no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica.

As características gerais do passo de lavagem acídica são estabelecidas abaixo.

Pode ser empregue um passo de lavagem acídica quando, geralmente, uma glicoproteína (especificamente, a eritropoietina) está ligada a uma matriz de permuta aniónica, sendo as forças de ligação predominantes as interacções iónicas entre os grupos carregados positivamente da matriz e os resíduos carregados negativamente da glicoproteína, resultando predominantemente dos resíduos de ácido siálico. Outras glicoproteínas que podem ser purificadas através desta abordagem compreendem t-PA, Factor XIII, Factor VIII, Interferão- $\beta$ , IL-2.

As interacções iónicas entre a glicoproteína, e. g., eritropoietina, e a matriz, podem ser moduladas pelo pH ou força iónica. É assumido que ao reduzir o pH, os resíduos de ácido siálico são gradualmente neutralizados por protonação, de modo a que a ligação da glicoproteína, e. g., eritropoietina, à matriz se torne mais fraca, resultando, eventualmente, na eluição da eritropoietina da coluna. O processo ácido pode, assim, ser utilizado para remover, por lavagem, as isoformas de forma glicídica com o estado de sialilação mais baixo (isoformas de glicoproteínas básicas, e. g. de eritropoietina), retendo, assim, as isoformas de forma glicídica com estado de sialilação mais elevado (isoformas de glicoproteínas acídicas, e. g. de eritropoietina). Ao empregar uma combinação de força salina e pH, é possível modular o sistema de modo a obter as isoformas desejadas ou para remover as isoformas indesejadas.

Deste modo, foi um objectivo da invenção identificar as condições de lavagem acídica (força iónica e pH) que permitem eluir, selectivamente, as isoformas de glicoproteína básica (e. g., eritropoietina) e impurezas não relacionadas, enquanto retêm quantitativamente as isoformas de glicoproteína acídica

preferidas (e. g., eritropoietina). De acordo com a invenção, o processo de DSP inclui, deste modo, pelo menos, um passo de lavagem acídica num dos passos de cromatografia de permuta aniónica.

Assim, de acordo com a invenção, os passos de lavagem acídica apenas podem ser efectuados no passo a) ou no passo d), se o processo de DSP compreender dois passos de cromatografia de permuta aniónica. Noutra forma de realização da invenção, os passos de lavagem acídica podem ser efectuados no passo a) e no passo d) se o processo de DSP compreender dois passos de cromatografia de permuta iónica.

Deste modo, a posição do passo de lavagem acídica não está limitada a qualquer uma das 2 posições do passo de permuta iónica. No entanto, para a purificação de glicoproteínas específicas, tais como a eritropoietina, pode ser preferível que apenas seja efectuado um passo de lavagem acídica no passo d) do processo de DSP. A utilização de, pelo menos, um passo de lavagem acídica em associação com a utilização repetida do mesmo princípio de cromatográfica em coluna (permuta iónica) é particularmente adequada para aumentar a selectividade da separação de moléculas muito relacionadas que diferem em pequenas diferenças de carga.

Se for efectuada uma lavagem acídica no primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica no passo a) (passo de captura), isto pode servir i) para remover principalmente impurezas não relacionadas dos fluidos ou sobrenadante de cultura celular e ii) para remover algumas isoformas de glicoproteínas básicas (e. g., eritropoietina).



O passo de lavagem acídica no passo d) (segunda cromatografia de permuta aniónica) serve para remover selectivamente, de um modo específico, as isoformas de glicoproteínas básicas (e. g., eritropoietina).

As vantagens e características do processo de lavagem acídica, de acordo com a invenção, são as seguintes:

- passos de lavagem acídica muito forte no passo a) ou passo d) irão provocar perdas de produto inaceitáveis;
- um único passo de lavagem acídica no passo d), com força intermédia, proporciona um perfil de isoformas de forma glicídica com um enriquecimento favorável de isoformas de pI ácido; e
- e um passo de lavagem acídica no passo a) irá proporcionar um conjunto de isoformas de glicoproteínas que apresenta um conteúdo reduzido em isoformas de glicoproteínas básicas e proteínas básicas não relacionadas contaminantes. Este conjunto de glicoproteínas pré-purificadas está apto para posterior purificação, para posterior remoção selectiva de isoformas básicas, utilizando uma segunda lavagem acídica. Esta combinação proporciona um forte enriquecimento de isoformas com pI ácido.

*Passo de lavagem acídica no passo de captura por permuta aniónica*

Os tampões para a lavagem acídica podem conter fosfato de Na, Acetato de Na, Citrato de Na, MES ou outros agentes de

tamponamento adequados. Os tampões preferidos para o passo de lavagem acídica no passo de captura compreendem, normalmente, entre 5 e 50 mM, de um modo preferido, entre 10 e 40 mM e, de um modo ainda mais preferido, entre 20 e 35 mM de Acetato de Na.

Os tampões também podem conter entre 1 e 10 mM de  $MgCl_2$  ou  $CaCl_2$ . Adicionalmente, os tampões podem conter entre 0,5 e 5 mM de EDTA e outros inibidores de protease, tal com Fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF).

O pH dos tampões para a lavagem acídica será, normalmente, ajustado para um pH entre 2,0 e 5,5, de um modo preferido, entre 2,5 e 4,5 e, de um modo ainda mais preferido, entre 3,0 e 4,0, dependendo do agente de tamponamento utilizado e da glicoproteína a ser purificada.

Como a força iónica do tampão também tem influência na selectividade do passo de lavagem acídica, são preferidos os tampões que contêm Acetato de Na.

De um modo preferido, os tampões de lavagem acídica contêm entre 20 e 40 mM de Acetato de Na pH 3,0-4,0 e, de um modo mais preferido, 33 mM de Acetato de Na pH 4,0.

*Passo de lavagem acídica no segundo passo de permuta aniónica*

Um passo de lavagem acídica no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica é, geralmente, efectuado com tampões com uma composição idêntica ou comparável à dos tampões

utilizados para os passos de lavagem acídica do passo de captura.

Os tampões preferidos neste segundo passo de permuta iónica contêm entre 5 e 30 mM de Acetato de Na pH 3,0-4,0 e, de um modo mais preferido, 20 mM de Acetato de Na pH 4,0.

### Exemplos

São apresentados exemplos que ilustram as formas de realização preferidas da invenção para a purificação e enriquecimento de isoformas altamente glicosiladas e sialiladas de eritropoietina. Os exemplos não devem ser interpretados como limitações da invenção.

### *Sistema de expressão para a produção de eritropoietina*

A eritropoietina foi expressa com a linha celular em suspensão de Ovários de Hamster Chinês DHFR (CHO, Puck *et al.* (1958) J. Exp. Med. 108: 945; Urlaub *et al.* (1980) PNAS USA 77: 4216-4220). A linha celular hospedeira negativa para a Di-hidrofolateredutase (DHFR) foi adaptada para crescer em meio sem proteína. O gene da eritropoietina foi subclonado num vector que transporta o gene da DHFR sob o controlo de um forte promotor do citomegalovírus. As células transfectadas foram seleccionadas e o gene da eritropoietina amplificado na presença de metotrexato. Após uma segunda ronda de clonagem celular, os clones foram seleccionados pelo bom crescimento, elevado título do produto e produção de eritropoietina com um padrão de glicosilação favorável. O padrão de glicosilação da

eritropoietina recombinante das linhas celulares foi determinado através do mapeamento dos oligossacáridos ligados em N com HPAD (Hermentin *et al.* (1996) *Glycobiology*, 6 (2): 217-30) e HPLC (Kanazawa (1999) *Biol. Pharm. Bull* 22 (4) 339-346).

O clone que foi seleccionado para estudos posteriores, cresceu (em lote) a um tempo de duplicação de, aproximadamente, 22 horas e produziu, aproximadamente, 45 mg/L de eritropoietina a uma densidade celular de  $2 \times 10^6$  células/mL com uma glicoestrutura com elevada antenaridade.

#### *Condições de cultura*

As células CHO recombinantes que produziram a eritropoietina cresceram a uma escala de 2 litros e a uma escala de 20 litros em processos a) descontínuo, b) descontínuo-repetido e c) semi-contínuo-repetido. Os fermentadores foram inoculados a uma densidade celular de, aproximadamente,  $2 \times 10^5$  células por mL. Em culturas descontínuas, as células cresceram numa fase estacionária e foram recolhidas a, aproximadamente,  $2 \times 10^6$  células por mL (concentração do produto a, aproximadamente, 45 mg/L).

