

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 777**

51 Int. Cl.:
C07K 14/745 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05815706 .6**
96 Fecha de presentación: **23.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1817339**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Purificación del factor XIII humano recombinante**

30 Prioridad:
23.11.2004 US 630614 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

73 Titular/es:
**ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US**

72 Inventor/es:
**JEWELL, Carol;
CHEEMA, Hardarshan;
HOGG, Deborah;
MENG, Wenmao;
O'DONNELL, Ray;
ROBERTSON, Ewan y
TOPPING, Andrew**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 378 777 T3

DESCRIPCIÓN

Purificación del factor XIII humano recombinante

5 Antecedentes de la invención

[0001] El factor XIII, también conocido como factor estabilizante de fibrina, fibrinolisasa, o transglutaminasa de plasma, es una glicoproteína de plasma que circula en la sangre como un zimógeno (M_r de aproximadamente 320 kDa) en complejo con fibrinógeno. (Greenberg and Shuman, J. Biol. Chem. 257:6096-6101 (1982)). El zimógeno de factor XIII de plasma es un tetrámero consistente en dos subunidades a y dos subunidades b. Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 83,000 Da, y la proteína completa tiene un peso molecular de aproximadamente 320 kDa. La subunidad a contiene el sitio catalítico de la enzima, mientras que la subunidad b está pensada para estabilizar la subunidad a o para regular la activación de factor XIII. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades a y b son conocidas. (Ichinose et al., Biochemistry 25:6900-6906 (1986); Ichinose et al., Biochemistry 25:4633-4638 (1986)). La expresión recombinante del factor XIII biológicamente activo ha sido descrito, ver por ejemplo, EP 0 268 772 B1.

[0002] *In vivo*, el factor XIII activado cataliza reacciones de reticulación entre otras moléculas de proteína. Durante las fases finales de coagulación sanguínea, la trombina convierte el zimógeno de factor XIII en una forma intermedia, que luego se disocia en presencia de iones de calcio para producir factor XIII activado. El factor XIII de placenta se activa con la escisión por trombina. El factor XIII activado es una transglutaminasa que cataliza la reticulación de polímeros de fibrina a través de la formación de enlaces de lisina $\xi(\delta)$ -glutamil intermoleculares, aumentando así la resistencia del coágulo. Esta reacción de reticulación requiere la presencia de iones de calcio. El factor XIII activado cataliza también la reticulación de la δ -cadena de fibrina para un inhibidor de α_2 -plasmina y fibronectina, al igual que la reticulación de colágeno y fibronectina, que puede estar relacionada con la cicatrización de heridas. La incorporación covalente del inhibidor de α_2 -plasmina en la red de fibrina puede aumentar la resistencia del coágulo para lisis.

[0003] La deficiencia del factor XIII se produce en "sangrado retardado", pero no afecta a la hemostasis primaria. Las prácticas de tratamiento corrientes para pacientes con deficiencias del factor XIII generalmente implican terapia de sustitución con factor XIII purificado aislado de fuentes naturales.

[0004] El factor XIII es también útil en el tratamiento de pacientes con esclerodermia (Delbarre et al., Lancet 2:204 (1984); Guillevin et al., Pharmatherapeutica 4:76-80 (1985); Grivauz and Pieron, Rev.Pnemol. Clin. 43:102-103 (1987)), colitis ulcerativa (Suzuki and Takamura, Throm. Haemostas. 58:509 (1987); U.S. Patent No. 5.378.687), colitis pseudomembranosa (Kuratsuji et al., Haemostasis 11:229-234 (1982) y como un profiláctico de resangrado en pacientes con hemorragia subaracnoidea (Henze et al., Thromb. Haemostas. 58:513 (1987), además de otras condiciones. Además, el factor XIII ha demostrado ser útil como un componente de adhesivos de tejido (patentes estadounidenses número 4.414.976, 4.453.939, 4.377.572, 4.362.567, 4.298.598, 4.265.233 y patentes del Reino Unido n.º 2 102 811 B). Otro uso del factor XIII incluye reducir la pérdida de sangre en pacientes sometidos a cirugía (patente estadounidense n.º 5.607.917).

[0005] Métodos para la producción recombinante de factor XIII humano se conocen en la técnica. Ver por ejemplo, patente europea n.º 0 268 772 B1. También se conocen métodos para la purificación del factor XIII a partir de fuentes biológicas que usan cristalización y/o pasos de precipitación combinados con ciertos métodos de cromatografía (patentes estadounidenses n.º 4.597.899, 5.204.447 y 5.612.456). En la patente estadounidense n.º 5.612.456, se describen varios esquemas de purificación para el factor XIII: Chung and Folk (J. Biol. Chem. 247: 2798-2807, 1972) preparó el factor XIII de plasma concentrado de plaqueta o de una preparación fibrinógena; Cooke and Holbrook (Biochem. J. 141: 79-84, 1974) describen la purificación del factor XIII de la fracción Cohn-I, el método implica múltiples pasos de precipitación de sulfato amónico y fraccionamiento en la cromatografía de celulosa DEAE para purificar factor XIII de plasma; Skrzynia et al. (sangre 60: 1089-1095, 1985) purificada la subunidad a del factor XIII de un concentrado de placenta por cromatografía y precipitación de sulfato amónico; Zwisler et al. (patente estadounidense n.º 3.904.751) y Bohn et al. (patente estadounidense n.º 3.931.399) describen procedimientos de aislamiento multifase que se basan en el uso de lactato de diamino-etoxi-acridina para precipitar el factor XIII; y Falke (U.S. Pat. No. 4.597.899) describe el aislamiento del factor XIII de un extracto de placenta por precipitación alcohólica. Aunque cada uno de los métodos previos resulta en el enriquecimiento del factor XIII, cada uno de los métodos es o complejo y/o costoso para el aislamiento del factor XIII a rendimiento elevado. Lo que se necesita en la técnica es un método más simple, menos costoso para el aislamiento del factor XIII altamente purificado, es decir, composiciones que tienen una pureza de más del 95% respecto a las proteínas contaminantes serían particularmente deseadas. Métodos que pueden proporcionar composiciones que comprenden factor XIII que es 1% o factor XIII menos activado, contienen menos del 2 % de agregados de proteína, y/o menos del 5 % de isómeros de carga de factor XIII, mientras proporcionan un rendimiento elevado también serían particularmente deseados.

Breve resumen de la invención

[0006] La presente invención proporciona métodos para el aislamiento de factor XIII altamente purificado. En una forma de realización particular, usando los métodos descritos, puede obtenerse una composición de factor XIII que tiene una

pureza de al menos 95 % respecto a proteínas contaminantes. Estos métodos están particularmente adaptados para la purificación de factor XIII recombinante de una célula huésped recombinante. En una forma de realización particular la célula huésped recombinante es una célula de levadura recombinante y los métodos proporcionan la purificación de factor XIII humano recombinante producido de levadura.

[0007] La presente invención proporciona métodos de purificación que no requieren una precipitación y/o un paso de cristalización. Los presentes métodos tampoco requieren el uso de anticuerpos costosos o anticuerpos monoclonales específicos para el factor XIII para la purificación del factor. Dentro de una forma de realización típica un líquido biológico que comprende cantidades recuperables de factor XIII se fracciona por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado para producir un producto de factor XIII altamente concentrado que no contiene proteínas del líquido biológico que ha sido encontrado en el producto de factor XIII purificado por otros métodos de purificación típicos. En una forma de realización particular, el líquido biológico es un lisado de una célula de levadura recombinante transformado para producir factor XIII donde los métodos de la presente invención eliminan proteínas de levadura que típicamente se quedan con métodos de purificación previos.

[0008] En una forma de realización particular el líquido biológico primero es parcialmente purificado por fraccionamiento de intercambio de anión para producir una primera fracción enriquecida para factor XIII; esta primera fracción es posteriormente fraccionada por fraccionamiento de interacción hidrofóbica para producir una segunda fracción enriquecida para factor XIII; posteriormente la segunda fracción enriquecida es posteriormente fraccionada por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado para producir una tercera fracción enriquecida para factor XIII. Esta tercera fracción puede ser opcionalmente adicionalmente fraccionada por fraccionamiento de intercambio de anión para producir un factor XIII altamente purificado con fracción de valor máximo.

[0009] El líquido biológico comprendiendo cantidades recuperables de factor XIII puede incluir sobrenadantes de cultivo celular, lisatos celulares, lisatos de célula clarificados, extractos celulares, extractos de tejido, sangre, plasma, y fracciones de las mismas. En una forma de realización típica de la presente invención el líquido biológico es un lisado celular, particularmente un lisado celular de una célula recombinante que ha sido creada genéticamente para producir factor XIII.

[0010] El factor XIII de la presente invención comprende cualquier factor XIII incluyendo pero no de manera limitada a un factor XIII mamífero, incluyendo en particular factor XIII humano. El factor XIII puede incluir poliproteína que comprende el α_2 dímero, que comprende el α_2 β_2 tetrámero, y similares. Típicamente, el factor XIII es el α_2 dímero de subunidad producido por una célula recombinante. La célula recombinante de la presente invención puede incluir células mamíferas bacterianas, de levadura y cultivadas. Típicamente, las células de levadura usadas para la expresión recombinante de factor XIII incluyen aquellas del género de *Saccharomyces*, incluyendo por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Pichia* y *Kluyveromyces*.

