



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 118**

51 Int. Cl.:
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08786090 .4**
96 Fecha de presentación : **11.07.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2167526**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **Purificación de factor VIII usando una resina de modo mixto o multimodal.**

30 Prioridad: **11.07.2007 EP 07112287**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2011

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Bang, Susanne;**
Thim, Lars y
Karlsson, Johan

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 364 118 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación de factor viii usando una resina de modo mixto o multimodal

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con un método para purificar una proteína recombinante usando una resina multimodal o de modo mixto que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente. La proteína de interés es un factor de coagulación, particularmente relevante para la purificación de composiciones de Factor VIII recombinante.

Antecedentes de la invención

10 El Factor VIII humano, también conocido como factor antihemofilia o FVIII:C es una proteína plasmática humana que consiste en dos polipéptidos con peso molecular de cadena ligera de 80,000 daltons y un peso molecular de cadena pesada variable de 90,000 a 220,000. Se considera como uno de los cofactores clave en la vía de coagulación necesarios para la conversión de Factor X a su forma activa Factor Xa. El Factor VIII circula en plasma como un complejo no covalente con factor de von Willebrand (también conocido como FVIII:RP). La hemofilia, un trastorno hemorrágico es causado debido a niveles anormales de Factor VIII. Niveles de Factor VIII debajo de 20% de lo normal pueden dar como resultado condición hemofílica en humanos. Una caída en los niveles de menos de 1% de Factor VIII lleva a severos trastornos de sangrado, con sangrados articulares espontáneos siendo el síntoma más común.

La estructura y bioquímica de Factor VIII recombinante han sido descritas previamente.

20 Tradicionalmente, el aislamiento y purificación de Factor VIII ha sido a partir de una fuente derivada de plasma (crioprecipitado). Los procedimientos de purificación a partir de fuentes derivadas de plasma incluyen aquellos que exploran el uso de purificación por inmunoafinidad usando anticuerpos policlonales y monoclonales para la purificación de FVIII. Sin embargo, puede haber casos en los que el efuente de Factor VIII contenga cierto anticuerpo residual debido a lixiviado de la matriz de soporte, lo cual puede dar como resultado antigenicidad durante uso final, es decir, cuando se introduzca en un sistema humano o animal. Procedimientos de purificación que exploran el uso de cromatografía de intercambio iónico en, por ejemplo, esferas de agarosa también han sido usados para la purificación de Factor VIII a partir de plasma. Estos métodos, sin embargo, comúnmente sufren de ciertos niveles de contaminación del FVIII:C resultante.

25 Sin embargo, la purificación de Factor VIII a partir de fuentes recombinantes genéticamente manipuladas ha obtenido importancia en la última década. La recuperación de proteínas y la concentración de producto final son de principal importancia en la separación de proteínas recombinantes. Los contaminantes en proteínas producidas recombinantemente pueden incluir proteínas secretadas en el medio de cultivo, componentes del medio, lisados celulares, proteínas no deseadas producidas por las células y los ácidos nucleicos.

35 Cuando se purifica una proteína recombinante, los materiales de origen acuoso en los cuales los polipéptidos de interés se encuentran se observan comúnmente como contaminados con uno o más virus. Técnicas para inactivar virus en mezclas de polipéptidos se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, métodos químicos, soluciones que usan solventes/detergentes, métodos de irradiación o métodos térmicos, pero los intentos por combinar estas técnicas con procesos conocidos de purificación de polipéptidos han producido métodos con una multiplicidad de etapas inadecuadas para producción a gran volumen. También es importante tener precaución ya que los agentes de inactivación viral usados no desnaturalizan la proteína o son difíciles de separar de la proteína de interés. Sin embargo, estos agentes han sido ya sea desnaturalizantes o difíciles de separar del polipéptido de interés, y han requerido de tratamiento especial o etapas de separación. Otros métodos convencionales para tratar preparaciones que contienen polipéptidos para contaminación viral potencial, tales como calor o irradiación, han resultado ya sea en desnaturalización significativa del polipéptido de interés y/o inactivación insuficiente de los virus. Muchos de los productos de Factor VIII recombinante disponibles comercialmente (Advate®, Helixate®, Kogenate FS®, ReFacto®) se elaboran usando cromatografía de inmunoafinidad incluyendo un detergente para la purificación e inactivación viral.

45 En la purificación de proteínas terapéuticas producidas por medio de una técnica de ADN recombinante, se conoce bien que problemas considerables se encuentran cuando se intenta reducir el contenido de ADN y Proteína de Célula Huésped (HCP) hasta el nivel muy bajo deseado.

Nordfang et al. (Thrombosis and Haemostasis 58(4), 1043-1048 (1987) describe una separación usando una resina de anticuerpos y un tampón que contiene 50% de etilenglicol y alto contenido de sal.

La purificación de una proteína recombinante expresada en sistemas celulares de mamíferos se lleva a cabo típicamente en varias etapas. Las diferentes etapas normalmente se separan en captura, intermedia y pulido. El objetivo de la etapa de captura es doble; a) obtener la proteína objetivo en una forma de solución estable y b) reducir el volumen (es decir, obtener una solución concentrada con respecto al contenido de proteína en comparación con la solución cargada sobre la columna ("la carga"). La última etapa (reducción de volumen) es crítica para facilitar las etapas de purificación subsecuentes. La etapa de captura se logra comúnmente usando cromatografía con una resina de intercambio iónico. La desventaja de usar una resina de intercambio iónico es que la conductividad y/o pH de la carga tiene que ser ajustado. Cuando se ajusta la conductividad, en la mayoría de los casos reducida, esto se lleva a cabo por la adición de agua lo cual incrementa el volumen del material de partida, haciéndolo impráctico para etapas subsecuentes y en general problemático para propósitos de producción. Más aún, el ajuste del pH comúnmente da como resultado la formación de agregados que podrían interferir con el rendimiento de las etapas de purificación.

Después de la etapa de captura, puede seguir una purificación intermedia, la cual elimine la mayoría de las impurezas significativas incluyendo ADN, virus y endotoxinas. Estas impurezas también pueden ser removidas/reducidas en captura. La etapa de pulido se refiere a una etapa de purificación final, en la que contaminantes residuales e impurezas son eliminados y el rendimiento es un producto biológico activo. Los contaminantes removidos durante la etapa de pulido comúnmente son conformadores de la molécula objetivo o productos de derrame sospechosos.

En lo que se refiere a protocolos de purificación del estado de la técnica, WO 2006/067230 A divulga el factor de purificación VII sobre la resina de modo mixto Capto MMC y WO 2005/014621 divulga la purificación de proteínas que contienen el dominio Ig con cromatografía de modo mixto entre los que está el factor XIII. WO 2006/103258 y WO 96/15140 A divulgan protocolos de purificación para el factor de coagulación VIII.