Num processo descontínuo repetido, as células cresceram para, aproximadamente,  $1,5 - 2 \times 10^6$  células por mL (concentração do produto de, aproximadamente, 20 mg/mL) e a cultura foi dividida para, aproximadamente,  $2 \times 10^5$  células por mL por remoção de uma parte da cultura e substituição do volume de cultura retirado por meio fresco para iniciar o ciclo de produção subsequente. A cultura removida, contendo o produto, foi purificada.

No processo semi-contínuo-repetido, o tempo de cultivo dos ciclos individuais da cultura pode ser prolongado 1 dia por adição de um concentrado de nutrientes à cultura. A recolha foi efectuada 4 dias após o início com, aproximadamente,  $2-3 \times 10^6$  células por mL (o rendimento do produto foi de, aproximadamente, 30-40 mg/L). Outros processos (e. g., cultivo contínuo ou por perfusão) são alternativas possíveis.

O meio para a fermentação foi um meio sem proteínas, tipicamente utilizado para a cultura de células CHO, que foi suplementado com glutamina 2 mM, 0,1% de Pluronic F68 (Sigma, Alemanha) e 2 ppm de antiespuma C (Sigma, Alemanha). As temperaturas foram entre 34 °C e 37 °C, de um modo preferido, 37 °C. O pH foi entre pH 7,2 e pH 7,5, sendo preferido o pH 7,2. Durante o cultivo, a correcção do pH no meio tamponado com bicarbonato foi efectuada com injeção de CO<sub>2</sub> ou adição de NaOH. A concentração de oxigénio foi controlada a 40% de saturação do ar por injeção de ar, azoto e oxigénio na cultura.

As recolhas de cultura foram separadas da maioria das células (98%) através de centrifugação contínua com uma Biofuge 17RS (a aproximadamente 3540 x g). As restantes células e detritos celulares foram separados por filtração com uma Sartoclon II (Sartorius, Alemanha) e um Modulo de Filtração de 0,2 µm de Acetato de Celulose com 0,6 m<sup>2</sup> (N° 3021230706W, Sartorius, Alemanha).

O filtrado foi concentrado por ultrafiltração e a condutividade ajustada para menos de 5 mS, para, aproximadamente, 4 mS. A recolha foi concentrada 6 a 9 vezes e

submetida a diafiltração contra Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5. O volume resultante foi de entre 2,2 e 3,3 litros.

Após a recolha ter sido concentrada por ultrafiltração e submetida a diálise, a EPO foi purificada através da seguinte sequência de passos de cromatografia.

Certamente, também podem ser utilizados outros clones e linhas celulares para a produção de EPO, e. g., como revelado nos documentos EP-A-0148605 e EP-A-0205564. O mesmo se aplica às condições de cultura, também neste caso são descritos vários protocolos e condições na literatura de patentes bem como literatura científica.

*Passo a) Cromatografia de Permuta Aniónica como passo de captura*

Foram colocados 200 mL de resina Q Sepharose XL (Amersham Biosciences, Alemanha) numa coluna XK50 (Amersham Biosciences, Alemanha). A captura foi efectuada a 2-8 °C.

Foram utilizados os seguintes tampões:

tampão A: Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

tampão B: NaCl 300 mM, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

O processamento deste passo de cromatografia foi efectuada como se segue:

Equilíbrio da coluna com 10 CV de tampão A a 70 mL/min (220 cm/h)

Adição da amostra a 70 mL/min (220 cm/h)

Passo de lavagem com tampão A com 2 CV a 70 mL/min (220 cm/h)

Eluição com gradiente: 100% de tampão B a 25 mL/min (80 cm/h) (Pico E1 da Figura 3)

Os resultados são apresentados na Tabela 1.

*Tabela 1 Resultados do Passo de captura. Para o perfil de eluição ver a Figura 3*

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Passo 1 (Início)					
Material de Partida:	A	3,14	110,48	346,9	
Passo 2 (Carga)					
Fluxo	D	3,1	6,86	21,26	6
Lavagem	W	0,5	9,27	4,63	1,3
Passo 3 (Eluição)					
Pico	E1	0,250	1097,1	274,2	79
	E2	0,090	15,90	1,43	0,4

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Passo 4 (Lavagem)					
Pico	E3	0,180	1,64	0,29	0,1
Total eluído				301,81	87

*Passo b) Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC)*

Foram colocados 400 mL de Butil-Sepharose FF (Amersham Biosciences, Alemanha) numa coluna XK-50 (Amersham Biosciences, Alemanha). A purificação foi efectuada à temperatura ambiente.

Foram utilizados os seguintes tampões:

tampão A: NaCl 4 M, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

tampão B: CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris HCl 20 mM, pH 6,9

tampão C: NaCl 2 M, 10% de Isopropanol, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

tampão D: NaCl 0,75 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris HCl 20 mM, pH 6,9

tampão E: NaCl 0,75 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 50% de Isopropanol, Tris HCl 20 mM, pH 6,9

O processamento deste passo de cromatografia foi efectuada como se segue:



O eluído capturado passo a) foi diluído com 85% (v/v) de tampão A. Foi adicionado 10% de Isopropanol (v/v) de modo a estabelecer condições de tampão comparáveis às do tampão C. A condutividade foi entre 95 e 105 mS/cm.

Equilíbrio: 10 CV de tampão C a 25 mL/min (80 cm/h)  
 Carga: a 25 mL/min (80 cm/h).  
 Lavagem: 3 CV de tampão C a 25 mL/min  
 Eluição (gradiente faseado): 3 CV de 38% de tampão E e 62% de tampão D a 25 mL/min (80 cm/h)

O pico E1 (ver Figura 4) foi recolhido em 2,5 CV (1000 mL) de tampão B gelado e foi processado imediatamente na coluna de afinidade de hidroxiapatite.

Os resultados deste passo são apresentados na Tabela 2.

*Tabela 2 Resultados do passo de HIC. Para o perfil de eluição ver a Figura 4*

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Passo 1 (Início)					
Material de partida:	A	0,509	453,1	230,6	
Passo 2 (Carga)					

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Fluxo	D	0,510	2,49	1,26	
Lavagem	W	2,000	0,58	1,16	
Passo 3 (Eluição)					
Pico	E1	1,875	111,5	209,06	90
Passo 4 (Lavagem)					
Pico	E2	0,250	195,8	48,95	21
Eluído total				260,43	111

*Passo c): Cromatografia de Afinidade com HAP*

Foram colocados 135 mL de Macro-Prep (Ceramic), Tipo I, 40 µm (BioRad, Alemanha) numa coluna XK 26/40 (Amersham Biosciences, Alemanha). O processo foi efectuado à temperatura ambiente.

Foram utilizados os seguintes tampões:

tampão A: NaCl 0,25 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, 9% de Isopropanol, Tris 20 mM, pH 6,9

tampão B: Tris HCl 20 mM, pH 6,9

tampão D: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, pH 6,9

O processamento deste passo de cromatografia foi efectuado como se segue:

Equilíbrio: 11,5 CV de tampão A a 10 mL/min (113 cm/h)  
 Carga: a 7 mL/min (80 cm/h)  
 Lavagem passo 1: 5,75 CV de tampão A a 7 mL/min (80 cm/h)  
 Lavagem passo 2 1,15 CV de tampão B a 7 mL/min (80 cm/h)  
 Eluição tampão B, D: gradiente de 0% até 40% de tampão D em 4,6 CV a 7 mL/min.

Resultados: A eritropoietina é eluída num pico (Figura 5) que foi depois processado numa segunda coluna de permuta aniónica.

Os resultados deste passo são apresentados na Tabela 3:

*Tabela 3. Resultados do passo de HAP. Para o perfil de eluição ver a Figura 5*

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Passo 1 (Início)					
Material de partida:	A	1,79	111,5	199,6	
Passo 2 (Carga/Lavagem)					
Fluxo	D	1,80	0,85	1,53	1

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
	W1	0,75	0,91	0,68	0,5
	W2	0,15	0,51	0,08	0,05
Passo 3 (Eluição)					
Pico	E1	0,200	745,9	149,2	75
Total:				151	77

*Passo d) Cromatografia de permuta Aniónica*

Este passo foi efectuado com uma coluna pré-empacotada de 1 mL Resource Q (1 mL Source 15Q, Amersham Biosciences, Alemanha). A corrida na coluna foi efectuada à temperatura ambiente. Alternativamente, foi utilizada uma membrana de permuta iónica (Sartobind Membraneadsorber (MA) Q100 (Sartorius, Alemanha)).

