

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 613**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09769279 .2**
96 Fecha de presentación: **24.06.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2300497**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Un procedimiento para purificar el factor de coagulación VIII**

30 Prioridad:
24.06.2008 EP 08158893
24.06.2008 US 129402 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:
BORGVALL, CARIN;
ERICSSON, ULRIKA;
GILLJAM, GUSTAV;
JERNBERG, MATS y
WINGE, STEFAN

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 613 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

Un procedimiento para purificar el factor de coagulación VIII

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar el factor de coagulación VIII (abreviado FVIII) y a una fracción que contiene FVIII que puede obtenerse mediante el procedimiento de la invención.

5 **Antecedentes de la invención**

La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que alteran la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación de la sangre. En su forma más habitual, la hemofilia A, hay una deficiencia en el factor de coagulación FVIII. La hemofilia A aparece en aproximadamente 1 de cada 5.000-10.000 nacimientos de niños varones. La proteína FVIII es un cofactor fundamental en la coagulación de la sangre con propiedades multifuncionales. La deficiencia en FVIII puede tratarse con concentrados derivados del plasma del FVIII o con FVIII producido de modo recombinante. El tratamiento con concentrados de FVIII ha conducido a una vida normalizada para los pacientes con hemofilia. Históricamente, la hemofilia A se ha tratado con FVIII procedente de plasma de sangre humana. En el plasma sanguíneo, bajo condiciones normales, la molécula de FVIII siempre está asociada con su cofactor, el factor de von Willebrandt (vWf), que estabiliza la molécula de FVIII frente a diferentes formas de degradación.

15 Los productos de FVIII derivados del plasma aparecen en el mercado con diferentes purezas y con cantidades mayores o menores de vWf presentes. De modo habitual, los productos con baja cantidad de vWf contienen albúmina humana añadida y/u otros estabilizantes, incluyendo una mayor concentración de sales para estabilizar la molécula de FVIII. Los procedimientos usados para purificar el FVIII normalmente consistían en una combinación de diferentes procedimientos de precipitación, tales como la crioprecipitación, la precipitación con hidróxido de aluminio, etc., y etapas de cromatografía, principalmente etapas de intercambio iónico, de afinidad y de filtración en gel.

20 Para mejorar los productos de FVIII se ha empleado la cromatografía de afinidad, que elimina de modo eficaz los contaminantes hasta alcanzar un alto grado de pureza del FVIII, incluyendo la posibilidad de reducir también el vWf (Farrugia et al., *Biotechnology and plasma fractionation industry, The impact of advances in the production of coagulation FVIII*, *Biotechnology*, vol. 3, nº 1, febrero de 1993). La desventaja de la cromatografía de inmunoafinidad es que es relativamente cara, y que los anticuerpos monoclonales usados como ligandos de afinidad son de origen animal.

25 A mediados, se produjeron algunas transmisiones de virus asociadas a los productos de FVIII derivados de plasma. Aunque este problema se resolvió mediante el uso de etapas de reducción de virus específicas, este fue el punto de partida del desarrollo de productos de FVIII recombinantes (rFVIII). En la década de los 90 se comercializó el primer producto de rFVIII y, hasta la fecha, existen tres productos de rFVIII diferentes (dos moléculas de longitud completa y una molécula con el dominio B deletado en la que una parte inactiva de la molécula de FVIII se ha deletado para aumentar la productividad de la célula hospedante (Eriksson et al., *The manufacturing process for B-domain deleted recombinant FVIII*, *Seminars in Hematology*, vol. 38, nº 2, supl. 4 (abril), 20001: pp. 24-31)) con un alto grado de pureza (todos sin vWf).

30 Los procedimientos de purificación usados para purificar el rFVIII fueron una combinación de diferentes técnicas de cromatografía (ref. Bhattacharyya et al., artículo de revista: *Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies"*, *CRIPS*, vol.4, nº 3, julio-septiembre de 2003). Una de ellas fue la técnica de inmunoafinidad conocida (aunque hay productos que resuelven esto, por ejemplo, con afinidad de péptidos (Kelly et al., *Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of FVIII*)) o un fragmento de anticuerpo derivado de levadura (resina de afinidad de FVIII VIIISelect - GE HealthCare, nº de catálogo 17-5450, que actualmente está introduciéndose en el mercado), tal como se usan para el FVIII plasmático.