[0011] En una forma de realización particular de la presente invención el fraccionamiento de intercambio de anión de la muestra biológica que comprende factor XIII se realiza en un sustrato, fase sólida, o medios que han sido derivatizados con DEAE. Antes de la elución de la muestra del medio de intercambio de anión la muestra se puede lavar con una solución tamponada que comprende un modificador de densidad, tal como un azúcar, por ejemplo, sacarosa o glicerol para eliminar detrito celular. Fraccionamiento de interacción hidrofóbica como usada en la presente invención comprende usar medios de cromatografía que han sido derivatizados con un butilo, fenilo o grupo de octilo. En una forma de realización particularmente preferida los medios de cromatografía de interacción hidrofóbica se derivatizan con un grupo fenilo. El uso de los medios de cromatografía derivatizados con un grupo fenilo ha sido encontrado para requerir un tampón de sal inferior para eluir las fracciones que comprenden las cantidades más grandes de factor XIII.

[0012] Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado como usada en los procesos de la presente invención comprende el uso de medios cromatográficos que están cargados de, por ejemplo, Cu^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+} . En una forma de realización particular los medios cromatográficos cargados de Ni^{2+} han sido encontrados para dar el rendimiento máximo de factor XIII. Además, la fracción de factor XIII enriquecida recogida en cada etapa del proceso descrito se puede filtrar para eliminar cualquier partículas o agregados que puede haberse formados durante cada paso en el proceso.

[0013] Una forma de realización particularmente preferida de la presente invención comprende fraccionar el líquido biológico por intercambio de anión con un medio de intercambio de anión, por ejemplo, un medio de cromatografía derivatizada de DEAE, para producir una primera fracción enriquecida para el factor XIII; esta primera fracción es adicionalmente fraccionada por interacción hidrofóbica utilizando un medio de cromatografía derivatizada de fenilo para producir una segunda fracción enriquecida para factor XIII; posteriormente la segunda fracción enriquecida es adicionalmente purificada por cromatografía de afinidad de metal inmovilizada que comprende un medio de cromatografía cargada de Ni^{2+} para producir una tercera fracción enriquecida para factor XIII; la tercera fracción es finalmente fraccionada por intercambio de anión con un medio de cromatografía derivatizada de QAE para producir un factor XIII purificado con una fracción de valor máximo. En una forma de realización típica el producto de factor XIII producido por este proceso tiene una pureza de al menos 95% respecto a las proteínas contaminantes. En formas de realización particulares, el producto puede comprender menos que 5 % de proteínas de levadura.

Además el producto puede comprender menos del 1 % de factor XIII activado, menos del 2 % de agregados y/o puede también comprender menos del 5 % de isómeros de carga de factor XIII. Rendimiento para el proceso puede ser al menos alrededor de 45 %.

5 [0014] Otra comprensión de la naturaleza y ventajas de la invención se manifestarán por referencia a las partes restantes de la especificación.

Breve descripción de los dibujos

10 [0015]

Figuras 1A hasta 1C representan tablas de flujo para dos procesos de purificación para factor XIII humano recombinante. El primer proceso comprende fraccionamiento de intercambio de anión seguido de una separación de interacción hidrofóbica usando un medio derivatizado de butilo y una segunda separación de intercambio de anión. El segundo proceso de purificación añade un paso de cromatografía de afinidad de ión de metal inmovilizado (IMAC) y cambia el medio derivatizado de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) por uno que contiene un grupo fenilo.

Figura 2 representa los resultados del Análisis de SDS-PAGE de fracciones recogidas del fraccionamiento de cromatografía de intercambio de anión de DEAE del lecho expandido. Vía 1: Estándares de peso molecular; Vía 2: homogeneizado; Vía 3: carga; Vía 4: flujo de 40 L; Vía 5: flujo de 120 L; Vía 6: flujo de 200 L; Vía 7: flujo de 280 L; Vía 8: lavado de flujo hacia abajo; Vía 9: eluato; Vía 10: estándar de factor XIII.

Figuras 3A y 3B representan los resultados del Análisis de SDS-PAGE de fracciones recogidas del paso de cromatografía de interacción hidrofóbica de phenyl-Sepharose™. Vía 1: Estándares de peso molecular; Vía 2: fracción de eluato 1; Vía 3: fracción de eluato 3; Vía 4: fracción de eluato 4; Vía 5: fracción de eluato 6; Vía 6: fracción de eluato 7; Vía 7: fracción de eluato 8; Vía 8: fracción de eluato 9; Vía 9: fracción de eluato 10; Vía 11: estándares de peso molecular; Vía 12: fracción de eluato 11; Vía 13: fracción de eluato 12; Vía 14: agrupación de eluato; Vía 15: eluato de valor máximo de puesto; Vía 16: carga; Vía 17: flujo de; Vía 18: lavado; Vía 19: estándar de albúmina de suero bovino.

Figura 4 representa los resultados del Análisis de SDS-PAGE de fracciones recogidas de la elución de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Vía 1: Estándares de peso molecular; Vía 2: carga; Vía 3: flujo de; Vía 4: flujo de lavado de sal; Vía 5: forma preliminar; Vía 6: agrupación de eluato; Vía 7: forma preliminar; Vía 8: agrupación de eluato a dilución 1:2; Vía 9: estándar de albúmina de suero bovino; Vía 10: factor XIII humano recombinante estándar como aislado por el método de la figura 1.

Figuras 5A y 5B representan los resultados del Análisis de SDS-PAGE de fracciones recogidas del paso de intercambio de anión siguiendo IMAC. Vía 1: Estándares de peso molecular; Vía 2: carga-Q; Vía 3: fracción de eluato; Vía 4: fracción de eluato 2; Vía 5: fracción de eluato 3; Vía 6: fracción de eluato 4; Vía 7: fracción de eluato 5; Vía 8: fracción de eluato 6; Vía 9: estándar de albúmina de suero bovino; Vía 10: estándar de factor XIII humano recombinante; Vía 11: estándar de peso molecular; Vía 12: fracción de eluato 7; Vía 13: fracción de eluato 8; Vía 14: fracción de eluato 9; Vía 15: fracción de eluato 10; Vía 16: fracción de eluato 11; Vía 17: flujo de valor máximo de puesto; Vía 18: agrupación Q de eluato diluido; Vía 19: estándar de albúmina de suero bovino; Vía 20: estándar factor XIII humano recombinante.

Figura 6 representa los resultados del Análisis de cadena de plata de SDS-PAGE del producto final. Vía 1: Estándares de peso molecular; Vía 2: agrupación-q acondicionada (2,5 %); Vía 3: impregnar; Vía 4: concentrado (92,54 g/L); Vía 5: diafiltrado (10,6 g/L); Vía 6: diafiltrado diluido (5,3 g/L); Vía 7: dilución final (2,4 g/L); Vía 8: producto estérilmente filtrado (2,4 g/L); Vía 10: estándar factor XIII humano recombinante.

Descripción detallada de la invención

[0016] La presente invención proporciona métodos para el aislamiento de factor XIII altamente purificado usando fraccionamiento con un sustrato de afinidad de metal inmovilizado. Usando los métodos descritos, un factor XIII altamente purificado que es al menos 95 % puro respecto a las proteínas contaminantes se puede obtener más simplemente y de manera menos costosa que con métodos previos. Los métodos de la presente invención son particularmente adaptados para la purificación de factor XIII recombinante de un líquido biológico, incluyendo un líquido biológico que comprende un lisado de una célula huésped de levadura recombinante que produce factor XIII humano. En determinadas formas de realización particulares los métodos pueden adicionalmente proporcionar una composición que contiene menos del 2 % de agregados de proteína y/o menos del 1 % de factor XIII activado. Además, en una forma de realización particular de la invención las composiciones purificadas producidas por los métodos de la presente invención comprenden menos del 5 % de isómeros de carga de factor XIII. A diferencia de algunos métodos anteriores para la purificación de factor XIII no se requiere ninguna precipitación y/o paso de cristalización. (patente estadounidense n.º 5.612.456)

[0017] El término "factor XIII" como se utiliza en este caso significa una poliproteína de factor XIII que comprende el α_2 dímero, una poliproteína de factor XIII que comprende el α_2 β_2 tetrámero, u otras combinaciones de subunidades α y β siempre que poliproteína no demuestra actividad de factor XIII activado sustancial.

5 [0018] Según la presente invención, el factor XIII se purifica de una variedad de fluidos biológicos. Un "fluido biológico" como se utiliza en este caso es cualquier fluido derivado de o que contiene células, componentes celulares o productos celulares. Fluidos biológicos incluyen, pero no de forma limitativa, sobrenadantes de cultivo celular, lisatos celulares, lisatos de célula clarificados, extractos celulares, extractos de tejido, sangre, plasma y fracciones de las mismas. Lisatos celulares pueden ser hecho de células que naturalmente producen factor XIII en cantidades recuperables, tal como
10 células de placenta y similares. No obstante, lisatos y extractos de células típicos se obtienen a partir de células o líneas celulares que han sido genéticamente modificadas para producir factor XIII. Fluidos biológicos también pueden incluir medio de cultivo en el que ha sido segregado factor XIII por una célula que ha sido genéticamente modificada para expresar y segregar factor XIII. En una forma de realización particular de la presente invención el líquido biológico es un lisado o lisado clarificado obtenido de una célula de levadura que ha sido transformada con una secuencia de ácidos
15 nucleicos para producir factor XIII, aunque la célula puede ser cualquier célula genéticamente modificada. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para producir preparados que contienen significativamente menos de 200 a 300 ppm de proteína de levadura.