Foram utilizados os seguintes tampões:

tampão A: Fosfato de Na 10 mM, pH 7,4

tampão B: NaCl 1 M, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,4

tampão C: Acetato de Na 20 mM, pH 4,0

O processamento deste passo de cromatografia foi efectuado como se segue:

Equilíbrio: 10 CV de tampão A a 1 mL/min  
 Carga: a 1 mL/min (186 cm/h)  
 Lavagem: 10 CV de tampão A a 1 mL/min  
 Lavagem acídica: 2 CV de tampão C a 1 mL/min  
 Lavagem: 10 CV de tampão A a 1 mL/min  
 Eluição faseada: 1 CV de 50% de tampão B a 1 mL/min

Os resultados são apresentados na Tabela 4:

*Tabela 4. Os resultados do segundo passo de permuta aniônica. Para o perfil de eluição ver a Figura 6*

	Nome da amostra	Volume [L]	EPO [mg/L]	EPO [mg]	Rendimento %
Passo 1 (Início)					
Material de partida:	Conjunto 1	0,0067	854,07	5,72	
Passo 2 (Carga)					
Fluxo	D	0,007	0,48	0,003	0
Passo 3 (lavagem acídica)					
Pico	AW	0,0035	191,24	0,67	11
Passo 4 (Eluição)					
Pico	E	0,0055	670,6	3,68	64
Total eluído:					
				4,35	74

O pico da Figura 6 foi depois analisado por gel de eletroforese SDS-PAGE e subsequente coloração com Coomassie. Como pode ser observado na Figura 6, a eritropoietina foi eluída num único passo com elevada pureza, comparável à do padrão BRP da Ph. Eur.

Subsequentemente, o Pico E1 da Figura 6 foi analisado relativamente ao seu conteúdo em isoformas por IEF (electroforese em gel de focagem isoeléctrica foi efectuado num gel precast (Amersham Biosciences) utilizando uma sistema Phast (Amersham Biosciences) e aplicando um gradiente de pH de pH 3,5 a 6,5) (Figura 8). As isoformas de EPO foram visualizadas por transferência de Western ou coloração com Prata. A lavagem acídica conduziu a uma redução de isoformas com pI básico, que proporcionou um perfil de isoformas, muito semelhante ao do padrão BRP da Ph. Eur. (Figura 8).

Isto foi também confirmado por análise por HPLC DEAD dos açúcares oligo nativos (Figura 9) e neutros (Figure 10) marcados com AB (2-aminobenzamida), que foram libertados a partir da eritropoietina purificada (Kanazawa (1999) Biol. Pharm. Bull 22 (4) 339-346).

Noutra forma de realização da invenção, o processo de DSP, como exemplificado para a purificação da eritropoietina, pode compreender um passo de lavagem acídica no primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica. Isto é exemplificado de seguida.

*Passo a) Cromatografia de permuta aniónica como passo de captura com um passo de lavagem acídica*

Foram preparados extractos de cultura como acima indicado. Foi aplicado o mesmo volume à coluna de permuta aniónica.

Foram colocados 170 mL de resina Q Sepharose XL (Amersham Biosciences, Alemanha) numa coluna XK50 (Amersham Biosciences, Alemanha). A captura foi efectuada à temperatura ambiente.

Foram utilizados os seguintes tampões:

Tampão A1: Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

Tampão A2: Acetato de Na 33 mM, pH 4,0

Tampão B: NaCl 300 mM, Fosfato de Na 20 mM, pH 7,5

O processamento deste passo de cromatografia foi efectuado como se segue:

Equilíbrio da coluna com 5 CV de tampão A1 a 25 mL/min (80 cm/h).

Carga da amostra a 25 mL/min (80 cm/h).

Passo de lavagem com tampão A1, com 2 CV, a 25 mL/min (80 cm/h)

Passo de lavagem com tampão A2, com 3 CV, a 25 mL/min (80 cm/h)

Eluição com gradiente faseado com tampão B a 25 mL/min (80 cm/h)

A eluição faseada resultou em 2 picos (E2 e E3). Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados do passo de captura com um passo de lavagem acídica.

Corrida	Volume [mL]	Concentração de eritropoietina [mg/L]	Eritropoietina total [mg]	Rendimento %
1.21				
Carga	760	81,8	62,2	100
Fluxo	800	1	0,8	1,3
Lavagem acídica: Pico E1	100	55,6	5,6	9
Eluição, Pico E2	59	648,9	38,3	61,6
Eluição, pico E3	35	40,5	1,4	2,2
Total eluído				74,1

Como pode ser observado no Figura 11, o passo de lavagem acídica com acetato de Na 33 mM, pH 4,0, conduz à perda de algum material (E1). No entanto, permite discriminar as isoformas de eritropoietina (E2 e E3), que se assemelham ao padrão BRP (Std) da Ph. Eur., e as isoformas de eritropoietina mais básicas (E1).



Isto proporciona um ajuste do perfil das isoformas de eritropoietina ao do padrão BRP, desde o passo de captura.

Foi também testado quais são as condições de tampão salino óptimas, caso seja efectuado um passo de lavagem no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica.

*Optimização do passo de lavagem acídica no segundo passo de permuta aniónica*

Para otimizar as condições do tampão do passo de lavagem acídica no Segundo passo de cromatografia em coluna de permuta aniónica, foram preparados tampões contendo 5, 10 ou 20 mM de Acetato de Na, pH 4,0. O passo de purificação foi efectuado como acima descrito para o passo d). Depois disso, os eluídos foram analisados por IEF relativamente ao seu conteúdo em isoformas de eritropoietina (Figura 12).

As várias concentrações de 5 mM, 10 mM e 20 mM de Acetato de Na, pH 4,0, proporcionaram quantidades crescentes de material na lavagem acídica (1%, 6,3% e 10%) e um desvio em direcção a um perfil mais acídico de isoformas da eritropoietina eluída. Como evidenciado na Figura 12, com uma lavagem com Acetato de Na 20 mM pH 4,0, o perfil de isoformas de eritropoietina é muito semelhante ao do padrão BRP da Ph. Eur. Deste modo, esta concentração é preferida para a purificação de formas de EPO altamente sialiladas.

A eritropoietina que foi exposta a um passo de lavagem acídica na captura, foi processada através de um protocolo de purificação com 4 passos, com ou sem um segundo passo de lavagem

acídica no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica. As isoformas isoladas através do segundo passo de cromatografia de permuta aniónica foram analisadas por IEF, seguida por Transferência de Western (ver Figura 13). A sequência de purificação foi, caso contrário, idêntica ao processo acima descrito.

A figura 13 mostra que as isoformas de eritropoietina purificadas sem um passo de lavagem acídica adicional no segundo passo de permuta aniónica contêm a maioria das bandas das isoformas que o padrão de eritropoietina BRP da Ph. Eur. (Figura 13A). Pode também ser demonstrado que um Segundo passo de lavagem acídica conduz a um enriquecimento selectivo de mais isoformas acídicas, representadas pelas isoformas 3-4 mais acídicas (Figura 13B). A segunda lavagem acídica remove a maioria das restantes isoformas de eritropoietina básicas.

Deste modo, foi demonstrado que um processo de lavagem acídica de 2 passos constitui um modo através do qual pode ser alcançado um enriquecimento relativamente forte de isoformas acídicas.

Assim, a presente invenção permite a purificação de uma glicoproteína com uma composição em isoformas específica, rica em isoformas de pI acídico. Isto é alcançado através da combinação de condições de cultura celular favoráveis e novas técnicas de purificação. Com base num clone celular que foi seleccionado para a produção de um produto altamente sialilado, i) foram identificadas as condições de cultura óptimas para a produção das isoformas altamente sialiladas como estando na gama de pH 7,2 a pH 7,5 e ii) pelo menos, um passo de lavagem acídica num dos passos de permuta aniónica durante a purificação

demonstrou proporcionar determinações para o posterior enriquecimento selectivo das isoformas mais acídicas.