Aún existe la necesidad en la técnica de métodos de purificación mejorados los cuales sean rápidos y eficientes y en los cuales se conserve esencialmente la actividad de Factor VIII. El método de la presente invención es ventajoso toda vez que, en una sola etapa, proporciona una reducción de volumen y un incremento considerable en la actividad específica. Así, el método, en una sola etapa, combina una etapa de captura y una de purificación. La presente invención proporciona también un proceso eficiente para producir una solución altamente concentrada y muy pura de Factor VIII recombinante en la que la proteína de Factor VIII se estabiliza contra degradación. Con la presente invención, es posible combinar una etapa de captura y purificación sin arriesgar la desestabilización severa de las moléculas de FVIII y, en una sola etapa, obtener una purificación inicial de la muestra cruda, obtener una reducción en volumen sustancial (facilitando de esta manera etapas de purificación adicionales) así como obtener un factor de purificación sustancial (incremento en la actividad específica de FVIII) y una solución resultante ("grupo de captura") en la que la proteína sea estabilizada contra degradación.

Breve descripción de la invención

La presente invención está relacionada con la purificación nueva y eficiente de proteínas recombinantes, especialmente Factor VIII de coagulación. Los inventores de la presente invención han descubierto que el uso de columnas multimodal para la captura de moléculas de Factor VIII a partir de fluido de cultivo de células de mamífero es un método de purificación sorprendentemente rápido y eficiente para recuperar contaminantes de proteína FVIII recolectada del cultivo, sin la pérdida en la actividad de la proteína.

En un aspecto, la invención proporciona un método para purificar proteína de Factor VIII de coagulación que contiene uno o más contaminantes, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto la proteína de Factor VIII con una resina multimodal o de modo mixto que contenga ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

(b) eluir la proteína de Factor VIII con un tampón de elución que contenga al menos sal 1.5 M y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio.

En diferentes formas de realización, el método comprende además una etapa (c) en la que la solución que contiene Factor VIII que resulta de la etapa (b) es recogida; y/o el método comprende además una etapa (a1) en la que la columna, después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), es pasada con uno o más tampon(es) de lavado.

En varias formas de realización de la invención, uno o más de dichos tampones de lavado comprenden 10 mM a 1,000 mM de sal y/o el tampón de elución de la etapa (b) contiene al menos 2M de sal y al menos 45% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, tal como, por ejemplo, sal 2.3-2.6 M y 48-525 (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos; y/o la sal contenida en el tampón de elución de la etapa (b) se selecciona a partir de: NaCl,

NH₄Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, CH₃CO₂NH₄, o una mezcla de dos o más de éstas.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de una sola etapa para purificar una proteína de Factor VIII que contiene uno o más contaminantes, que comprende las etapas de:

5 a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contenga los ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

b) eluir la proteína con un tampón de elución que contenga al menos 1.5 M de sal y por lo menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio; en donde el método logra una reducción en el volumen de columna de aproximadamente 250 veces.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método de una sola etapa para purificar proteína de Factor VIII que contiene uno o más contaminantes, comprendiendo las etapas de:

a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contenga los ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

15 b) eluir la proteína con un tempón de elución que contenga al menos 1.5 M de sal y por lo menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio; en donde el método logra un "factor de purificación" de al menos 30 veces.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para estabilizar una proteína de Factor VIII, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contenga los ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

20 b) eluir dicha proteína con un tampón de elución que contenga al menos 1.5 M de sal y por lo menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A es un cromatograma que muestra la absorción UV a 280 nm, conductividad y pH sobre una corrida de purificación con equilibrado, carga, lavado y elución.

25 La figura 1B muestra una ampliación de la parte de lavado y elución del cromatograma de la figura 1.

La figura 2 muestra una electroforesis en gel SDS teñida con plata que ilustra la purificación obtenida usando la columna Capto MMC en las etapas de purificación de carga, paso de flujo (FT) y elución. Carril 1: estándar MW, Carril 2: Medio de cultivo de células, Carril 3: Vacío, Carril 4: Interrupción (material no unido) de la columna Capto MMC, Carril 5: Vacío, Carril 6: Grupo de captura (material proteico unido y eluido de la columna Capto MMC).

30 La figura 3 es un histograma que muestra los rendimientos porcentuales de Factor VIII recombinante purificado usando resina Capto MMC con diferentes tampones de elución que contienen varias concentraciones de NaCl o NH₄Cl y etilenglicol.

La figura 4 muestra el efecto de ciclos repetidos de congelación/descongelación en la estabilidad del Factor VIII en el grupo de captura.

35 Descripción detallada de la invención

El presente método para purificar Factor VIII de coagulación se lleva a cabo usando cromatografía multimodal haciendo uso de resinas que son tanto hidrófobas como cargadas negativamente. La solución de la proteína que será purificada, por ejemplo, el sobrenadante que contiene proteína obtenida de fermentación de células de mamífero, se aplica a la resina multimodal al pasar una solución sobre una columna de cromatografía que contiene la resina. La solución (carga) es típicamente filtrada (por ejemplo, mediante filtración cerrada o filtración de flujo cruzado) y/o centrifugada para remover células y partículas antes de ser cargadas sobre la resina. La etapa de carga no requiere el ajuste de pH o conductividad.

Después de la carga, la columna es típicamente lavada con uno o más tampones de lavado, uno de los cuales contiene alta concentración de sal. En una forma de realización, la columna es lavada, después de la carga, con tampón de equilibrio, seguido opcionalmente por el lavado con un segundo tampón con alta concentración de sal.

5 Para recuperar sustancias adsorbidas, se lleva a cabo elución al pasar un tampón de elución que comprende una alta concentración de sal y un solvente orgánico sobre la columna.

10 La invención proporciona una reducción de volumen de columna (CV) de aproximadamente 250 veces, en comparación con (y calculado a partir de) el volumen de la muestra de carga, logrando así una reducción de volumen excelente. Por "reducción de volumen" se quiere decir una reducción en el volumen de solución de eluato que contiene proteína cuando se compara con el volumen de solución de carga que contiene proteína (por ejemplo, la muestra cruda clarificada del proceso de fermentación).

El método de purificación de la invención proporciona además un rendimiento de proteína de 70-100% y el factor de purificación (incremento en la actividad específica) es de hasta 100 veces. La proteína purificada resultante es estable en el tampón de elución durante al menos 2 meses a -70°C.

15 Más aún, el método de la invención proporciona una solución de Factor VIII estable. El eluato de captura puede ser congelado y descongelado al menos 3 veces sin pérdida de actividad significativa.

20 La invención hace uso de resinas de cromatografía multimodal para la separación de la proteína de Factor VIII de interés a partir de los contaminantes. La cromatografía multimodal, en la que dos o más sitios diferentes pero cooperantes interactúan con un objetivo, ha sido determinada como un sistema adecuado para la purificación de proteína de Factor VIII. La resina de cromatografía usada para la purificación de la proteína recombinante en la presente invención está disponible comercialmente, por ejemplo: Capto MMC™ (GE Healthcare) o MBI HyperCel™ (Pall, anteriormente BioSeptra).

25 Capto MMC contiene un ligando con funcionalidad multimodal que da una selectividad diferente en comparación con intercambiadores iónicos tradicionales y proporciona también la posibilidad de unir proteínas a concentraciones de sal tan altas como 0.5 M a 1.0 M. El ligando exhibe en la presente diversas funcionalidades para interacción con la molécula objetivo y ofrece entonces interacción iónica, enlace de hidrógeno e interacción hidrófoba. En una forma de realización de la invención, la resina multimodal es Capto MMC™.