[0019] Además, como con métodos previos, los presentes métodos también eliminan factor XIII activado. En una forma
20 de realización particular de los presentes métodos una composición puede ser prevista que contiene no más del 1% de factor XIII activado y típicamente menos del 1%. En formas de realización determinadas del proceso, isómeros de carga de factor XIII que pueden estar presentes en una fracción de factor XIII pueden también ser eliminados.

[0020] Con la presente invención se ha descubierto que un sustrato de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
25 (IMAC) proporciona buenas propiedades aglutinantes para factor XIII humano recombinante y produce la eliminación de contaminantes encontrados en algunos procesos de purificación previos típicos, incluyendo un proceso de purificación aquí descrito. Sustratos de IMAC han sido encontrados para adicionalmente proporcionar el beneficio adicional de desalación de las fracciones enriquecidas para factor XIII recombinante y también significativamente reducir el volumen de carga para adicional procesamiento hacia abajo. Generalmente, IMAC aprovecha una afinidad de la molécula para
30 iones metálicos quelatados para separación. Muchas proteínas forman complejos con iones metálicos de transición tal como Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} . Elución de una proteína de tal complejo es típicamente realizada reduciendo el pH por debajo de 6, más típicamente reduciendo el pH a alrededor de 2 o 3, o manteniendo un constante pH y proporcionar un aumento en un ión de competencia, tal como imidazol, histidina o cloruro amónico. En la presente invención, el factor XIII es aparentemente débilmente adsorbido al ión de metal inmovilizado mientras la mayoría de proteínas contaminantes son
35 apretadamente enlazadas a la resina de columna. Factor XIII se eluye de la columna reduciendo la concentración de sal del tampón de elución sin la necesidad de la adición de un quelador o de disminuir el pH del tampón de elución. La fracción de factor XIII enriquecida eluida del paso de separación de IMAC puede ser suficientemente concentrada que puede ser necesario diluir la fracción de factor XIII enriquecida para prevenir precipitación. Selección del tampón de dilución depende del siguiente paso seleccionado en el proceso hacia abajo. En una forma de realización particular de
40 la presente invención un tampón Tris a alrededor de pH 7,6 hasta alrededor de pH 8.0 se usa para dilución.

[0021] En una forma de realización típica de la presente invención fraccionamiento de afinidad de metal inmovilizado se
45 combina con otros métodos de purificación de afinidad. En una forma de realización particular IMAC se combina con cromatografía de intercambio de anión y cromatografía de afinidad hidrofóbica mientras que mantiene el pH de la solución aproximadamente por encima de 7,0 que permite el enriquecimiento de factor XIII sin la necesidad de una precipitación y/o paso de cristalización. Un segundo paso de intercambio de anión puede también ser añadido al método de purificación. Aunque una forma de realización particular de la invención proporciona los diversos métodos de purificación de afinidad y pasos en un orden particular, no se requiere ningún orden particular de pasos para proporcionar una composición de factor XIII purificado de la presente invención. Un experto en la materia con la guía
50 proporcionada en la presente divulgación puede alterar el orden de uno o más métodos de fraccionamiento para conseguir un resultado similar.

[0022] Como se ha indicado anteriormente, células recombinantes y líneas celulares son típicas fuentes de factor XIII. Clones de ADNc de factor XIII humano y mamífero y producción de factor XIII en células recombinantes, que incluyen
55 bacterias, levadura y células de mamífero cultivadas han sido descritos. (Grundmann et al., solicitud de patente australiana publicada 69896/87; patente europea n.º EP 268 772 B1, y publicación de patente europea n.º WO 91/14780). Típicamente, las células huésped usadas para producir factor XIII incluyen levadura, tal como levadura panadera (*Saccharomyces cerevisiae*) y especies de *Pichia* y *Kluyveromyces*. Métodos para expresar secuencias de ADN clonadas se conocen en la técnica. Brevemente, una secuencia de ADN que codifica factor XIII operativamente enlazada a un promotor adecuado y secuencia del terminador en un vector compatible con la célula huésped elegida o
60 línea celular. El vector es luego insertado en la célula huésped y las células recombinantes resultantes se cultivan para producir factor XIII. Dependiendo de la célula huésped particular y el cassette de expresión utilizado, el factor XIII puede ser bien segregado de la célula o retenido en el citoplasma.

[0023] Cuando se usan células que no segregan factor XIII, las células se pueden centrifugar y recuperar la fracción
65

celular. Típicamente, centrifugado está a una velocidad moderada (p. ej., alrededor de 10,000 x g) o filtración (p. ej., microfiltración (MF)) puede ser usada. En un método descrito aquí microfiltración se utiliza para separar las células huésped del medio de cultivo y para lavar las células antes de lisis. El cultivo celular puede también ser acondicionado sin recogida de la fracción celular ajustando el pH a alrededor de 8,5 con un tampón (p. ej., Tris, y similares) y un agente bivalente quelante (p. ej., EDTA, y similares) y tratado para producir un cultivo celular acondicionado. En una forma de realización específica de la presente invención no se requiere recogida de la fracción celular y el cultivo celular acondicionado se procesa directamente para lisar las células. En cualquiera de los procesos las células son lisadas o rotas para liberar el contenido celular que incluye el factor XIII recombinante para formar un lisado crudo. Lisis se puede realizar por varios medios bien conocidos por el experto en la materia incluyendo la homogenización, sonicación, o solubilización de la membrana celular, y similares.

[0024] Cuando se trabaja con lisatos de célula crudos, que son posibles de contener niveles altos de proteasas, se prefiere minimizar el tiempo en el que el lisado está en una forma concentrada. Esto se puede conseguir fácilmente diluyendo rápidamente el lisado, típicamente en un diluyente fresco (alrededor de 2 °C hasta alrededor de 5 °C), tal como agua o un tampón apropiado. Dilución puede también ser requerida para reducir la conductividad del lisado para debajo que requerida para tratamiento hacia abajo. En general, el lisado será diluido alrededor 1 a 5 veces relativamente al líquido celular de inicio, pero la cantidad real de dilución será determinada por las características del lisado celular y el medio de cromatografía seleccionado para el siguiente paso en el proceso hacia abajo. En una forma de realización específica de la presente invención la conductividad se reduce por debajo de 4,4 mS/cm para asegurar capturar por un medio de intercambio de anión que se puede usar en un paso posterior en el proceso de purificación.

[0025] En un método de la presente invención dónde IMAC se combina con otros métodos de purificación de afinidad, el lisado de célula diluido es primero fraccionado por intercambio de anión, para producir una primera fracción enriquecida para factor XIII. Típicamente, el lisado de célula diluido se pasa sobre una columna que comprende medio de intercambio de anión a un pH de aproximadamente 7,2 hasta aproximadamente 8,2, y más típicamente a un pH mayor que alrededor de 7,5. Después de un paso de lavado, el factor XIII es fraccionado o eluido del medio de intercambio de anión usando un tampón de elución adecuado. Medio de intercambio de anión adecuado para este paso incluye, derivados de PEI, DEAE, QAE y Q de, por ejemplo, dextrano, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad, y similares. Resina DEAE STREAMLINE (Farmacia, Piscataway, N.J.) en una columna de cromatografía de lecho expandido es particularmente preferida para procesos dónde es necesario eliminar detrito celular y otro material del cultivo y lisis de células recombinantes. Un modificador de densidad que comprende un azúcar, tal como sacarosa, o glicerol (es decir, a una concentración de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 %) se puede incluir en el paso de lavado para asistir en el aclaramiento de sólidos y detrito celular de la columna antes de elución. Además, antes de fraccionamiento el modificador de densidad se puede lavar de la columna con una solución tamponada. Fraccionamiento del factor XIII para formar una primera fracción de factor XIII enriquecida puede usar un gradiente de sal gradual, pero típicamente un proceso de paso se utiliza para reducir el volumen de la fracción enriquecida para factor XIII en los pasos de proceso posteriores. En una forma de realización preferida se usa un gradiente de paso de un tampón de elución que comprende 20 mM Tris/80 mM Na₂ SO₄, pH 7,8.

[0026] La primera fracción de factor XIII enriquecida es posteriormente enriquecida por cromatografía de interacción hidrofóbica para formar una segunda fracción de factor XIII enriquecida. Medios cromatográficos adecuados incluyen una fase sólida derivatizada con fenilo, butilo, u grupos de octilo y resinas acrílicas. En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención fue descubierto que los medios derivatizados de fenilo permitieron para elución de la fracción de factor XIII enriquecida usando un tampón de sal inferior. También se descubrió que proteínas de levadura adicionales fueron quitadas usando los medios de cromatografía derivatizada de fenilo en comparación con un proceso de purificación usando unos medios derivatizados de butilo. El factor XIII adsorbido se puede eluir de la columna usando un gradiente de sal descendiente o un lavado de paso. Picos enriquecidos para factor XIII son agrupados, probados para análisis de actividad de factor XIII o concentración de proteína y forman una segunda fracción enriquecida para factor XIII.

[0027] La segunda fracción enriquecida para factor XIII es posteriormente purificada por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) como se ha descrito anteriormente. Se ha descubierto que la adición de IMAC en el proceso de purificación para factor XIII proporciona la eliminación de contaminantes de peso molecular inferior que han sido observados en otros procesos para la purificación de factor XIII. Por ejemplo, el proceso de la presente invención que comprende IMAC demuestra purificación mejorada de factor XIII cuando se compara con el proceso representado en la columna izquierda de las figuras 1A-1C. Además, IMAC fue encontrado para producir una fracción de factor XIII enriquecida muy concentrada que resultó en un volumen de carga reducido para tratamiento hacia abajo adicional. Para una fermentación de 100 l como demostrado aquí la reducción en el volumen de carga es típicamente del orden de alrededor de 30 veces.