#### Legendas das Figuras

##### Figura 1:

Distribuição das isoformas do padrão BRP da Ph. Eur. e da eritropoietina, que foi produzida pelas culturas de CHO a pH 6,9, pH 7,2 e pH 7,5. A eritropoietina foi purificada de acordo com um protocolo de purificação de 2 passos (captura com Q-Sepharose XL e eluição faseada com sal seguida por um passo de HIC com butil-sepharose FF, como estabelecido nos exemplos) e analisada por electroforese capilar (CE). Os números nos picos inferiores indicam as isoformas de pI básico, os números nos picos superiores indicam as isoformas de pI ácido. O pH elevado da cultura proporciona um nível elevado de isoformas de eritropoietina acídicas. Os números nos picos correspondem à anotação Ph. Eur.

##### Figura 2:

As culturas de CHO, que produzem eritropoietina, cresceram a pH 6,9, pH 7,2 e pH 7,5. As células cresceram melhor a pH mais baixo (pH 6,9) e apresentaram a melhor produtividade a pH mais elevado (pH 7,5). O perfil da forma glicídica foi melhor a pH mais elevado (pH 7,2 e pH 7,5, ver Figura 1). As condições de cultura de pH 7,2 proporcionaram bom crescimento celular, elevada sialilação do produto e bom rendimento de produto final.

Figura 3:

O perfil de eluição do passo a) da sequência de purificação. O pico E1 foi recolhido, o pico E2 foi registado durante a limpeza.

Figura 4:

O perfil de eluição do passo b) da sequência de purificação. O pico E1 foi recolhido, o pico E2 foi registado durante a limpeza.

Figura 5:

O perfil de eluição do passo c) da sequência de purificação. O pico da eluição foi recolhido como indicado pela seta.

Figura 6:

O perfil de eluição do passo d) da sequência de purificação. O pico E1 foi recolhido como indicado pela seta.

Figura 7:

A análise por gel SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie mostra pureza comparável entre a eritropoietina após o passo d)

(linha 1) e o padrão BRP da Ph. Eur. (linha 2). A fila 3 é um marcador.

Figura 8:

A focagem isoelétrica do padrão BRP da Ph. Eur. (linha 1), eritropoietina purificada eluída do passo d) (linha 2) e carga (linha 3) deste passo de cromatografia. A detecção foi alcançada por Transferência de Western (painel esquerdo) e coloração com Prata (painel direito). As isoformas de pI mais básico na carga (linha 3) foram removidas, significativamente, pela lavagem acídica. Isto proporcionou um produto (linha 2) com um perfil de isoformas muito semelhante ao do padrão BRP da Ph. Eur. BRP (linha 1).

Figura 9:

Comparação por imagem ao espelho dos açúcares oligo da eritropoietina nativa libertados da eritropoietina purificada após o passo d) e os libertados do padrão BRP da Ph. Eur. Os oligo foram marcados com AB e separados por HPLC numa coluna DEAE. Uma lavagem acídica no segundo passo de cromatografia de permuta aniônica proporcionou uma distribuição dos oligossacáridos da amostra que foi comparada com a do padrão BRP da Ph. Eur. (STD).

Figura 10:

Comparação por imagem ao espelho dos açúcares oligo da eritropoietina neutra libertados da eritropoietina purificada após o passo d) e os libertados do padrão BRP da Ph. Eur. Os oligo foram marcados com AB e separados por HPLC numa coluna DEAE. Uma lavagem acídica no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica proporcionou uma distribuição dos oligossacáridos neutros que apresentava muitas semelhanças com a do padrão BRP da Ph. Eur. (STD).

Figura 11:

Composição das isoformas de eritropoietina na fracção da lavagem acídica (E1) e dos picos de eluição (E2 e E3) no passo de captura foram analisados por IEF. As isoformas proteicas foram visualizadas por Transferência de Western. A lavagem acídica com acetato de Na 33 mM, pH 4,0, permite discriminar as isoformas de eritropoietina, que se assemelham com o padrão BRP da Ph. Eur. (Std.) e isoformas mais básicas. Isto proporciona um ajuste do perfil das isoformas de eritropoietina, ao do padrão BRP, desde o passo de captura.

Figura 12:

A análise da carga da segunda coluna de permuta iónica (linha 4) e das eluições após as lavagens acídicas com Acetato de Na 20 mM, pH 4,0 (linha 3), 5 mM (linha 2) e 10 mM (linha 1) no que se refere à distribuição de isoformas por IEF. As isoformas proteicas foram visualizadas por Transferência de

Western (painel esquerdo) e coloração com Prata (painel direito). Após uma lavagem acídica no segundo passo de permuta aniónica, os eluídos continham significativamente menos isoformas de pI básico em comparação com a carga (linha 4). O tampão com Acetato de Na 20 mM, pH 4,0, proporcionou a redução mais acentuada. O perfil de isoformas é comparável com o do padrão BRP (STD).

Figura 13:

A análise das isoformas de eritropoietina no eluído por IEF. As proteínas foram visualizadas por Transferência de Western. A) Purificação sem um passo de lavagem acídica, após a segunda coluna de permuta iónica. B) Purificação com um passo de lavagem acídica adicional, após a segunda coluna de permuta iónica. O eluído foi recolhido em 5 fracções (F1 a F5). Foi efectuada uma lavagem acídica em A) e B) no primeiro passo de captura por cromatografia de permuta aniónica.

O produto sem uma segunda lavagem acídica (A) contém a maioria das isoformas do padrão Ph. Eur. (Padrão). O produto com uma segunda lavagem acídica (B) é enriquecido selectivamente nas isoformas com pI mais acídico, representado pelas 3-4 isoformas mais acídicas.

Lisboa, 5 de Novembro de 2008

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de purificação de isoformas de eritropoietina acídicas a partir de uma mistura proteica complexa, caracterizado pelo método compreender dois passos de cromatografia de permuta aniónica que são separadas por passos de cromatografia baseados num princípio que não a cromatografia de permuta aniónica e, pelo menos, um passo de lavagem acídica num dos passos de permuta aniónica.
  
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo método compreender os seguintes passos:
  - a) um primeiro passo de cromatografia de permuta aniónica, como um passo de captura e um passo de lavagem acídica opcional,
  
  - b) cromatografia de interacção hidrofóbica,
  
  - c) cromatografia de afinidade,
  
  - d) um segundo passo de cromatografia de permuta aniónica e um passo de lavagem acídica.
  
3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a eluição nos subpassos a) a d) ser efectuado por eluição com gradiente ou descontínua.
  
4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado por os subpassos a) e d) serem efectuados com resinas ou membranas de permuta aniónica que contêm grupos



Dietilaminoetilo (DEAE), grupos de aminoetilo quaternário (QAE), grupos de amónio quaternário (Q), grupos Dimetilaminoetilo (DMAE) e/ou grupos Trimetilaminoetilo (TMAE), como grupos funcionais.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o subpasso a) ser efectuado com uma resina Q-Sepharose XL disponível comercialmente.
6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o subpasso d) ser efectuado com uma resina Resource Q disponível comercialmente.
7. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado por o subpasso b) ser efectuado com resinas que contêm grupos Butilo, Fenilo, Propilo e/ou Octilo, como grupos funcionais.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o subpasso b) ser efectuado com resina Butil-Sepharose FF disponível comercialmente.
9. Método de acordo com as reivindicações 2 ou 3, caracterizado por o subpasso c) ser efectuado com resinas de afinidade, tais como hidroxiapatite, Ni-NTA, Talon, resinas de cromatografia com corante, tais como Dye- ou Blue-Sepharose, resinas de afinidade de anticorpos, resinas de afinidade de lectina e/ou resinas de afinidade ligando-péptido.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por o subpasso c) ser efectuado com resina de hidroxiapatite Macro-Prep Typ I disponível comercialmente.
11. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado por o tampão para o passo de lavagem acídica apresentar um pH entre 2,0 e 5,0, de um modo preferido, entre 2,5 e 4,5 e, de um modo mais preferido, entre 3,0 e 4,0.
12. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 11, caracterizado por o tampão para o passo de lavagem acídica conter Acetato de Na, Citrato de Na, HEPES, PIPES, MES e/ou MOPS, como agentes de tamponamento.
13. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12, caracterizado por o tampão para o passo de lavagem acídica, no passo de captura, conter entre 5 e 50 mM de Acetato de Na com um pH entre 3,0 e 4,0, de um modo preferido, entre 10 e 40 mM de Acetato de Na com um pH entre 3,0 e 4,0, de um modo ainda mais preferido, entre 15 e 35 mM de Acetato de Na com um pH entre 3,0 e 4,0 e, de um modo muito preferido, Acetato de Na 33 mM, pH 4,0.
14. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 12, caracterizado por o tampão para o passo de lavagem acídica, no segundo passo de cromatografia de permuta aniónica, conter entre 5 e 50 mM de Acetato de Na com um pH entre 3,0 e 4,0, de um modo preferido, entre 10 e 40 mM de Acetato de Na com um pH entre 3,0 e 4,0, de um modo ainda mais preferido, entre 15 e 30 mM de Acetato de Na com um