30 MBI HyperCel™ (Pall), otra cromatografía multimodal, es eficiente para enfrentar problemas de estabilidad y fugas de columnas de afinidad a base de proteínas. Más específicamente, MBI HypercelRTM (Pall), un adsorbente que comprende ligandos de ácido mercapto-benzimidazol-sulfónico, proporciona interacciones hidrófobas así como iónicas con una proteína dada. Las interacciones hidrófobas se supone que se deben al sistema de anillos aromáticos, en tanto que las interacciones iónicas deben ser debidas al sustituyente SO₃⁻, el cual se conoce como un fuerte intercambiador catiónico. Además, los átomos de nitrógeno del sistema aromático de ligando MBI pueden cargarse bajo ciertas condiciones, y pueden proporcionar en consecuencia interacciones iónicas con grupos cargados negativamente.

35 En una forma de realización ventajosa, los contaminantes son adsorbidos a los ligandos multimodales, y una fracción esencialmente pura de Factor de coagulación VIII es recuperada por una elución selectiva subsecuente. La etapa de captura proporciona un factor de purificación (incremento en actividad específica) de por lo menos 80 veces, tal como 80 a 100 veces, 90 a 100 veces o 100-160 veces.

El grupo de captura resultante comprende la proteína Factor VIII que es al menos 10% pura, tal como al menos 20% o aproximadamente 30% a 60%, tal como 30% a 50%. La pureza se define en la cantidad de proteína de Factor VIII en % (p/p) (por ejemplo, según se determina por ELISA) de la cantidad total de proteína.

40 En una forma de realización del presente método, la solución cargada a la resina de cromatografía multimodal es una cosecha que contiene Factor VIII de fermentación de células de mamífero. En una forma de realización de la misma, la cosecha se filtra y/o se centrifuga para eliminar células y partículas; en otra forma de realización la cosecha se carga a la resina sin ningún ajuste de pH o conductividad de la solución de carga.

45 La presente invención abarca específicamente un método en el que la etapa de carga comprende cargar la solución de carga que contiene proteína sobre la resina a un pH y conductividad similares al pH y conductividad de una cosecha que contenga Factor VIII de fermentación de células de mamífero, opcionalmente una cosecha filtrada. Esto proporciona mayor ventaja en la etapa de captura inicial al restringir el volumen lo cual de otra manera es necesario para ajustar (reducir) la conductividad de la solución de carga.

En una forma de realización, la cosecha que contiene Factor VIII se estabiliza por la adición de imidazol (tal como, por ejemplo, 1-10 mmoles de imidazol por L de cosecha). Debido a la pequeña cantidad y volumen de imidazol añadido en comparación con el volumen de la cosecha, cualquier cambio en pH y/o conductividad de la cosecha es insignificante. En una forma de realización más, la cosecha es después (i) filtrada y/o centrifugada para eliminar células y partículas y (ii) cargada a la resina sin adición adicional de químicos.

El método de la invención se lleva a cabo típicamente en varias etapas: equilibrio de columna, carga y elución. Una o más etapas de lavado pueden ser incluidas después de la carga y antes de la elución. Las etapas de lavado se llevan a cabo típicamente usando por lo menos un tampón que contiene una alta concentración de sal. En una forma de realización, se emplea una etapa de lavado que usa un tampón que comprende 10 mM a 1,000 mM de sal, tal como, por ejemplo, 100-1,000 mM, o 250-1,000 mM, o 500-1,000 mM, o 500-800 mM de sal. En otra forma de realización, el método incluye una etapa de lavado en la que, después de la carga, la columna se lava primero con tampón de equilibrio y luego se lava con un segundo tampón de lavado que contiene alta concentración de sal.

En una forma de realización, el tampón de equilibrio comprende un agente de regulación de pH (tal como, por ejemplo, imidazol en la escala de 5 mM a 100 mM, por ejemplo 20 mM de imidazol), una sal Ca (1 mM a 100 mM, por ejemplo, 10 mM de CaCl_2), un detergente (tal como, por ejemplo, Tween™ en la escala de 0.001% a 0.1%, por ejemplo 0.02% (p/v) de Tween™ 80) y una sal (10 mM a 1,000 mM, por ejemplo, 50 mM de NaCl). El tampón de equilibrio se mantiene a un pH de 6.0 a 8.0; de preferencia las condiciones de pH se mantienen a 7.3 a 7.5. Se apreciará por una persona capacitada en la técnica que la proteína de Factor VIII ejemplificada en la presente es estable a un pH de aproximadamente 6.0 a 8.0 y de esta manera el tampón de equilibrio está a un pH de 7.3-7.5, muy preferiblemente a 7.5.

En una forma de realización, el tampón de lavado comprende un agente de regulación de pH (tal como, por ejemplo, imidazol en la escala de 5 mM a 100 mM, por ejemplo, 20 mM de imidazol), una sal Ca (1 mM a 100 mM, por ejemplo 10 mM de CaCl_2), un detergente (tal como por ejemplo Tween™ 80 en la escala de 0.001% a 0.1%, por ejemplo 0.02% (p/v) de Tween 80) y una sal (por ejemplo, NaCl en la escala de 50 mM a 1,000 mM).

La etapa de elución se lleva a cabo con un tampón de elución que comprende al menos 1.5 M sal y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio (1 mM a 100 mM, por ejemplo, 10 mM de CaCl_2). El tampón de elución tiene un pH de 6.0 a 8.0; de preferencia las condiciones de pH se mantienen a 7.3 a 7.5. Para mantener las condiciones de pH deseadas, el tampón de elución contiene también un agente de regulación de pH.

El término “agente de regulación de pH” abarca aquellos agentes que son capaces de mantener el pH de una solución dentro de una escala deseada – en el contexto de la presente invención dentro de la escala de 6.0 a 8.0, tal como 7.3 a 7.5. La escala de concentración de tampón se selecciona para mantener el pH de la solución preferida. El agente de regulación de pH también puede ser una mezcla de por lo menos dos agentes de regulación de pH, en donde la mezcla sea capaz de proporcionar un valor de pH en la escala especificada. Los agentes de regulación de pH pueden incluir, pero no están limitados a, citrato (sodio o potasio), acetato (amonio, sodio o calcio), histidina (L-histidina), fosfato (sodio o potasio), ácido tartárico, ácido succínico, MES, HEPES, imidazol, TRIS, etanolamina y mezclas de dos o más de los mismos. En una forma de realización, el agente de regulación de pH empleado es imidazol en la escala de 5 mM a 100 mM.

Las sales preferidas son NaCl, NH_4Cl , KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ (acetato de amonio, NH_4AC), o una mezcla de dos o más de los mismos. En una forma de realización, el tampón de elución comprende sal de alrededor de 2.5 M y por lo menos 40% de glicol; en otra forma de realización, el tampón de elución comprende aproximadamente 2.5M de sal y aproximadamente 50% de glicol. En una forma de realización, la sal es NaCl; en otra, la sal es NH_4Cl . En una forma de realización, el glicol es etilenglicol; en otra, el glicol es propilenglicol. En otra forma de realización más, el tampón de elución comprende NaCl y etilenglicol.