[0028] En una forma de realización particular de la presente invención, un paso de cromatografía de intercambio de anión final se puede incluir para eliminar cualquier factor XIII activado y/o para separar cualquier isómeros de carga de factor XIII que puede estar presente en la tercera fracción de factor XIII enriquecida. La fracción de factor XIII enriquecida purificada final se puede eluir de la columna de intercambio aniónico usando un gradiente de sal en aumento o una elución de paso. Las fracciones de valor máximo son agrupadas, diluidas con una misma cantidad de agua purificada y se pueden acondicionar por la adición de, por ejemplo, 2,5 % (p/v) de sacarosa. Las fracciones

agrupadas luego son concentradas y el tampón se puede cambiar para producir un producto de fórmula final.

[0029] En los métodos descritos anteriormente las fracciones enriquecidas para factor XIII pueden ser filtradas antes de cada uno de los varios pasos de fraccionamiento. Filtración puede llevarse a cabo usando un filtro con un tamaño de poro de, por ejemplo, sobre 0,2 µm.

[0030] Pureza de las composiciones de factor XIII preparada según la presente invención se puede monitorear por medios convencionales. Siguiendo pasos de separación individuales, se pueden identificar fracciones de valor máximo por absorbancia a 280 nm. Factor XIII purificado se puede cuantificar por análisis de aminoácido, ensayo de actividad, y similares. Cada ensayo es bien conocido por el experto en la materia. Contenido de factor XIII activado se puede medir llevando a cabo ensayos de actividad con y sin tratamiento de trombina. Contaminación de preparación de factor XIII recombinante por proteína de célula huésped se puede evaluar por métodos inmunológicos, tal como inmunoensayo enlazado por enzima (ELISA), electroforesis en gel de poliacrilamida, y similares. Tales ensayos serán diseñados con niveles de sensibilidad adecuados para uso en la técnica farmacéutica.

Ejemplos

[0031] Los siguientes ejemplos se proveen meramente como ilustrativos de varios aspectos de la invención y no deberían ser interpretados para limitar la invención de ninguna manera.

[0032] Este ejemplo describe dos procesos usados para purificar factor XIII humano recombinante (rhFXIII) de una cepa *Saccharomyces cerevisiae* de levadura recombinante BJn-5-LA a una escala de 100 litros. Ninguno de los métodos descritos comprende una precipitación o paso de cristalización. Además los métodos no requieren el uso de anticuerpos o anticuerpos monoclonales específicos para factor XIII. Ambos métodos comprenden el uso de una combinación de métodos de fraccionamiento con interacciones de afinidad diferentes con factor XIII. En una forma de realización específica de la presente invención, un paso de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) fue usado y resultó en una mejora en la pureza del rhFXIII. Otro objetivo de los procesos fue probar un proceso modificado de corriente hacia abajo en la escala de 100 L. Los protocolos comprenden diferentes modificaciones a los procesos de fraccionamiento de corriente abajo para aumentar recuperación y pureza de rhFXIII en comparación con métodos previos. Resina de butyl-Sepharose™ fue usada como el medio cromatografía de interacción (HIC) hidrofóbico en un proceso descrito (mostrado en la figura 1). Este proceso fue también usado para producir el rFXIII estándar para comparación con otro proceso donde la fase sólida derivatizada de butilo fue sustituida por una resina de phenyl-Sepharose™. Uso del medio HIC derivado de fenilo permitió fraccionamiento en una concentración de sal inferior y proporcionó para criterio de fusión más-amplio para las fracciones de factor XIII enriquecidas. Un paso de cromatografía adicional fue también introducido en el proceso de purificación. Este paso adicional comprende fraccionamiento con un medio de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), que se efectuó después del paso de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La resina IMAC demostró buenas propiedades aglutinantes para rhFXIII y elución de factor XIII de la resina resultada en la eliminación de un contaminante de peso molecular inferior en experimentos de escala pequeña. La inclusión de este paso el proceso descrito también proporcionó el beneficio adicional de desalación de la muestra y significativamente redujo el volumen de carga para el paso de intercambio de anión final (una columna de Q-Sepharose™) de alrededor de 600 L hasta alrededor de 20 L. Globalmente, el proceso modificado trabajó exitosamente en la Escala de 100 l con una recuperación de producto de aproximadamente 45%. Un esquema de ambos procesos de purificación está provisto en las figuras 1A hasta 1C.

Material y métodos

Proceso de producción de 100 litros de fermentador:

[0033] Un inóculo fue preparado usando células recombinantes que expresan factor XIII de un banco de célula de trabajo. El proceso de producción fue realizado en un recipiente de 100 litros de fermentador. Un sistema informático fermentador múltiple fue usado para control en línea del proceso de fermentación. El consumo de oxígeno (OUR), índice de evolución de dióxido de carbono (CER) y cociente respiratorio (RQ) fueron determinados. Un medio de cultivo de levadura a base de glucosa fue esterilizado por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. El fermentador fue inoculado con una segunda fase de cultivo de tanque de semilla. La alimentación de glucosa fue esterilizada por filtro y preparada en lotes. Formación de espuma fue controlada por adición manual de un reactivo antiespumante. Después del tiempo de proceso la alimentación de glucosa fue terminada y el pH fue aumentado usando una solución de amoníaco. El cultivo fue luego enfriado antes de la transferencia para operaciones de corriente abajo.

Operación de corriente abajo de factor XIII humano recombinante:

[0034] Cosecha de fermentador fue recogida y la conductividad fue medida. La cosecha fue acondicionada ajustando a pH 8,5 con 3 M tris/60 mM EDTA. La cosecha acondicionada fue luego homogeneizada por un único paso a través de un homogeneizador a alta presión. El homogeneizado, a la salida del homogeneizador, fue enfriado a aproximadamente 15 °C. El proceso de homogenización resultó en la producción de aproximadamente 108 L de homogeneizado crudo. La cantidad de rhFXIII en el homogeneizado fue medida (ensayo de actividad) a 1,6 g/L dando un total de aproximadamente 172,8 g para esta particular ejecución.

Cromatografía de lecho expandido:

5 [0035] Fraccionamiento de intercambio de anión de cromatografía de lecho expandido fue realizada a temperatura ambiente usando una columna STREAMLINE 200 Pharmacia embalada con resina de DEAE STREAMLINE (Pharmacia). Una altura de lecho regulada de 42 cm y un volumen de columna (CV) de 13,2 L (es decir, diámetro de columna 20 cm, área en corte transversal 314 cm²) fueron conseguidas. Inmediatamente después de embalaje, la columna fue lavada con 4 volúmenes de columna (CV) o sobre 80 L de 10 mM NaOH en el modo de flujo descendente y almacenado durante toda la noche.

10 [0036] El homogeneizado fue diluido con dos volúmenes de agua dando como resultado en 2 lotes de 162 L de material de "carga" con una conductividad de 3,9 mS/cm. Una conductividad por debajo de 4,4 mS/cm fue requerida para captura exitosa de rhFXIII en la resina STREAMLINE. El ensayo de actividad dio una concentración de 0,6 g/L (100 g total) en el lote 1 y 0,5 g/L (81 g total) en el lote 2 que da un total de aproximadamente 181 g rhFXIII. La concentración real de rhFXIII obtenida con una ejecución particular varió y ajuste de la conductividad para cada lote fue hecho según fue necesario.

15 [0037] La resina STREAMLINE fue higienizada usando 2 CV de 1 M NaOH a un índice de flujo de 30 L/h (95,5 cm/hora índice de flujo lineal) en el modo de flujo descendente seguido de 10 CV de agua purificada a 70 L/h (222,9 cm/hora índice de flujo lineal). La columna fue luego lavada con 2 CV de 20 mM tris/1M Na₂ SO₄, pH 7,8 seguido de 8 CV de 20 mM Tris, pH 7,8 en el modo de flujo descendente. Conductividad y pH del flujo de tampón fueron medidos a ser 2,0 mS/cm y 7,4 respectivamente. La columna fue luego equilibrada con 20 mM Tris, pH 7,8 en el modo de flujo ascendente, ajustando el nivel de flujo para conseguir expansión de lecho de aproximadamente 2 pliegues a aproximadamente 2,2 pliegues. La "carga" fue bombeada a través de la columna STREAMLINE en el modo de flujo ascendente usando una bomba peristáltica que resulta en una expansión del lecho de 2,2 pliegues (aproximadamente 20 L/h 95,5 cm/hora índice de flujo lineal). Tiempo total de carga fue aproximadamente 10 h y el pH de la carga fue controlado periódicamente durante carga para asegurar que no cae debajo de 7,2. Muestras del flujo de fueron tomadas cada 40 L para ensayos de actividad posteriores.