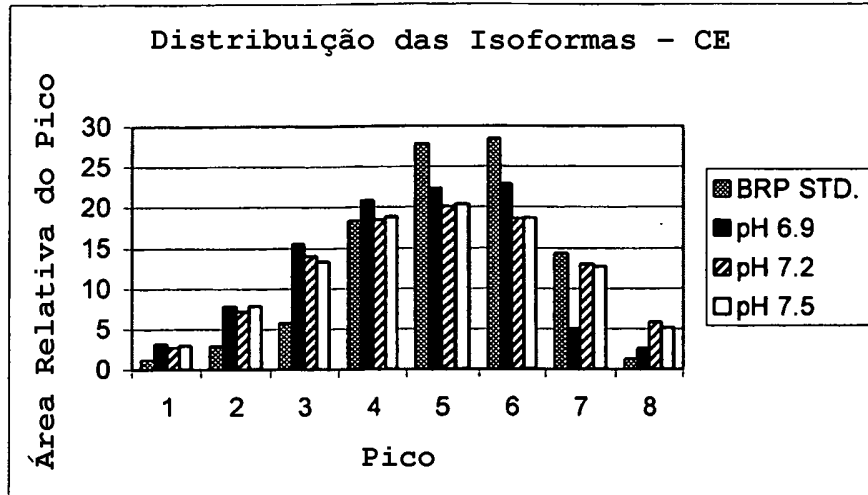
pH entre 3,0 e 4,0 e, de um modo muito preferido, Acetato de Na 20 mM, pH 4,0.

15. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, caracterizado por a eritropoietina ser eritropoietina humana recombinante.
16. Isoformas de eritropoietina acídicas, purificadas por um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14.
17. Isoformas de eritropoietina acídicas, de acordo com a reivindicação 16, em que a eritropoietina é a eritropoietina humana recombinante.

Lisboa, 5 de Novembro de 2008

Figura 1

A)



B)

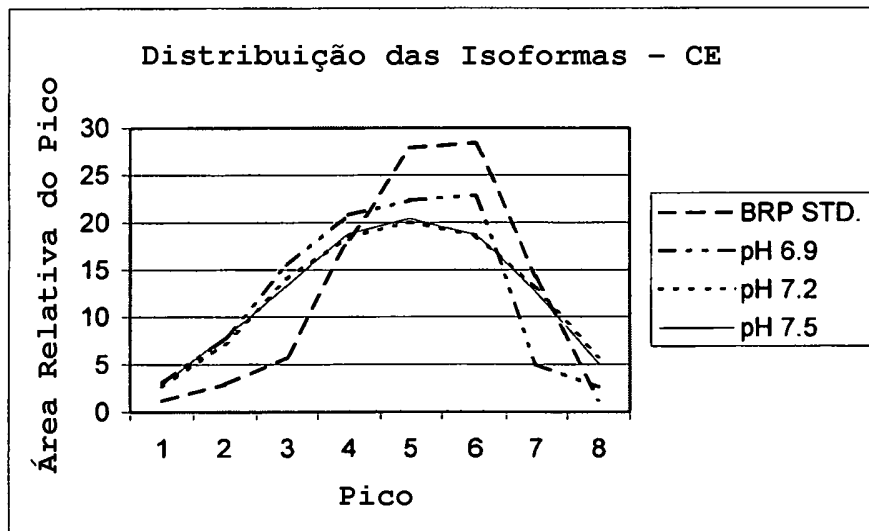
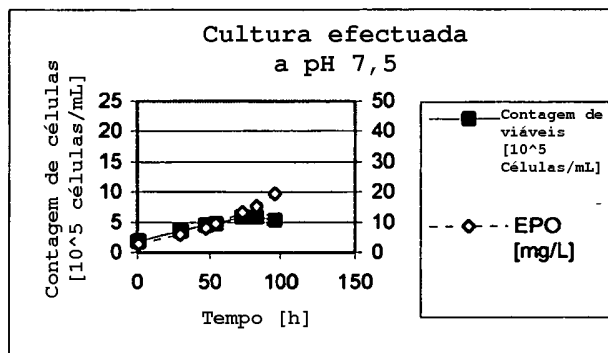
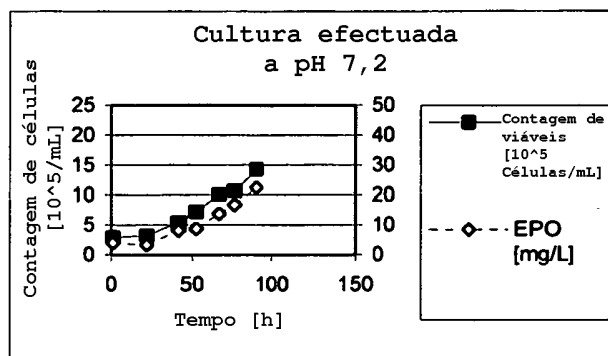
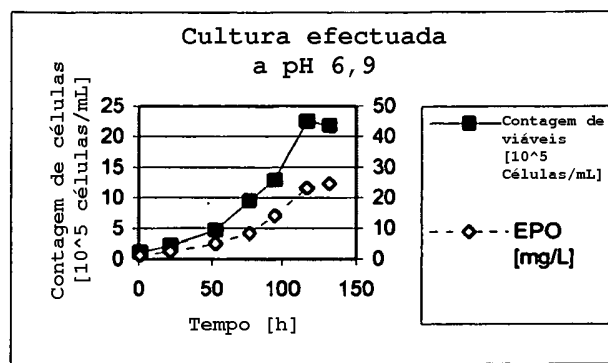


Figura 2



pH da cultura	Taxa de Crescimento $[h^{-1}]$	Produtividade Celular $[\mu g \cdot c^{-1} \cdot h^{-1}]$
6,9	0,026	2,72E-07
7,2	0,018	2,67E-07
7,5	0,014	4,03E-07