En otra forma de realización, NH_4Cl a una concentración de 2.5M con etilenglicol se usa también para la elución de la proteína. En otra forma de realización más, el tampón de elución comprende además un detergente. En una forma de realización particular del método, el eluyente es 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl_2 , 0.02% (v/v) de Tween 80, 2.5M de NaCl y 8M de etilenglicol a un pH de 7.5.

En otra forma de realización, resina MBI HyperCel™ se usa en el método para la purificación del Factor VIII. En una forma de realización, la unión del Factor VIII recombinante usando la columna MBI HyperCel™ se lleva a cabo después de la adición de 100 mM de Na_2SO_4 a la cosecha y la elución se logra con 1M de NaCl y 5M de glicerol.

En una forma de realización particular de la invención, el método comprende las etapas de:

a) poner en contacto el Factor VIII con una resina multimodal o de modo mixto que contenga los ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

b) pasar la columna con tampón de equilibrio que comprenda 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (p/v) de Tween 80 y 50 mM de NaCl y tampón de lavado que comprenda 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (p/v) de Tween 80 y 1.5M de NaCl;

c) eluir la proteína con el tampón de elución que comprende 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (v/v) de Tween 80, 2.5M de NaCl y 8M de etilenglicol.

La primera etapa de la purificación de una proteína recombinante expresada en células de mamífero, bajo la mayoría de las circunstancias normales, maneja grandes volúmenes de carga. Para la purificación de proteínas comercial, es importante reducir el volumen hasta donde pueda manejarse fácilmente. Además, la etapa de purificación tiene que tener un rendimiento significativo para lograr la economía de proceso para propósitos comerciales u otros. Aproximadamente 20 a 100 veces de reducción en volumen en la primera etapa es normalmente lo que se desea en la primera etapa de purificación de proteínas mientras que ésta última se considera como una reducción de volumen contundente.

En una forma de realización, el volumen de carga que contiene la proteína que será purificada es de más de 500 volúmenes de columna (CV). La proteína eluida proporciona una reducción en el volumen final de más de 100 veces. La presente invención abarca un volumen de carga de 50-600 CV. La reducción en volumen es de preferencia de alrededor de 100-300 veces. En una forma de realización, el volumen de carga es de aproximadamente 500 CV, o alrededor de 450-600 CV, y la proteína de Factor VIII es eluida en aproximadamente 2CV logrando una reducción en volumen de aproximadamente 250 veces.

En otra forma de realización, la etapa de captura puede combinarse con uno o más agentes inactivadores de virus, tales como, por ejemplo Triton X-100 (por ejemplo a una concentración de alrededor de 1% (p/v)). El agente inactivador de virus puede por ejemplo añadirse a uno o más de los tampones usados.

Las velocidades de flujo se manipulan para ser de entre 300-950 cm/hr para todas las etapas del proceso de purificación excepto la elución y las etapas de limpieza en lugar (CIP) en donde las velocidades de flujo son de 30-350 cm/h.

En una forma de realización la velocidad de flujo en la carga es de 450 cm/h; durante la elución y CIP, la velocidad de flujo se reduce a 30 cm/h. En una forma de realización de la invención, la velocidad de flujo en la carga es de alrededor de 450-600 cm/h.

En un aspecto, la invención se refiere también a una preparación que comprende:

(i) una proteína de Factor VIII; y (ii) un tampón que contiene al menos 1.5 M de sal y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol, o una mezcla de los mismos, e iones de calcio; en donde el Factor VIII es 30% a 60% puro.

Definiciones

En la presente invención, bajo "proteína de Factor VIII" se quiere incluir Factor VIII de longitud completa, FVIII:C y derivados de supresión de Factor VIII de longitud completa que tengan inactividad coagulante. Por derivados de supresión, se quiere decir el Factor VIII en el que todo o parte del dominio B falta mientras que se mantiene la actividad coagulante. Estas formas de dominio B suprimido de Factor VIII son, por ejemplo, descritas en WO91/09122. La estructura y bioquímica de Factor VIII en general han sido descritas por Kaufman (Trends in Biotechnology, 9, p.353-359 (1991) and Hematology, 63, pág. 155-165 (1991)). Se incluyen también variantes de secuencia de Factor VIII y derivados, incluyendo formas pegiladas, aciladas y polisialiladas de Factor VIII, que han mantenido la actividad biológica de Factor VIII característica. El Factor VIII puede obtenerse mediante medios recombinantes. En una forma de realización, el factor VII es el Factor VIII producido de manera recombinante. En una forma de realización, el Factor VIII es Factor VIII de longitud completa; en otra forma de realización, la proteína de Factor VIII es un Factor VIII de dominio B suprimido. En otra forma de realización más, el Factor VIII es un Factor VIII pegilado, acilado o polisialilado.

Concentrados de Factor VIII derivados de plasma humano contienen varias formas de Factor VIII completamente activas fragmentadas como las descritas por Andersson et al (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A., 83, pág. 2979-2983 (1986)). La forma activa más pequeña tiene una masa molecular de 170 kDa y consiste en dos cadenas de 90 kDa y 80 kDa mantenidas juntas por iones de metal (véase, por ejemplo, EP197901). Estos fragmentos de Factor VIII también se incluyen –la purificación de estos fragmentos constituye una forma de realización de la presente invención. La actividad biológica de

Factor VIII se ensaya, por ejemplo, como se describe en la sección experimental (véase abajo).

El término “eluyente” tiene su significado convencional como el identificado en la técnica, el cual es un tampón o tampones de pH adecuado y/o fuerza iónica para liberar una o más proteínas o compuestos de una matriz de separación.

5 Según se usa aquí, la “sal” en la etapa de elución se refiere a una sal alcalinotérrea, metálica alcalina o de amonio, es decir, una sal que tiene un catión de los elementos alcalinotérreos o metálicos alcalinos o un catión de amonio y que tiene un anión inorgánico u orgánico (a base de hidrocarburos). Ejemplos de estas sales incluyen cloruro de sodio, cloruro de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de calcio, fosfato de amonio, fosfato de magnesio, fosfato de potasio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de calcio, etc. Las sales que se prefieren en la presente son cloruros o sulfatos. La sal que más se prefiere en la presente es cloruro de sodio.

15 El término “ligando de cromatografía multimodal” se refiere a un ligando que es capaz de proporcionar al menos dos sitios diferentes pero cooperantes que interactúan con la proteína a la que se unirán. Uno de estos sitios da un tipo atractivo de interacción carga-carga entre el ligando y la sustancia de interés. El otro sitio da típicamente interacción aceptor/donador de electrones y/o interacciones hidrófobas y/o hidrófilas. La presente invención está dirigida, particularmente a las interacciones hidrófobas. Las interacciones donador/receptor de electrones incluyen interacciones tales como enlace de hidrógeno, pi-pi., catión-pi., transferencia de carga, dipolo-dipolo, dipolo inducido, etc. Los ligandos de cromatografía multimodal según se usa en la presente o en cualquier lado también se conocen como ligandos de cromatografía de “modo mixto”.

20 El término “etapa de captura” se refiere, en el contexto de cromatografía de líquidos, a la etapa inicial de un procedimiento de separación. Más comúnmente, una etapa de captura incluye clarificación, concentración, estabilización y una purificación significativa de contaminantes solubles. Después de la etapa de captura, puede seguir una purificación intermedia, la cual elimina la mayoría de las impurezas significativas incluyendo ADN, virus y endotoxinas. Estas impurezas también pueden ser removidas/reducidas en captura.