20 [0038] Carga fue seguida de 7 CV lavado de flujo ascendente con 20 mM tris/25 mM Na₂ SO₄ /2 % sacarosa (p/v), pH 7,8 hasta que el flujo apareció claro. El índice de flujo tuvo que ser gradualmente aumentado para mantener la expansión de lecho de 2,2 pliegues. Luego se dejó asentar el lecho y se dejó durante toda la noche. La columna fue lavada con 7 CV de 20 mM tris/25 mM Na₂ SO₄, pH 7,8 en el modo de flujo descendente a un índice de flujo de 50 L/h (159,24 cm/hora índice de flujo lineal) antes de elución. La elución se efectuó usando una bomba peristáltica aplicando 4 CV de tampón de elución 20 mM tris/80 mM Na₂ SO₄, pH 7,8. Ningún detector fue usado para identificar el valor máximo de elución y en cambio todos del volumen de elución (50 L) fueron recogidos. Un ensayo de actividad posterior reveló una concentración de rhFXIII de 3,2 g/L (159 g total) en el eluato, que corresponde a una recuperación de 88 % (tabla 1). La figura 2 representa el gel de SDS-PAGE de las fracciones de cromatografía de lecho expandidas. La fracción de eluato fue almacenada a 4 °C durante toda la noche.

30 40 Tabla 1. Mediciones de actividad FXIII para cada volumen de flujo.

Muestra	Actividad (g/L)
Carga streamline (324 L)	0,57 (181 g)
Flujo streamline (@ 80 L)	0,01
Flujo streamline (@ 160 L)	0,01
Flujo streamline (@ 200 L)	0,01
Flujo streamline (@ 240 L)	0,025
Elución streamline (80 mM Na ₂ SO ₄)	3,2 g/L (159 g)

Cromatografía de interacción hidrofóbica:

45 [0039] Cromatografía de interacción hidrofóbica se efectuó a temperatura ambiente usando una columna Pharmacia BPG 300 con un volumen de lecho embalado de 12 L (es decir, 30 cm diámetro de columna, área en corte transversal 707 cm²) phenyl-Sepharose™ en una Pharmacia 6 mm Sistema de bioproceso. La resina era fresca, pero fue agrupada de diferentes lotes (Pharmacia). La primera fracción de factor XIII enriquecida (el eluato DEAE STREAMLINE) fue diluida con un mismo volumen de 0,5 M Na₂ SO₄ y filtrada a través de un filtro de 0,45/0,2 µm (Sartobran P). La columna de phenyl-Sepharose™ fue higienizada con 2 CV de 1 M NaOH a 30 L/h (42,43 cm/hora índice de flujo lineal) seguido de lavado con 5 CV agua. La columna fue luego equilibrada con 7 CV de 20 mM Tris / 250 mM Na₂ SO₄, pH 7,8. Carga de 100 L de eluato acondicionado STREAMLINE se efectuó a un índice de flujo de 71 L/h (100,42 cm/hora

índice de flujo lineal). Después de un lavado de 5 CV con 20 mM Tris/250 mM Na₂ SO₄, pH 7,8, la columna fue eluida con un gradiente de sulfato de sodio de disminución de 20mM Tris, 200 mM Na₂ SO₄, pH 7,8 a 5 mM Tris, aproximadamente 14 mM Na₂ SO₄; pH 7,8 sobre 8,8 CV. El valor máximo de elución fue recogido en 12 fracciones de aproximadamente 9 L, empezando recogida a absorbancia UV > 0,1 y parando recogida a absorbancia UV < 0,1 así el material de post-valor máximo que se eluye con 5 mM Tris solo fue evitado. Todas las fracciones a través del valor máximo principal fueron probadas para análisis antes de ser agrupadas. Muestras a través de la elución fueron analizadas por SDS-PAGE (ver Figura 3).

[0040] El volumen de elución agrupado (la segunda fracción de factor XIII enriquecida) fue alrededor de 105 L, que fue medido a 1,3 g/L rhFXIII (137 g total) por ensayo de actividad y 1,1 g/L (116 g total) por A₂₈₀. El rendimiento de recuperación basado en el resultado de ensayo de actividad fue 87 % y basado en A₂₈₀ medición fue 73 %. El eluato agrupado fue filtrado a través de un filtro de 0,45/0,2 µm en bolsas "Flexboy" y almacenado a + 4 °C durante 4 días. Figura 3 representa el gel de mancha de plata SDS de las muestras de elución de phenyl-sepharose™.

15 Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC):

[0041] Cromatografía se efectuó a temperatura ambiente usando una columna Pharmacia BPG 200 con un volumen de lecho embalado de 4,7 L (es decir, 20 cm diámetro de columna, área en corte transversal 314 cm², altura de lecho 15 cm) en una Pharmacia 6 mm Sistema de bioproceso. La resina usada fue flujo rápido de Sepharose™ quelante (Pharmacia). La resina fue lavada con 5 CV agua para eliminar conservante antes de ser cargado de 3,5 CV de 250 mM Ni₂ SO₄, pH 7,8, a 31 L/h (98,7 cm/hora índice de flujo lineal). La columna fue luego equilibrada con 3 CV de 20 mM tris/0,5 M Na₂ SO₄, pH 7,8, a 31 L/h para eliminar cualquier contaminante y níquel de exceso antes de ser equilibrado con 3 CV de 50 mM tris/100 mM Na₂ SO₄, pH 7,8, a 31 L/h. La agrupación de eluato de columna de fenilo (105 L) fue cargada sobre la columna a una velocidad de flujo de 31 L/h. Lavado de columna se efectuó bombeando 1 CV de 50 mM tris/250 mM Na₂ SO₄, pH 7,8 a un índice de flujo de 31 L/h. Factor XIII fue eluido usando 50 mM Tris, pH 7,8, y el valor máximo de elución fue recogido tan pronto como el rastro UV había surgido sobre línea de base. El volumen de elución total (la tercera fracción de factor XIII enriquecida) fue 8 L, que fue inmediatamente diluido a 20L con 50 mM Tris, pH 7,8, para prevenir precipitación, y almacenado durante toda la noche a + 4 °C.

[0042] El eluato diluido (volumen 20 L) fue medido a 5,6 g/L rhFXIII (112 g total) por A₂₈₀. El rendimiento de recuperación basado en el A₂₈₀ resultado fue 96,6 %. Figura 4 representa el gel de mancha de plata SDS de las muestras de cromatografía IMAC. Muestras de eluato IMAC fueron evaluadas para níquel residual (RSSL Pharma, Reading UK) y se encontró que tienen 0,84 níquel de ppm (tabla 2).

35 Tabla 2. Contenido de níquel de muestras en todo el proceso

Muestra	Concentración de níquel		Concentración FXIII			Proporción molar / Ni:FXIII
	ppm	µM	ppm	mg/ml	µM	
Producto final	< 0,02	< 0,34	2400	2,4	28,80	< 0,012
Agrupación Q-eluato	< 0,02	< 0,34	1000	1	12,00	< 0,012
Eluato IMAC	0,84	14,30	5600	5,6	67,20	0,213
Residuos de níquel	1700	28,93 mM	N/A			
Ejecución de producto final 4	0,02	0,34	12000	12	144,00	0,002

Cromatografía de intercambio de anión:

[0043] La resina de Q-Sepharose™ usada en este paso ha sido usada previamente. Fue embalado en una columna de Pharmacia BPG 300 con un volumen de lecho embalado de 10,6 L (15 cm diámetro de columna, área en corte transversal 707 cm², altura de lecho 15 cm). La columna fue higienizada con 2 CV de 1 M NaOH a un índice de flujo de 30 L/h (42,43 cm/h índice de flujo lineal). La columna fue luego lavada con 5 CV de agua purificada, seguido de 3 CV de 100 mM Tris, pH 7,5 y 2 CV de 20 mM tris/0,5 M Na₂ SO₄ pH 7,5 para cargar la resina con contraiones. La conductividad fue luego reducida a < 3,0 mS/cm lavando la columna con 5 CV de 20 mM Tris, pH 7,5. El valor real del flujo de tampón fue medido a ser 1,46 mS/cm. El eluato diluido IMAC fue suplementado con EDTA a una concentración final de 1 mM para complejar cualquier ión de Ni residual presente en el eluato IMAC. El material de carga fue luego filtrado a través de un filtro de 0,45/0,2 µm (Sartopore 2) antes de ser cargado sobre la columna. Después de carga a un índice de flujo de 71 L/h (100,42 cm/h índice de flujo lineal), la columna fue lavada con 5 CV 20 mM Tris, pH 7,5.

[0044] Elución de rhFXIII se efectuó aplicando una elución de paso con 20 mM tris/37,5 mM Na₂ SO₄, pH 7,5 a una velocidad de flujo de 71 L/h. Un total de 65 L fue recogido como prevalor máximo con el valor máximo principal siendo recogido en fracciones al inicio del rastro UV en el Sistema de bioproceso alcanzado OD₂₈₀= 0,7. Un total de 20 fracciones (10 fracciones de aproximadamente 9 L, 3 fracciones de aproximadamente 4 L, 7 fracciones de aproximadamente 2 L) fueron recogidas y almacenadas durante diferentes días a + 4 °C mientras Análisis de HPLC de cambio aniónico se efectuó en las fracciones. Del análisis de HPLC todas las fracciones mostrando 100 % de pureza (fracciones 1 hasta 11 inclusiva) fueron agrupadas para dar un volumen total de 90 L. Figura 5 muestra un gel de mancha de plata de SDS-PAGE de la carga, fracciones de valor máximo, valor máximo y agrupación de eluato. La fracción de valor máximo contiene bandas de peso molecular significativamente inferiores, que confirma la eficacia de purificación de este paso. La agrupación Q-eluato (volumen 90 L) fue medida a 0,88 g/L rhFXIII (79 g total) por A₂₈₀. El rendimiento de recuperación basado en el A₂₈₀ resultado fue 75 %. Muestras de la Q agrupación de eluato fueron evaluadas para níquel residual y se encontraron que tenían < 0,02 níquel de ppm. (ver tabla 2 arriba).