35 Puesto que el vWf está ausente en todos los productos de rFVIII, deben tomarse ciertas medidas para estabilizar la molécula de FVIII frente a la pérdida de actividad (agregación, proteasas, adsorción superficial, etc.). En uno de los productos se añade un agente quelante (EDTA, etc.) para proteger al FVIII frente a la degradación de metaloproteasas (documento US-A-5.831.026). La adición de albúmina, aprotinina, insulina o incluso la coexpresión de FVIII con vWf (y eliminarlo posteriormente en el ciclo de purificación) son estrategias que se han realizado para aumentar la estabilidad de la molécula de rFVIII (ref. Bhattacharyya et al., artículo de revisión: *Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies"*, *CRIPS*, vol.4, nº 3, julio-septiembre de 2003).

Otra estrategia (para mantener el procedimiento exento de agentes quelantes y aditivos de mamífero) se describe en el documento EP-A-1.707.634, en el que una combinación de cantidades mayores de sales contribuye a la estabilidad y la alta recuperación del producto de rFVIII (Wang et al., *Coagulation FVIII, structure and stability*, *International Journal of Pharmaceuticals*, 259 (2003), 1-15). Sin embargo, esta técnica tiene ciertas desventajas.

Por ejemplo, el contenido de sales relativamente alto hace que no sea adecuado procesar directamente en un intercambiador iónico sin dilución (y la posible desestabilización, Parti et al., In vitro stability of recombinant FVIII, Haemophilia (2000), 6, 513-522, Biotechnology and Bioengineering, vol. 87, nº 3, 5 de agosto, 2004).

5 El documento WO-A-2009/007451 describe un procedimiento de purificación del FVIII que emplea una resina de modo mixto o multimodal. El procedimiento de purificación se basa en poner en contacto la proteína de FVIII con una resina de modo mixto o multimodal que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente, y eluir dicha proteína de FVIII con un tampón de elución que contiene al menos 1,5 M de sales y al menos el 40 % (en p/v) de etilenglicol, propilenglicol o sus mezclas, e iones de calcio.

10 El documento EP-A-1707634 describe un procedimiento para el aislamiento de proteínas producidas de modo recombinante, es decir, mediante diversos procedimientos tales como cromatografía de inmutafinidad, cromatografía de afinidad, precipitación de proteínas, intercambio de tampones, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, medio de cromatografía de intercambio iónico/hidrófoba de modo mixto, cromatografía quelante, cromatografía de afinidad de carbohidratos, tales como lectina o heparina, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis, diálisis, agentes de diferente precipitación, tales como polietilenglicol, sulfato de amonio, etanol, adsorción de hidroxiapatito, adsorción de membrana de filtración, ligandos acoplados a partículas magnéticas, etc. Sin embargo, identifica etapas de purificación cromatográfica particulares.

15 El documento WO-A-2005-082483 describe un procedimiento para la purificación de anticuerpos procedentes de una o más impurezas en un líquido, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicho líquido con una primera resina de cromatografía formada por un soporte al cual se han inmovilizado ligandos multimodales para adsorber los anticuerpos a la resina, en el que cada ligando multimodal comprende al menos un grupo de intercambio catiónico y al menos un sistema de anillos aromáticos o heteroaromáticos. Se añade un eluyente para liberar los anticuerpos de la resina y el eluato se pone en contacto con una segunda resina de cromatografía.

20 El documento WO-A-2005/121.163 describe un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas a partir de una solución de proteínas. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar una solución de proteínas que comprende una o más proteínas específicas y que tiene un pH preajustado y una fuerza iónica o conductividad preajustada, aplicar la solución de proteínas a una columna de lecho cargado o de lecho expandido que comprende un absorbente, y obtener una o más proteínas a partir de la columna, en el que la solución de proteínas se ha suplementado con un alcohol.

Descripción de la invención

30 Un objeto de la invención es evitar los inconvenientes de los procedimientos de purificación de la técnica anterior proporcionando un procedimiento nuevo. Otro objeto de la invención es proporcionar un proceso para purificar el FVIII, en particular a partir de fuentes que tienen un alto contenido de sales, en particular tal como se usan para la fabricación del FVIII recombinante.