25 El término “etapa de pulido” se refiere a una etapa de purificación final, en la que contaminantes residuales e impurezas son removidos y el rendimiento es un producto biológico activo. Los contaminantes removidos durante la etapa de pulido son comúnmente conformadores de la molécula objetivo o productos de derrame sospechosos.

30 El término “Volumen de Columna” según se conoce en la técnica de cromatografía se refiere a volumen geométrico de la parte del tubo que contiene el llenado. Según la presente invención, el volumen de carga es de más de 50 Volúmenes de Columna (CV) o más o menos alrededor de 300-600 CV o 450-600 CV. La proteína eluida en la etapa final de purificación es alrededor de 2-5 CV logrando una reducción en volumen de aproximadamente 100 veces a 350 veces, tal como, por ejemplo, 250 veces.

35 El “factor de purificación” se define como incremento en actividad específica: es decir U/mg de proteína antes de la etapa de purificación en comparación con U/mg de proteína después de la etapa de purificación. La actividad específica de factor de coagulación VIII puede ensayarse mediante ensayos de actividad disponible comercialmente, tales como, por ejemplo, el uso de CoaTest® Chromogenix™ (Instrumentation Laboratory, Bélgica) de acuerdo con el protocolo del fabricante o como se describe en la sección experimental abajo.

40 El término “un método de una sola etapa” se refiere a un método para purificar una proteína de Factor VIII que contiene uno o más contaminantes, en donde el método logra tanto una reducción en volumen como un incremento en actividad específica (factor de purificación >1). En una forma de realización de la presente invención, el método proporciona (i) una reducción en el volumen de columna de alrededor de 250 veces, y (ii) un “factor de purificación” de al menos 30 veces.

La invención se entiende más completamente al hacer referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no deben, sin embargo, considerarse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

45 La estructura y bioquímica de Factor VIII recombinante se han descrito previamente. (Véase, por ejemplo, Trends in Biotechnol, 1991, 9:353-359, Transfus. Med. Rev. 1992, 6:235-246).

Además, el aislamiento de Factor VIII así como la producción recombinante de Factor VIII (longitud completa y formas variantes/truncadas) se describen en la técnica:

Tecnología de ADN recombinante ha permitido la construcción de plásmidos que dirigen la expresión de productos de fusión de proteína de Factor VIII en células de mamífero transfectadas. La producción recombinante de Factor VIII en cultivo de células se reporta por Wood et al (véase Nature, 1984, 312:330-337). Variantes activas y análogos de proteína de Factor VIII y secuencias de ADN que las codifican también han sido reportadas (US4868112, EP0786474, WO 86/06101 y WO 87/07144). Varias manipulaciones de las secuencias genéticas han mostrado que el dominio B del Factor VIII no es crítico para la actividad procoagulante y la proteína procoagulante activa puede ser expresada al expresar el Factor VIII que codifica la región de nucleótidos que carece del dominio B. Modificaciones importantes en estas variantes y análogos incluyen la parte o todo el dominio B que falta y/o posiciones de aminoácidos específicas son modificadas, por ejemplo, de tal manera que los sitios lábiles de proteasa normalmente sean resistentes a proteólisis, por ejemplo, por trombina o proteína C activada. Otros análogos incluyen modificación en uno o más residuos de lisina y/o tirosina. La forma truncada de la proteína es una glicoproteína de 170 kDa que consiste en 1438 aminoácidos. Esta proteína de dominio B suprimido es una modificación postraducciona del Factor VIII derivado de plasma y es comparable en su actividad anti-hemofílica con aquella del progenitor.

Ensayo de actividad de Factor VIII

Ensayos para estimar la actividad biológica de Factor VIII se conocen bien por la persona experta en la técnica y estos ensayos están disponibles comercialmente de un número de proveedores. La actividad de Factor VIII purificado puede, por ejemplo, ensayarse usando CoaTest™ Chromogenix™ (Instrumentation Laboratory, Bélgica) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 1

La producción recombinante de Factor VIII se conoce bien en la técnica; se puede hacer referencia, por ejemplo, a US 5633150 (Genetech) y US 7138505 (Novo Nordisk/Novartis).

El Factor VIII recombinante fue expresado en células CHO en un medio libre de suero disponible comercialmente. La cosecha proteínica de la fermentación se usó además para la purificación.

Ejemplo 2

Purificación de Factor VIII recombinante

Resina Capto MMC (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) se usó para la purificación de la proteína recombinante. La columna fue empacada con una altura de lecho de 12 cm y volumen de lecho de 24 ml.

Como una primera etapa, el proceso de purificación incluyó carga en la que la cosecha de la fermentación se aplicó sobre la columna. El volumen de columna (CV) de carga fue 450 CV (tabla 1). Esto fue seguido por pasar la columna con tampón de equilibrio que consistente en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (v/v) de Tween 80 y 50 mM de NaCl. El pH del tampón de equilibrio se ajusta a 7.5. La columna se lava además con tampón de lavado (20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (v/v) de Tween 80 y NaCl 1.5M) a un pH equivalente al tampón de equilibrio, es decir, 7.5. Los volúmenes de columna de las etapas de equilibrio y lavado fueron 3CV (tabla 1).

Tabla 1

Volúmenes de columna (CV) usados en varias etapas de purificación de Factor VIII

Etapas	Tampón	Volumen de columna
Equilibrio	Tampón de equilibrio	3
Carga	Carga	450
Lavado 1	Tampón de equilibrio	3
Lavado 2	Tampón de lavado	3
Elución	Tampón de elución	5
CIP	CIP	3

La elución se llevó a cabo al pasar el tampón de elución sobre la columna. El tampón de elución consiste en 20 mM de imidazol, 100 mM de CaCl₂, 0.02% (v/v) de Tween 80 y 2.5M de NaCl y 8M de etilenglicol.

La velocidad de flujo se mantuvo a 450 cm/h en cada etapa de la purificación excepto la elución y CIP durante la cual la velocidad de flujo fue de 30 cm/h.

Un cromatograma que muestra la absorción UV a 280 nm sobre una corrida de purificación con equilibrio, carga, lavado y elución es proporcionado en la figura 1.

Ejemplo 3

Ensayo de actividad

La actividad de Factor VIII purificado se midió usando una modificación del ensayo CoaTest™ SP: Reactivos y solución de abastecimiento reguladora de pH del kit CoaTest® SP fueron usados. Se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente antes del inicio del experimento. Las muestras fueron diluidas en tampón de ensayo CoaTest (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, BSA al 1%, pH 7.3, con conservante) a alrededor de 2 mU/ml. El plasma de referencia se diluyó en el tampón de ensayo a 5-0.5 mU/ml. Las muestras fueron diluidas en tampón de ensayo a 12 y 9 U/ml, luego 10 veces en plasma deficiente FVIII con VWF (Dade Behring), y finalmente 10- y 20 veces en el tampón de ensayo CoaTest® (dando como resultado 4 diluciones por muestra). Cincuenta µl de muestras, estándares y control negativo de tampón se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) por duplicado. El reactivo de factor IXa/factor X, el reactivo de fosfolípidos y CaCl₂ del kit CoaTest® SP se mezclaron 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de esto se añadió a los pocillos. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, 50 µl de la mezcla de sustrato de factor Xa S-2765/inhibidor de trombina I-2581 se añadieron y las reacciones se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente antes de que se añadieran 25 µl de ácido cítrico al 2%. La absorbancia a 415 nm se midió en un lector de placa de microtitulación Spectramax® (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm usado como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se restó de todas las muestras y se preparó una curva de calibración mediante regresión lineal de los valores de absorbancia determinados vs concentración de FVIII en mU/ml.