Figura 3

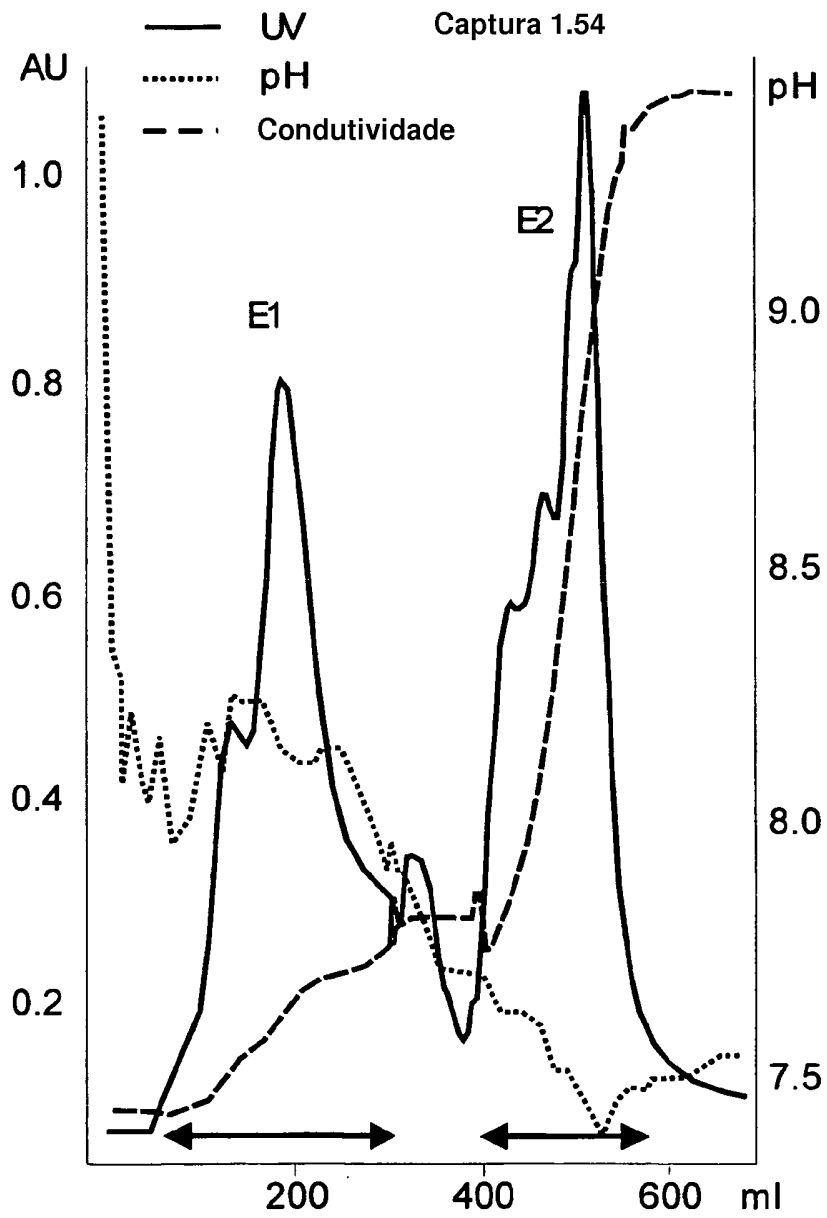


Figura 4

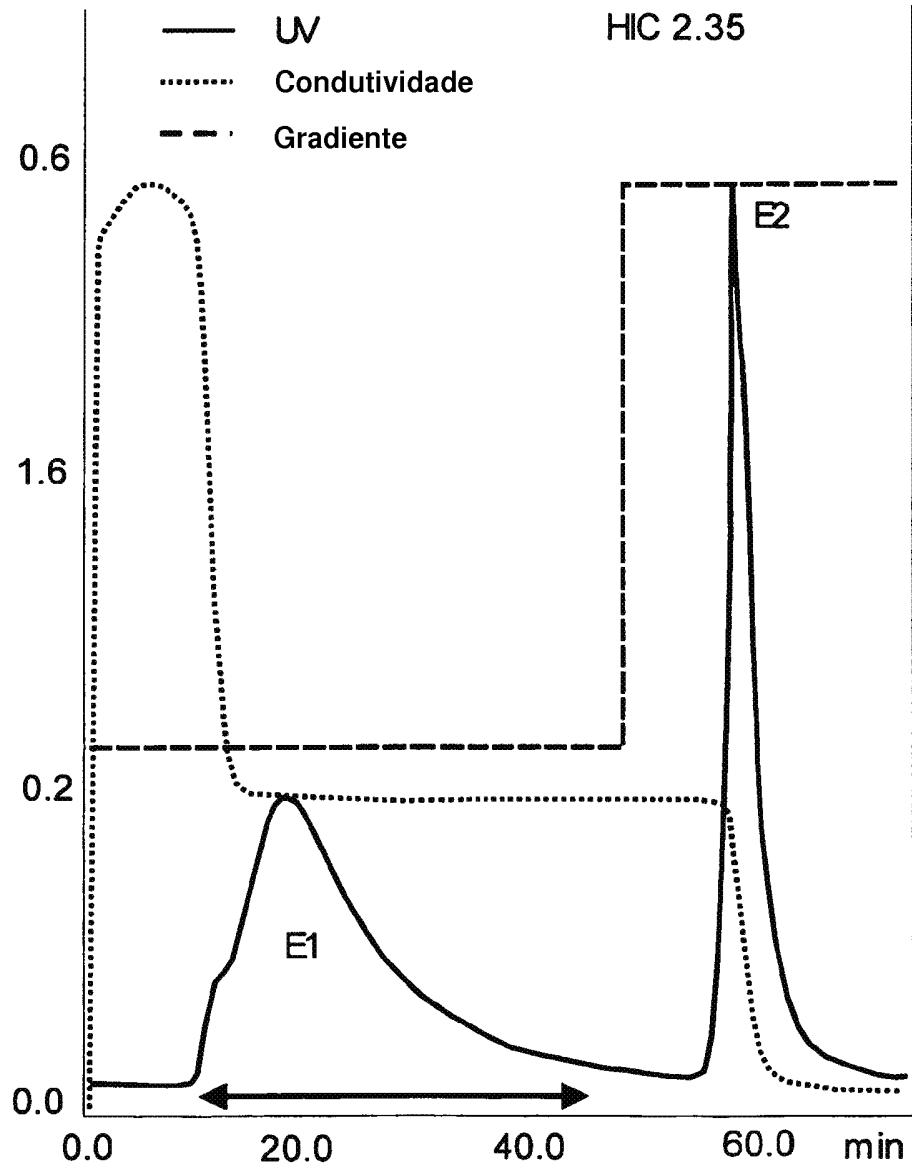


Figura 5

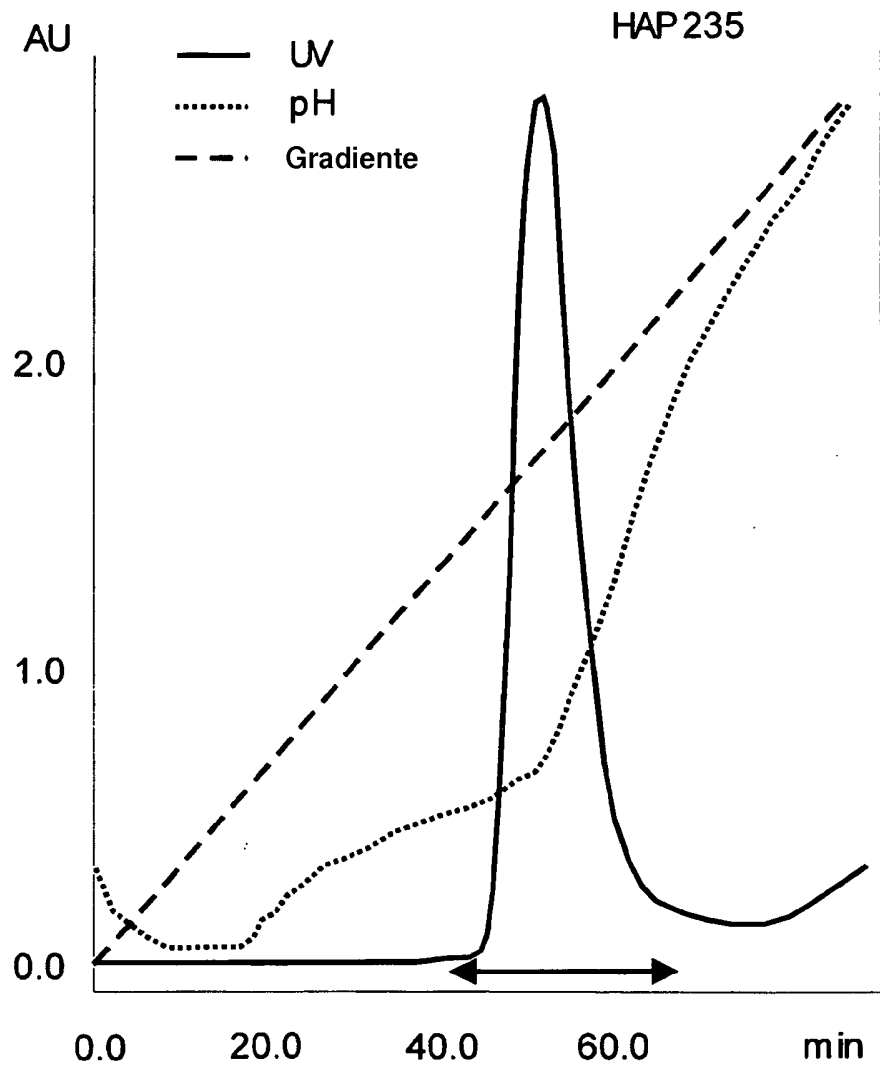




Figura 6

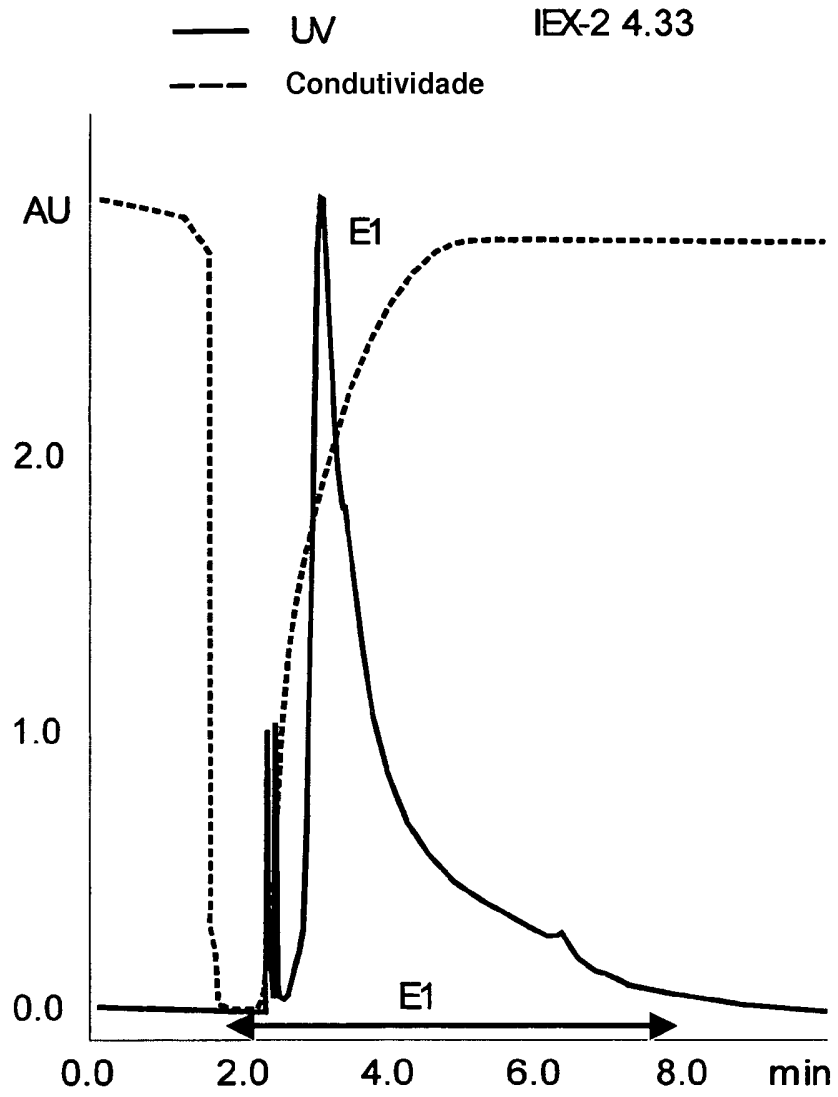


Figura 7

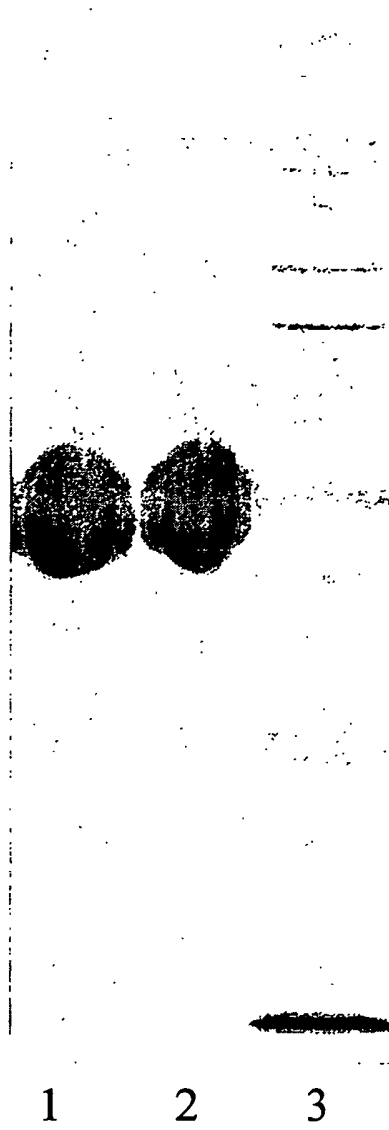


Figura 8

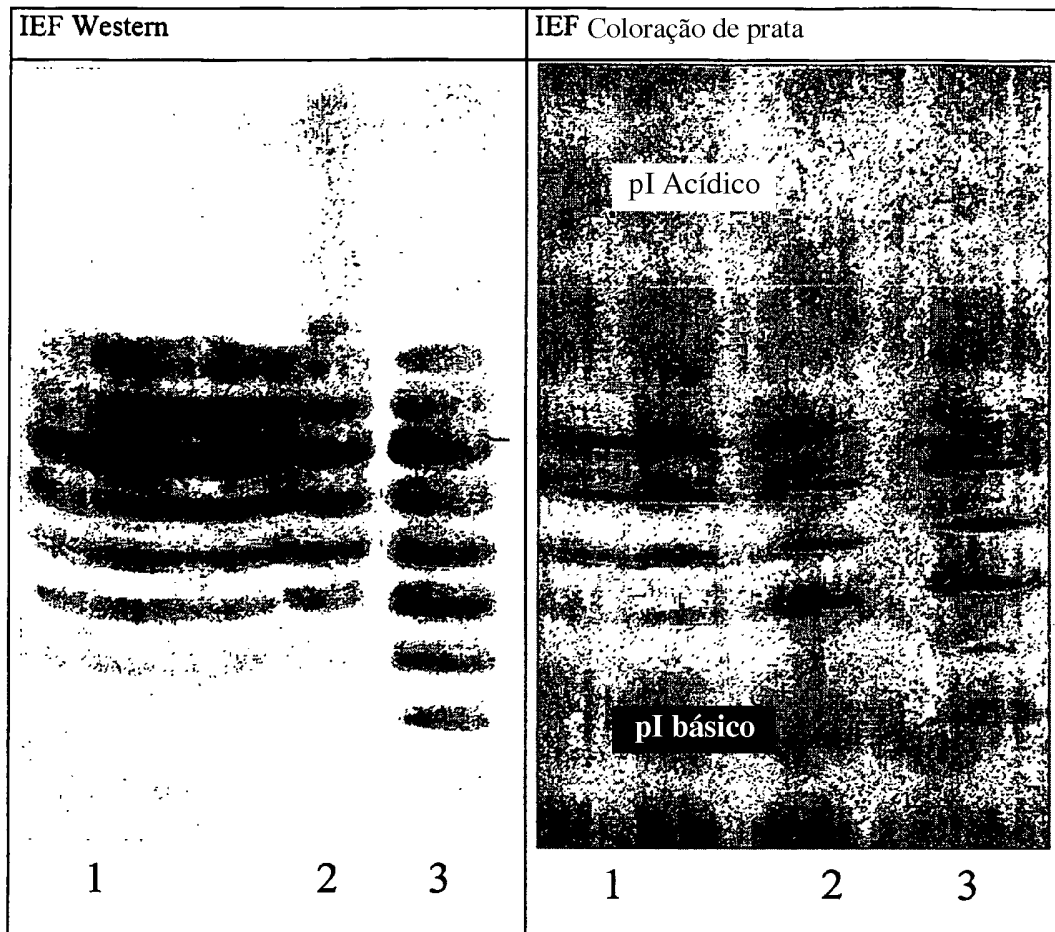