Ultra-diafiltración:

[0045] En el presente ejemplo un 30 kDa casete de membrana de corte (MWCO) de peso molecular proporcionando una área total de membrana de 0,6 m² fue usado para diafiltración. Brevemente, el eluato del paso de cromatografía de Q-Sepharose™ fue diluido con un mismo volumen de agua purificada para reducir la concentración de sal (Na₂ SO₄). La agrupación de eluato diluida fue luego acondicionada añadiendo 25 % (w/v) sacarosa a una concentración final de 2,5%, dando un volumen total de 200 L. La alimentación fue bombeada a través de una bomba peristáltica en un depósito de 10 L enfriado a través de un filtro de 0,45/0,2 µm en un depósito enfriado. Un vez que el depósito fue rellenado, concentración fue comenzada aplicando una presión de entrada de 3 bar (presión de salida 0 bar) y retornando el retenido en el depósito de 10 l.

[0046] El material fue concentrado de 200 L a 8 L (8,54 g/L por A₂₈₀) y fue tampón intercambiado por ocho volúmenes de un tampón de formulación final con 20 mM histidina y 4,25 % (p/v) sacarosa pH 8,0. El material diafiltrado (7,2 L) fue quitado del aparato y almacenado durante toda la noche a + 4 °C.

Formulación final y análisis:

[0047] La fracción concentrada de rhFXIII diafiltrada fue diluida con un mismo volumen de tampón de formulación (20 mM histidina, 4,25 % (p/v) sacarosa, 0,02 % (v/v) polisorbato, pH 8,0). A₂₈₀ medición resultó en una concentración calculada de 5,4 g/L. La concentración deseada fue alrededor de 2,5 g/L así el material fue además diluido con 17,4 l tampón (20 mM histidina, 4,25 % (p/v) sacarosa, 0,01 % (v/v) polisorbato pH 8,0). La concentración final medida por A₂₈₀ fue 2,4 g/L. El material fue luego estérilmente filtrado a través de un filtro de 0,22 µm en varias alícuotas y almacenado a - 20 °C. Figura 6 representa el resultado de un análisis de mancha de plata de SDS-PAGE del producto final. El concentrado diafiltrado fue analizado para la presencia de rhFXIII activado y mostró el nivel muy bajo de 0,19 %. La presencia de agregados fue medida por SEC-HPLC y demostró un nivel muy bajo de 0,05 % (p/p).

[0048] La pureza del producto final analizado en el intercambio de anión (AIEX) HPLC mostró casi 100 % de pureza, aunque contaminantes de peso molecular grandes eran todavía visibles en el gel de mancha de plata. Como el gel fue sobrecargado con aproximadamente 70 µg de proteína no estaba claro si aquellas bandas fueron artefactos o contaminantes reales.

[0049] El proceso para purificar rhFXIII ha funcionado exitosamente a escala de 100 l con recuperación óptima y pureza de producto final. El uso de la resina de phenyl-Sepharose™ en vez de la resina de butyl-Sepharose™ tiene la ventaja de operar este paso a una concentración de sulfato de sodio inferior y proporcionó un criterio de fusión más robusto, donde el valor máximo entero pudo ser recogido cuando el A₂₈₀ alcanzó 0,1. Como previsto una mejor recuperación que en la resina de butilo fue conseguida, es decir, 87 % en comparación con 82 % y 74 % en la ejecución de resina de butilo. La introducción de IMAC como un paso de fraccionamiento adicional ha demostrado ser exitoso, ambos en cuanto a recuperación de producto al igual que purificación. Los resultados del gel PAGE (Figura 4) demostró la eliminación de bandas de peso molecular inferiores. Otra ventaja fue la elución de rhFXIII concentrado de este paso, que simplificó los siguientes pasos de proceso inmensamente ya que el volumen a ser cargado sobre los medios de intercambio de anión (Q-Sepharose™) fue reducido de 600 L a 20 L. El paso de cromatografía de Q-Sepharose™ fue ejecutado bajo el mismo protocolo como todas las ejecuciones precedentes de 100 L y mostró buena reproducibilidad. La fusión de fracciones de elución fue basada en resultados de HPLC. El protocolo se puede modificar de manera que el valor máximo de elución es recogido basado en A₂₈₀ de fracciones, ya que todas las ejecuciones de cromatografía de Q-Sepharose™ de las ejecuciones pasadas no-GMP han mostrado el mismo perfil de elución. Análisis de HPLC de la agrupación de elución de Q-Sepharose™ mostró cerca de 100 % de pureza de fhFXIII.

[0050] El paso final de ultrafiltración ha sido problemático con el goteo de flujo considerablemente cuando formación de agregados ocurrió durante el curso de la filtración. Este fenómeno fue típicamente sólo visto con las operaciones de escala más grande (100 L) y no con purificaciones de escala de LAB más pequeñas. Para evitar formación de

5 agregados, el material fue diluido con un mismo volumen de agua antes de concentración. Este, no obstante, no tuvo un efecto en impregnar índice de flujo, que goteó rápidamente con el tiempo como se ha visto previamente. Análisis final de producto usando HPLC de exclusión de tamaño demostró la presencia de un nivel extremadamente bajo de agregados (0,05% (p/p); tabla 3), que indicó que cualquier agregado que puede haber estado presente no era la razón de flujo de impregnación bajo. La caída fuerte en flujo no presenta un problema para operaciones de escala de fabricación ya que la área de superficie de la unidad de filtración puede ser aumentada.

Tabla 3. Análisis final de producto.

Producto final	FXIII 2,4 mg/ml (A ₂₈₀)	Volumen 32,4 L	Total FXIII 77,76 g
	FXIII 2,8 mg/ml (actividad)	Volumen 32,4 L	Total FXIII 90,7 g
FXIII Activado		0,0121 mg/ml (actividad)	0,019 %
Agregados			0,05 %
Producto final filtrado	FXIII 2,4 mg/ml (A ₂₈₀)	Volumen 35,6 L	Total FXIII 74,64 g

10 [0051] En conjunto, la calidad del producto final ha sido mejorada y muestra niveles mucho más bajos de agregados y rhFXIII activado. El proceso parece ser robusto y adecuado para crecimiento en escala.

15 [0052] Los ejemplos precedentes se proveen para ilustrar, pero no para limitar, el alcance de las invenciones reivindicadas. Otras variantes de las invenciones serán fácilmente claras para los técnicos en la técnica y abarcadas por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la purificación del factor XIII a partir de un líquido biológico comprendiendo el paso de fraccionamiento del líquido biológico por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), en el que antes del fraccionamiento por IMAC, el líquido biológico se fracciona por fraccionamiento de intercambio de aniones para producir una primera fracción enriquecida en el factor XIII y comprendiendo además el fraccionamiento de la primera fracción enriquecida en el factor XIII por fraccionamiento por interacción hidrofóbica antes del fraccionamiento por IMAC.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, comprendiendo además fraccionamiento de intercambio de aniones después del IMAC.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el líquido biológico es un lisado celular.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que el lisado celular es un lisado de célula de levadura recombinante.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el factor XIII es un factor XIII recombinante.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el factor XIII recombinante es factor XIII recombinante humano.
- 20 7. Método según la reivindicación 1, en el que el fraccionamiento de intercambio de aniones comprende el uso de un medio cromatográfico derivatizado con DEAE o QAE.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el fraccionamiento por interacción hidrofóbica comprende el uso de un medio cromatográfico derivatizado con fenilo, butilo o grupos de octilo.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, en el que el medio cromatográfico se derivatiza con grupos de fenilo.
10. Método según la reivindicación 1, en el que el fraccionamiento por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado comprende el uso de un medio cromatográfico cargado con Cu^{2+} , Zn^{2+} o Ni^{2+} .
- 30 11. Método según la reivindicación 10, en el que el medio de cromatografía está cargado con Ni^{2+} .