Ensayo ELISA

Antígeno de Factor VIII se determinó usando el kit comercial ELISA de Affinity Biologicals (VisuLize Factor VIII Antigen Kit, Lote AGB-0006) esencialmente como se describe por el fabricante.

El Factor VIII recombinante se purificó de la cosecha de fermentación como se describió en el ejemplo 2, arriba. El factor de purificación y el rendimiento de proteína de Factor VIII se determinaron por CoA y ELISA como se describió arriba:

Factor de purificación y rendimiento (determinado por la prueba CoA) (Tabla 2):

Etapas	Volumen [ml]	Actividad [U/ml]	Actividad total [U]	Proteína [Mg/ml]	Proteína total [mg]	Actividad específica [U/mg]	Factor de purificación [X]	Rendimiento total [%]
Medio	11000	117	1287000	2.11	23221	55	1	100.0
Paso de flujo de captura	11000	1.8	19800	2.10	23100			1.5
Grupo	45	14204	639180	2.68	120.6	5300	96	49.7

Como puede verse de los resultados anteriores es posible concentrar medio que contiene FVIII a partir de 11,000 ml a 45 ml (244 veces) y al mismo tiempo obtener un incremento en actividad específica de 55 U/mg a 5,300 U/mg, por ejemplo, obtener un factor de purificación 96 veces determinado por medición de actividad.

Factor de purificación y rendimiento (determinado por ELISA) (tabla 3):

Etapa	Volumen [ml]	Proteína de Factor VIII [µg/ml]	Proteína de Factor VIII total [mg]	proteína [mg/ml]	Proteína total [mg]	"Actividad específica" [mg de Factor VIII/mg de proteína total]	factor de purificación [X]	Rendimiento [%]
Medio	11000	9.7	106.7	2.11	23221	0.0046	1	100.0
Paso de flujo de captura	11000	0.6	6.6	2.10	23100	0.00028		6.2
Grupo de captura	45	1706	76.8	2.68	120.6	0.6	130	72.0

Como puede verse de los resultados anteriores es posible concentrar medio que contiene FVIII a partir de 11,000 ml a 45 ml (244 veces) y al mismo tiempo obtener un incremento en actividad específica de 0.0046 mg de Factor VIII/mg de proteína total a 0.6 mg de Factor VIII/mg de proteína total, por ejemplo, obtener un factor de purificación de 130 veces determinado por ELISA.

Ejemplo 4

Electroforesis en gel proteínico

La electroforesis en gel de SDS se llevó a cabo usando 7% de gel de acetato tris NuPage® con un tris acetato como tampón de corrida esencialmente como se describe por el fabricante (Invitrogen). Brevemente, la electroforesis en gel se llevó a cabo durante 50 minutos a 150 voltios y las muestras fueron teñidas con equipo de tinción SilverQuest® (Invitrogen) como se describe en las instrucciones del fabricante. Las normas de peso molecular (MW) usadas fueron Mark 12 de Invitrogen.

Los resultados se muestran en la figura 2 y revelan un enriquecimiento muy alto del Factor VIII recombinante en el grupo de captura ilustrado por la presencia de una alta cantidad de las bandas de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) (indicadas por flechas en la figura 2).

Ejemplo 5

Purificación visualizada por electroforesis en gel SDS

Muestras de proteínas para electroforesis fueron desnaturalizadas y reducidas a 70°C durante 10 minutos en tampón de muestra LDS (Invitrogen) que contenía 50 mM de DTT. Los geles de separación fueron 7% de tris-acetato (TA) gel de poliacrilamida Pre-Cast novex (Invitrogen) y la electroforesis se llevó a cabo durante 60 minutos a un voltaje de limitación de 150 V con tampón de tris-acetato (Invitrogen) tanto como tampón ánodo como cátodo. La tinción con plata se llevó a cabo usando SilverQuest® (Invitrogen) de acuerdo con la descripción del fabricante.

El gel que ilustra la gran purificación obtenida usando la columna Capture MMC. El medio de células contiene una serie de proteínas. La gran mayoría de estas proteínas pasan a través de la columna mientras que el Factor VIII es altamente concentrado en el grupo de captura proveniente de la columna.

Ejemplo 6

Condiciones de elución

Varias condiciones de elución se probaron para la resina Capto MMC. A la cosecha que contenía Factor VIII recombinante, se le añadieron glicerol a una concentración final de 5% y CHAPS a 5 mM. El equilibrio se llevó a cabo con tampón de equilibrio de 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, Tween 80 (0.2% v/v), 50 mM de NaCl, 5 mM de CHAPS y 5% de glicerol a pH 7.5. Se usaron tampón de elución de 20 mM de etanolamina, 10 mM de CaCl₂, Tween 80 (0.2% v/v), a pH 8.3 con diferentes concentraciones de sal y etilenglicol, los cuales incluyen: a. sin adición; b. NH₄Cl 1M; c. NH₄Cl 2.5 M; d. etilenglicol 3M; e. NH₄Cl 1M + etilenglicol 3M; f. NH₄Cl 2.5 M + etilenglicol 3M; g. etilenglicol 8M; h. NH₄Cl 1M + etilenglicol

8M; I. NH_4Cl 2.5M + etilenglicol 8M; NaCl 2.5M + 8M de etilenglicol. Las condiciones de elución se determinaron con base en el rendimiento porcentual. La figura 3 muestra que a concentraciones de NH_4Cl 2.5M o NaCl de 2.5 M y etilenglicol 8M, el rendimiento porcentual de la proteína fue máximo (figura 3).

Ejemplo 7

5

Estabilidad en congelación/descongelación del grupo de captura

Alícuotas del grupo de captura, eluidas de la resina Capto MMC como se describió en el ejemplo 2, fueron sujetas a un número de ciclos de congelación/descongelación, con congelación durante la noche a -80°C seguida por descongelación a 4°C al día siguiente. Se midió la actividad del Factor VIII simultáneamente para todas las muestras usando ensayo CoA (CoaTest® Chromogenix™, como se describió en el ejemplo 3) al final del experimento.