Figura 9

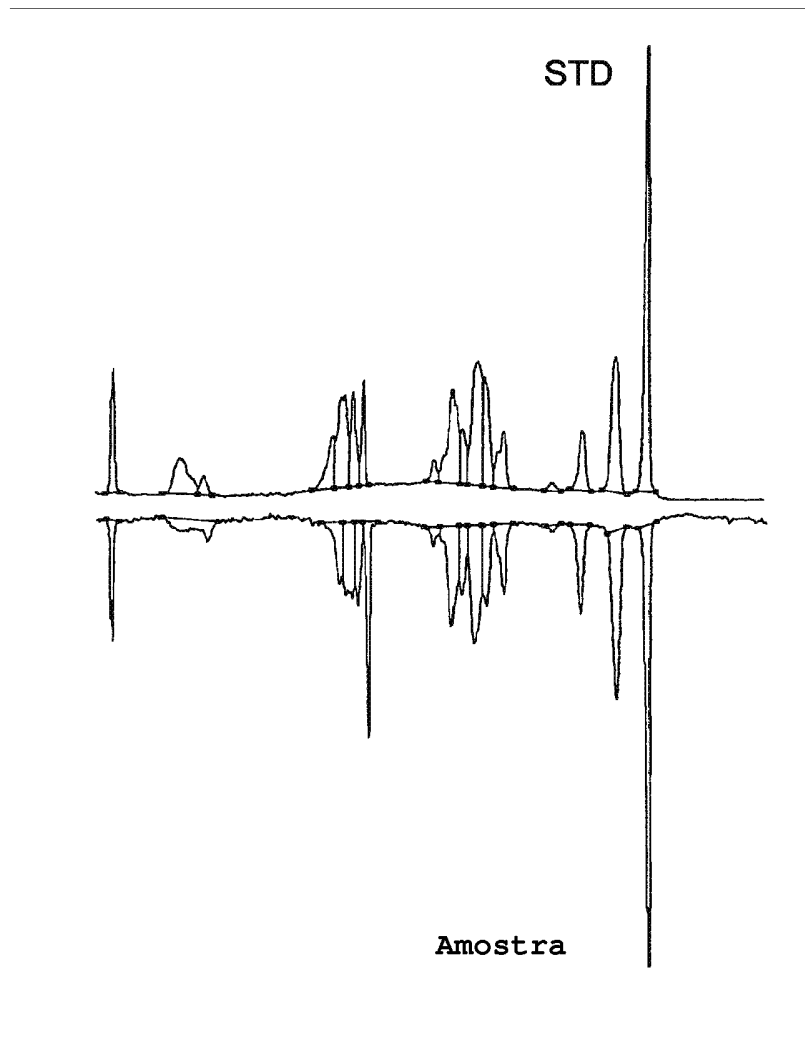


Figura 10

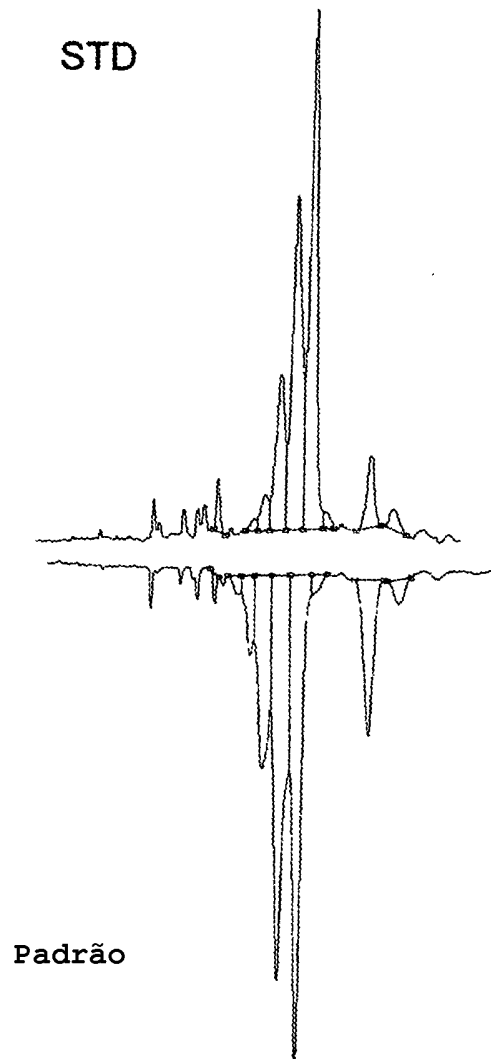


Figura 11



E1 E2 E3 Std.

Figura 12

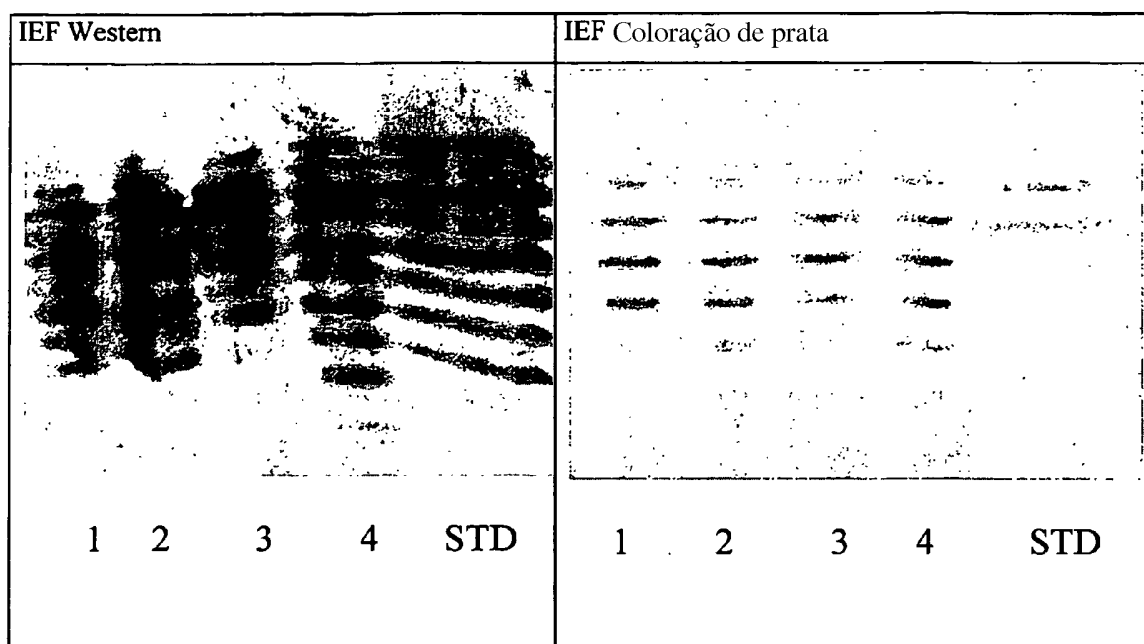
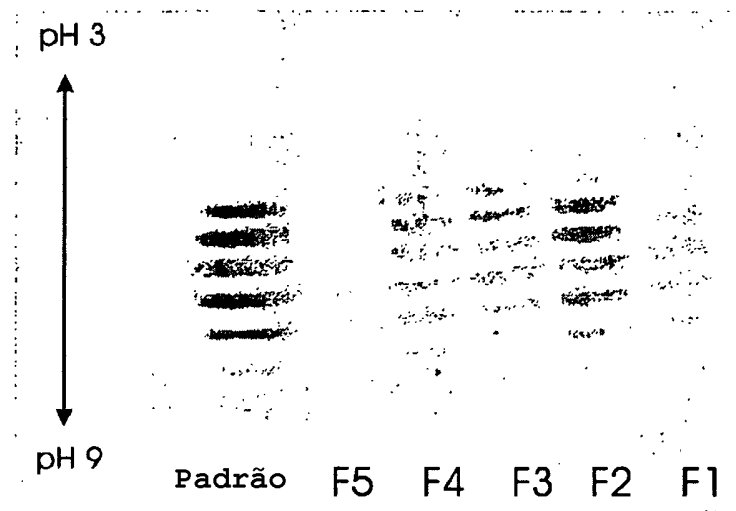
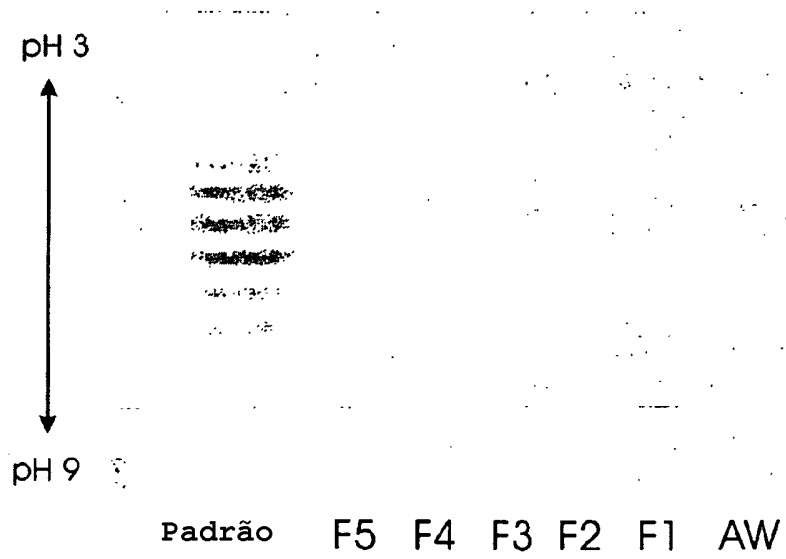


Figura 13

A)



B)





## RESUMO

### "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ERITROPOIETINA"

A presente invenção refere-se à produção de glicoproteínas recombinantes, em particular, eritropoietina humana recombinante, em células de mamífero, bem como métodos de purificação das glicoproteínas produzidas a partir da cultura celular.