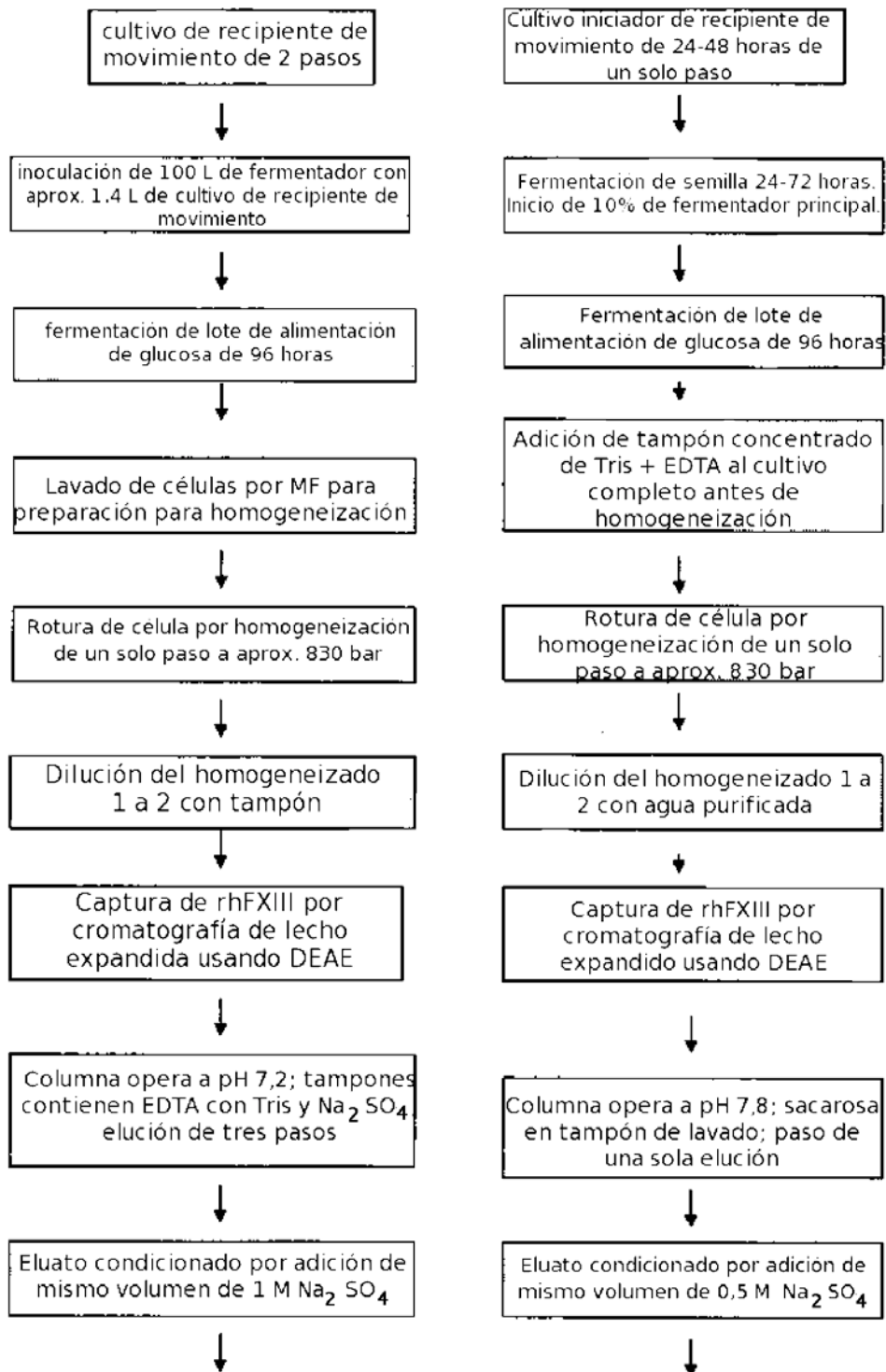


Figura 1A

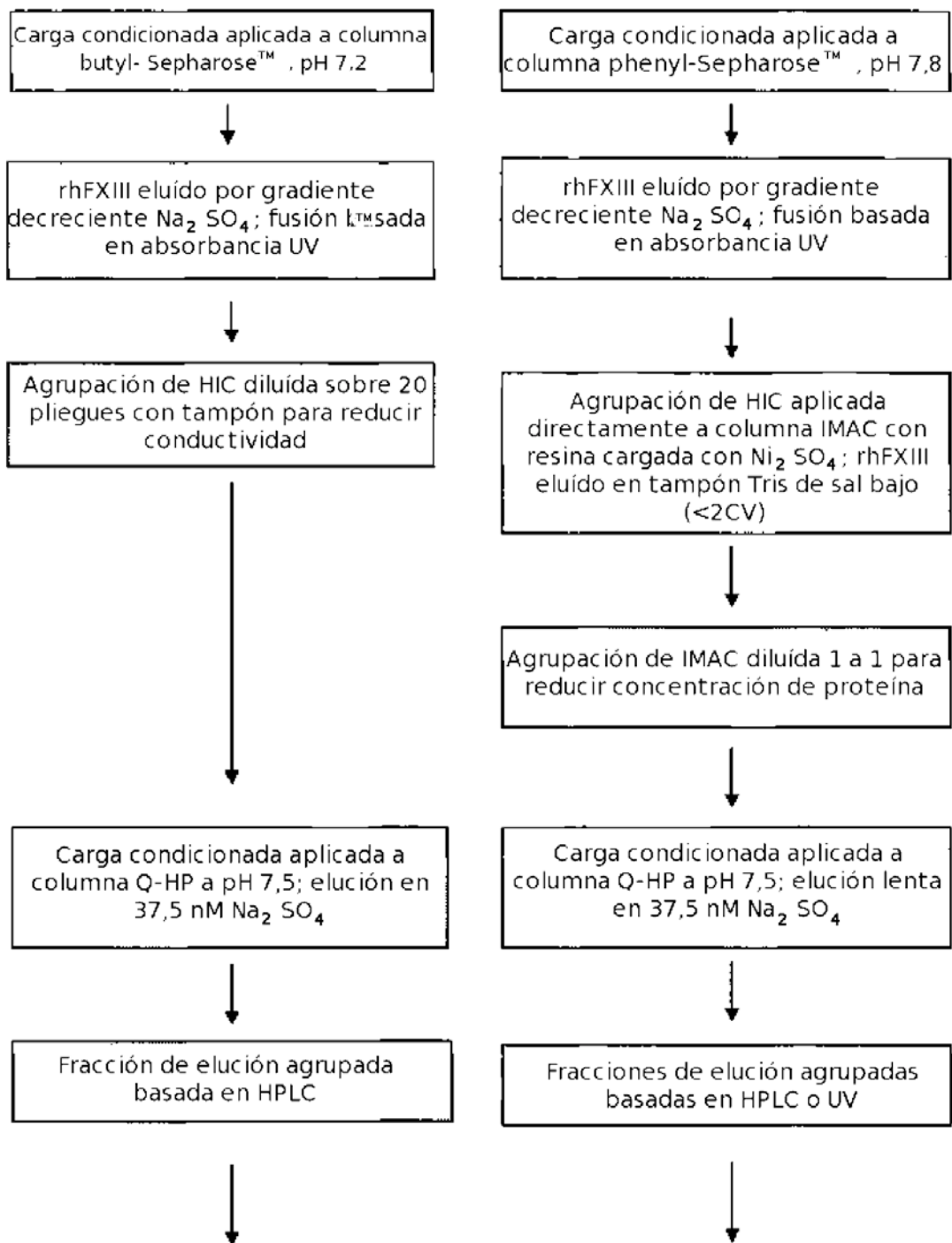


Figura 1B

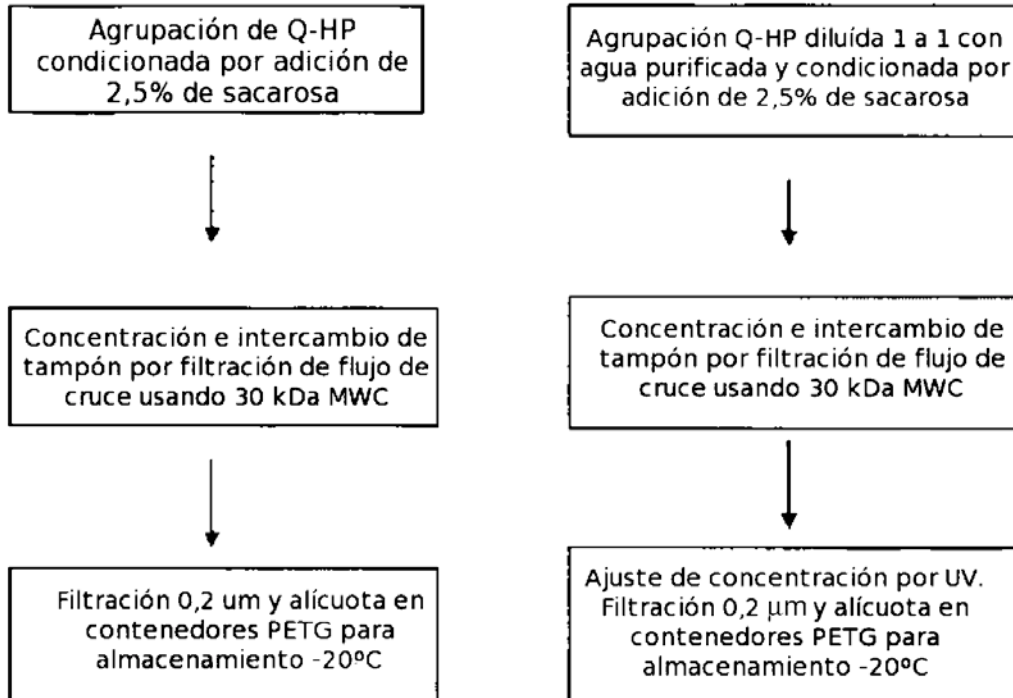


Figura 1C

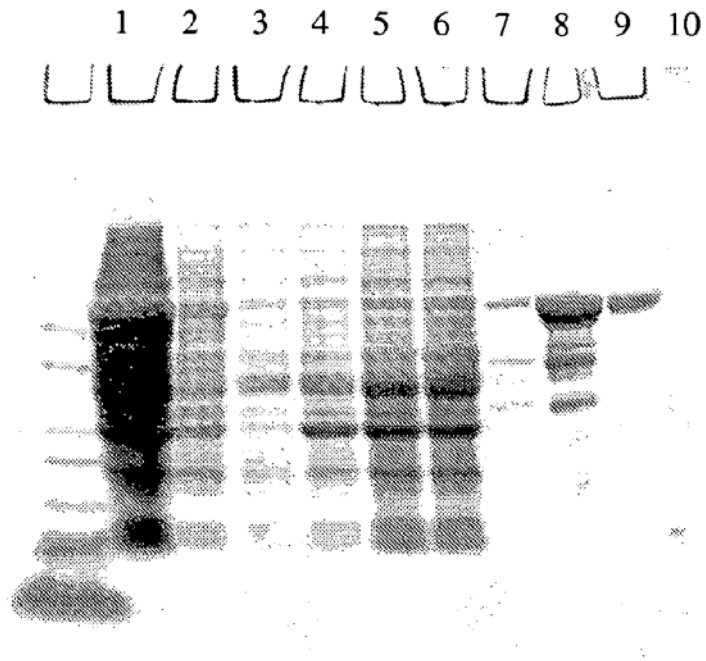


Figura 2

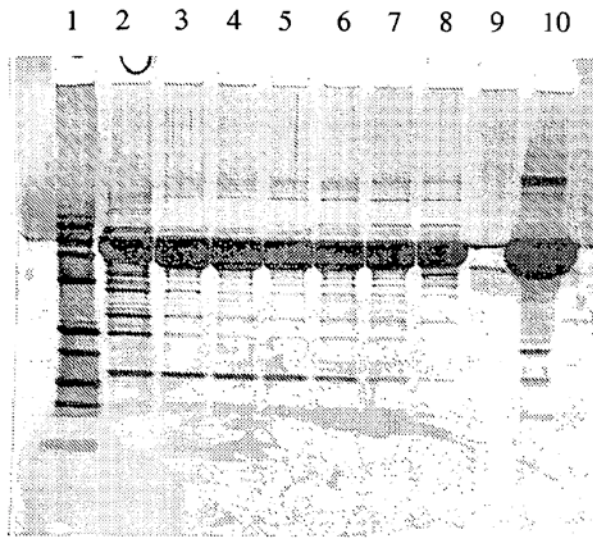


Figura 3A