10

Tabla 4

Actividad específica de Factor VIII en grupo de captura después de ciclos repetidos de congelación/descongelación

	Ciclo de congelación/ descongelación 0	Ciclo de congelación/ descongelación 1	Ciclo de congelación/ descongelación 2	Ciclo de congelación/ descongelación 3
Actividad de FVIII (mU/ml)	2	2.2	1.9	2.3

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar una proteína de Factor VIII de coagulación que contiene uno o más contaminantes, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) poner en contacto la proteína de Factor VIII con una resina multimodal o de modo mixto que contenga ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;
 - (b) eluir la proteína de Factor VIII con un tampón de elución que contenga al menos sal 1.5 M y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa (c) en la que se recoge la solución que contiene Factor VIII que resulta de la etapa (b).
3. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa (a1) en la que la columna, después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), es pasada por uno o más tampones de lavado.
4. Método según la reivindicación 3, donde uno o más tampón(es) de lavado comprende(n) 10 mM a 1,000 mM de sal.
5. Método según la reivindicación 4, donde el tampón de lavado contiene sal 0.5-0.8 M.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el tampón de elución de la etapa (b) contiene al menos sal 2M y al menos 45% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos.
7. Método según la reivindicación 6, donde el tampón de elución de la etapa (b) contiene sal 2.3-2.6 M y 48-52% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol, o una mezcla de los mismos.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la sal contenida en el tampón de elución de la etapa (b) se selecciona de: NaCl, NH₄Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, CH₃CO₂NH₄, o una mezcla de dos o más de estos.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque el tampón de elución contiene NaCl y etilenglicol.
10. Método según la reivindicación 1, donde el tampón de elución contiene iones de calcio a una concentración de 1 mM a 100 mM.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la etapa (a) se lleva a cabo:
 - (i) a un pH equivalente al pH de la solución de carga, y/o
 - (ii) sin el ajuste de conductividad.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la proteína de Factor VIII es seleccionada a partir del grupo que consiste en: Factor VIII de longitud completa, FVIII:C, versiones con dominio B suprimido de Factor VIII, derivados pegilados de Factor VIII, derivados polisialilados de Factor VIII y combinaciones de los mismos, de preferencia versiones de Factor VIII de dominio B suprimido.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el tampón de elución en la etapa (b) comprende 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl₂, 0.02% (p/v) de Tween 80 y NaCl 2.5M y etilenglicol 8M a pH de alrededor de 7.5.
14. Método de una sola etapa para purificar proteína de Factor VIII que contiene uno o más contaminantes, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contiene los ligandos que comprenden una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;
 - b) eluir la proteína con un tampón de elución que contiene al menos sal 1.5 M y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol o una mezcla de los mismos, e iones de calcio; en donde el método logra una reducción en volumen de columna de aproximadamente 250 veces.

15. Método de una sola etapa para purificar proteína de Factor VIII que contiene uno o más contaminantes, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contiene los ligandos que comprenden una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

5 b) eluir la proteína con un tampón de elución que contiene al menos sal 1.5 M y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol, o una mezcla de los mismos, e iones de calcio; en donde el método logra un "factor de purificación" de al menos 30 veces.

16. Método para estabilizar proteína de Factor VIII, que comprende las etapas de:

10 a) poner en contacto la proteína con una resina multimodal que contenga los ligandos que comprendan una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente;

b) eluir la proteína con un tampón de elución que contenga al menos sal 1.5 M y al menos 40% (p/v) de etilenglicol, propilenglicol, una mezcla de los mismos, e iones de calcio.

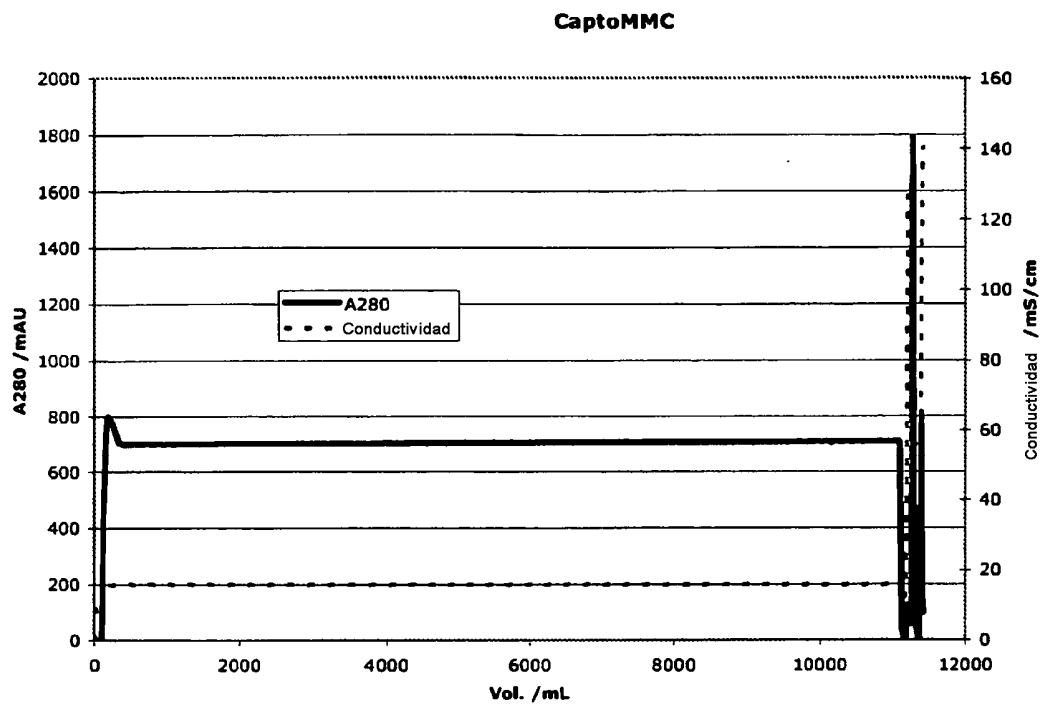
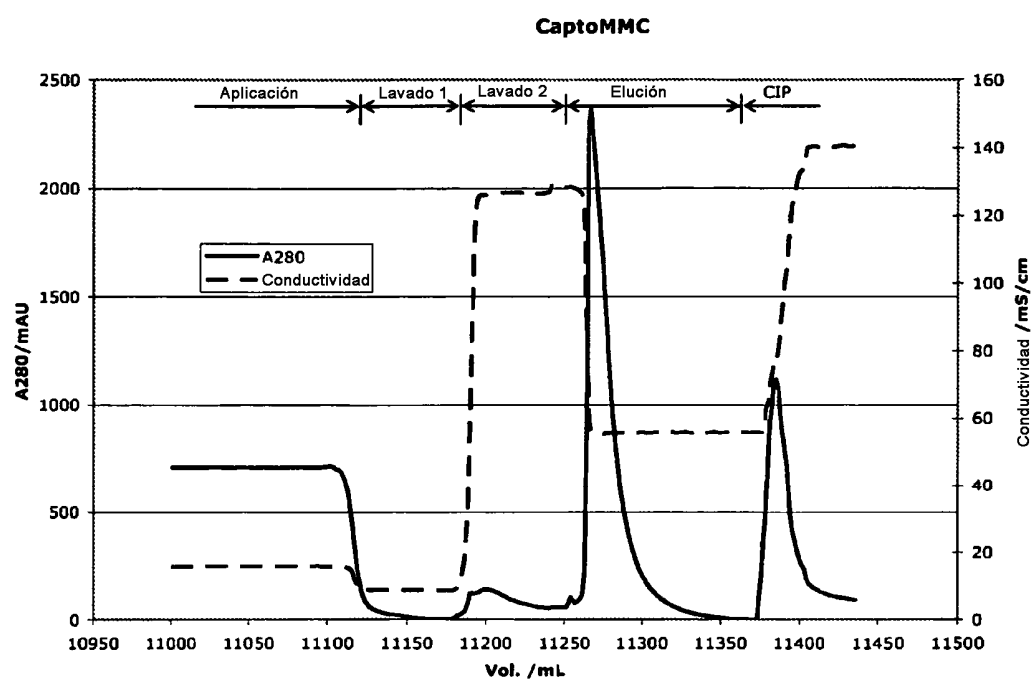


Fig 1A

**Fig 1B**

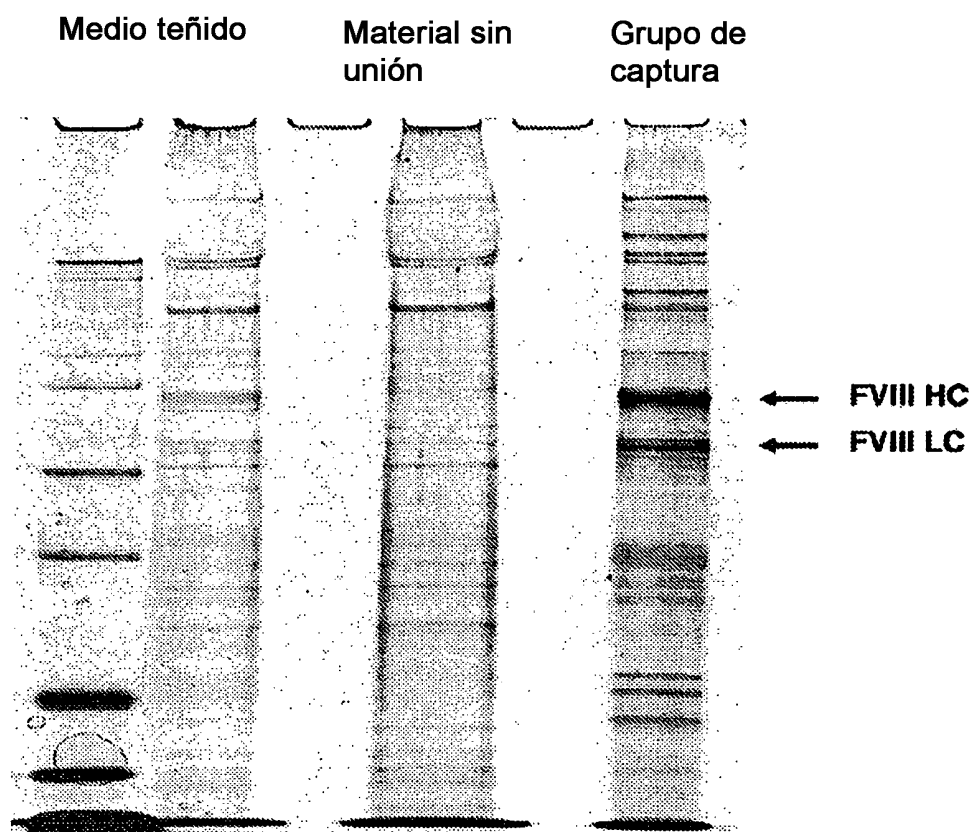
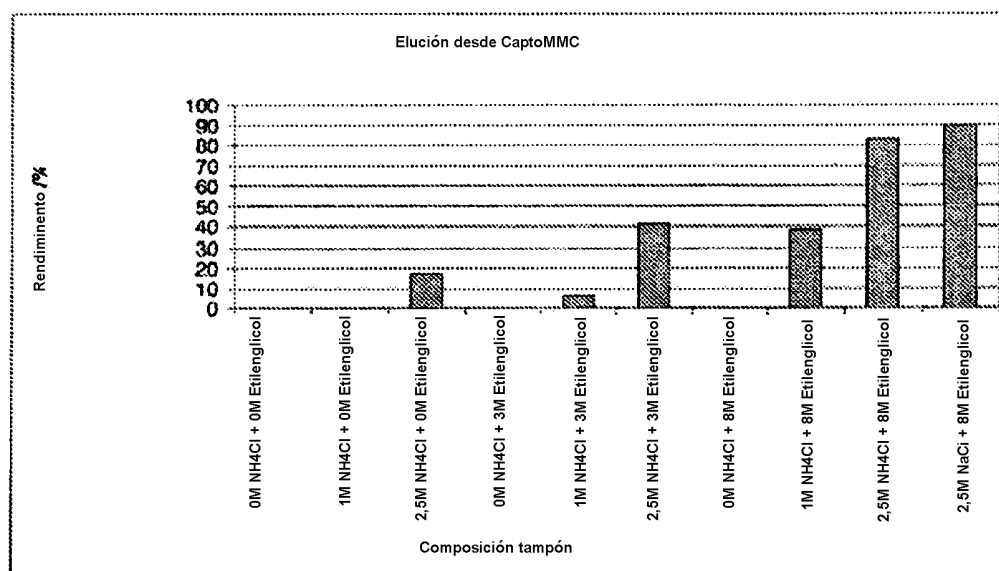


Fig 2

**Fig 3**

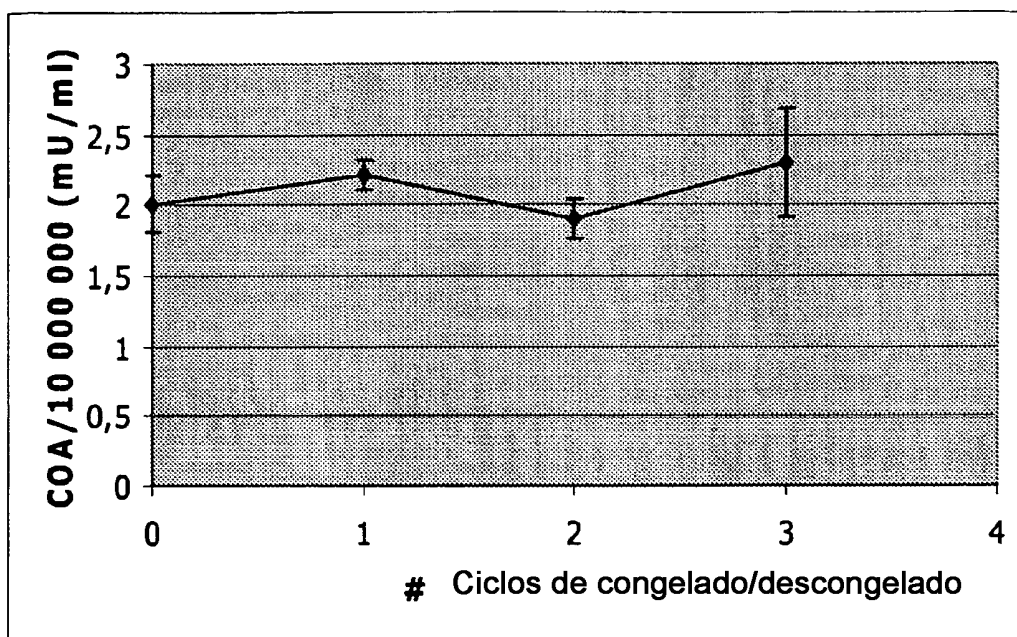


Fig 4