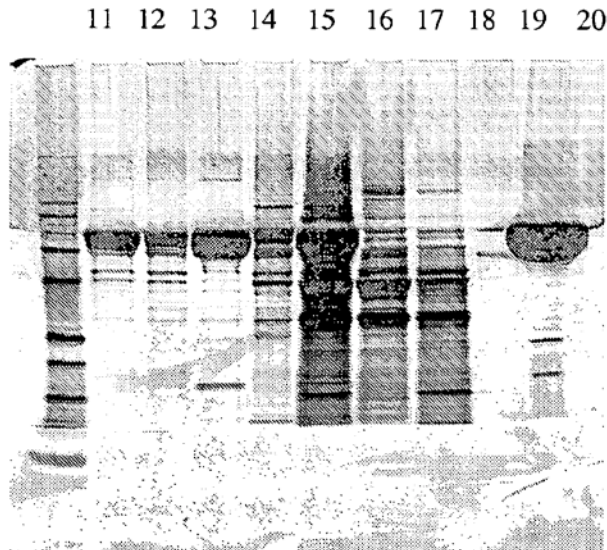


Figura 3B

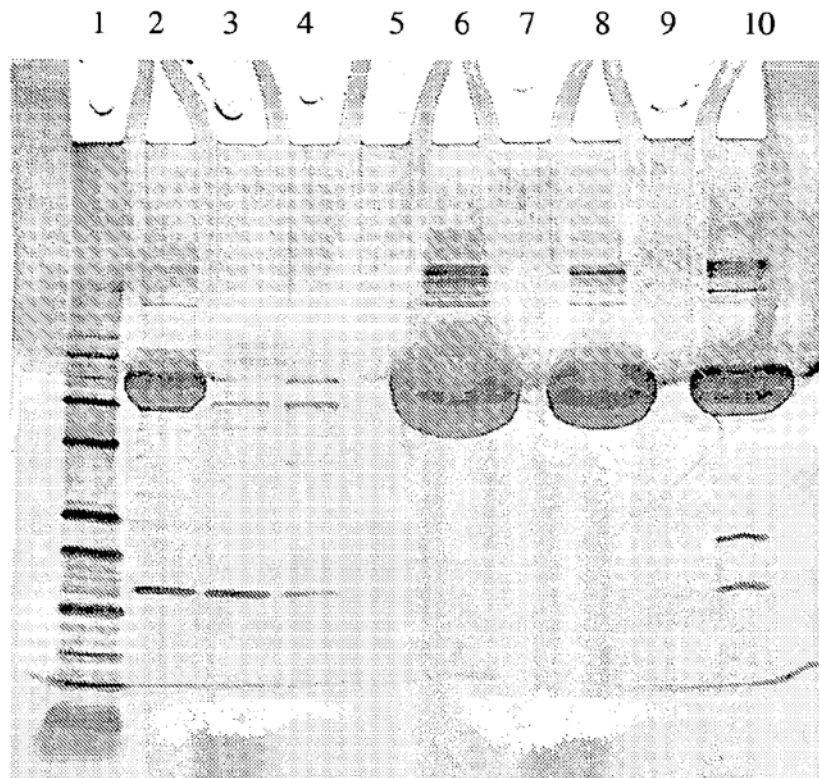


Figura 4

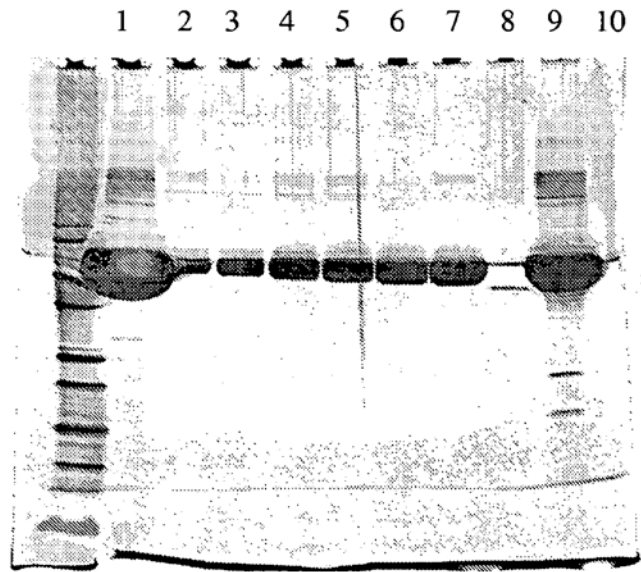


Figura 5A

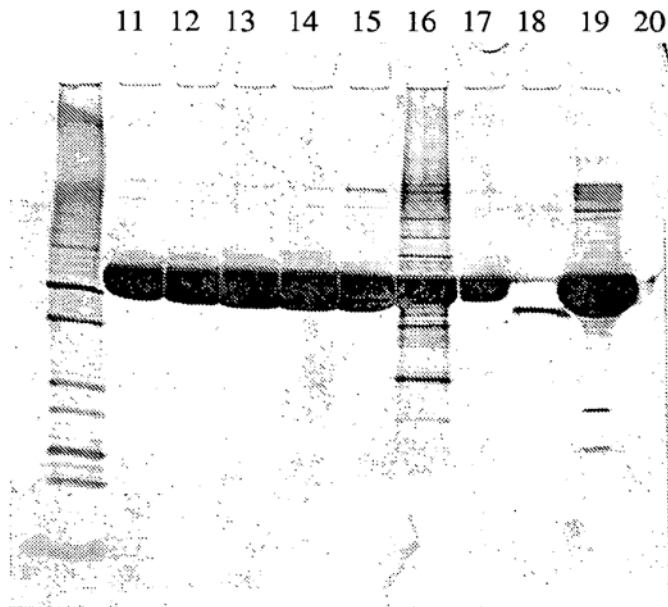


Figura 5B

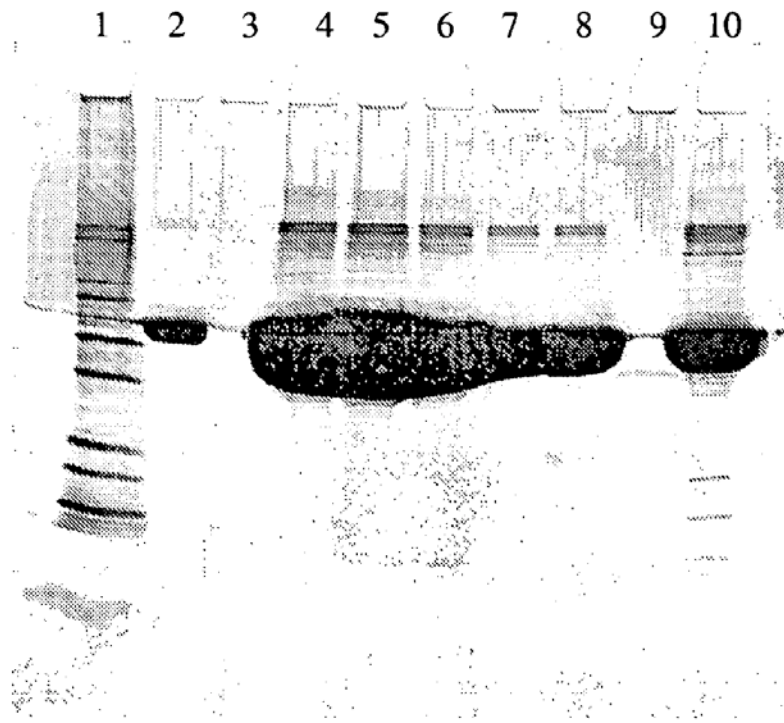


Figura 6