35 Esto se consigue mediante un procedimiento de purificación del FVIII de coagulación en una secuencia de coagulación que emplea cromatografía, en el que se realiza al menos una cromatografía usando una resina multimodal. La expresión "resina multimodal", tal como se emplea en la presente, significa un material cromatográfico que tiene un soporte y restos unidos al soporte, en el que dichos restos interaccionan con grupos químicos de las sustancias que se van a separar y también son capaces de interaccionar con FVIII en una mezcla mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones, tales como enlaces de hidrógeno y/o interacción hidrófoba.

40 Según la invención, se proporciona un procedimiento para purificar o enriquecer el FVIII de coagulación empleando cromatografía, que comprende las etapas de proporcionar una fracción que contiene FVIII en una solución acuosa que tiene una alta fuerza iónica; poner en contacto la fracción que contiene FVIII con una resina multimodal; opcionalmente, lavar la resina multimodal que tiene el FVIII adsorbido con un tampón de lavado acuoso; eluir las fracciones que contienen FVIII mediante un tampón de elución acuoso formado por al menos un aminoácido que está cargado positivamente a pH 6 a 8; y opcionalmente, recoger las fracciones que contienen FVIII en forma purificada o enriquecida.

45 La cromatografía multimodal (o de modo mixto) es una herramienta para purificar proteínas. Se describe, por ejemplo, en la hoja de datos del fabricante GE HealthCare (11-0035-45AA) de Capto Adhere, la hoja de datos del fabricante GE HealthCare (28-9078-88AA) de Capto MMC, y la solicitud de patente EP 07114856.3 ("A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins").

50 Las técnicas tienen ciertas ventajas y desventajas. Una ventaja es la posibilidad de unir proteínas dentro de una concentración de sales mayor, comparado con la cromatografía de intercambio iónico, que se usa con más frecuencia. Una desventaja es que la elución a menudo incluye unas condiciones relativamente duras como, por

ejemplo, un pH menor o mayor que el pH neutro, por sí solo o en combinación con otros parámetros de elución. El FVIII es una proteína relativamente inestable, por ejemplo con respecto a los valores de pH fuera del valor neutro, pH 6-8 (Wang et al., Coagulation FVIII, structure and stability, International Journal of Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15). La invención resuelve este problema mediante condiciones de elución suaves en un intervalo de pH aproximadamente neutro que conserva la actividad de la molécula de FVIII y facilita el uso de la cromatografía multimodal en combinación con los efectos de estabilización de la mayor concentración de sales descrito, por ejemplo, en el documento EP-A-1.707.634.

Según una realización de la invención, la cromatografía multimodal puede realizarse en una columna cromatográfica. Esto puede considerarse como una primera etapa de captura. El procedimiento de la invención también puede realizarse en un modo discontinuo. La presente invención también ofrece un procedimiento de purificación sin la adición de aditivos estabilizantes derivados de seres humanos o de animales y el uso de un procedimiento completo que no los contiene (resinas de inmunoafinidad basados en anticuerpos monoclonales). El uso de la resina multimodal, en particular como etapa de captura, ofrece también una mayor capacidad de unión en comparación con los intercambiadores iónicos convencionales, que produce un eluato del producto más concentrado procedente de la etapa, que resulta ventajoso para la estabilidad del producto.

El procedimiento de la invención está relacionado generalmente con la purificación del FVIII recombinante (FVIII), en particular del FVIII recombinante con el dominio B delecionado.

Generalmente, la solución comprende FVIII en una solución con alta concentración de sales que se corresponde con una conductividad de aproximadamente 25 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C.

En otra realización de la invención, FVIII se aplica a la resina multimodal y, después de la unión a la resina multimodal, se eluye posteriormente con un tampón adecuado.

Después de la aplicación de la mezcla que comprende FVIII y de la unión de FVIII a la resina multimodal, la molécula de FVIII se eluye de la resina multimodal usando un tampón de elución formado por al menos un aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8, y en particular el aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8 es lisina, arginina y/o histidina.

Además, el tampón puede comprender un compuesto orgánico que contiene al menos un grupo hidroxilo, tal como un alcohol, un compuesto orgánico que contiene al menos un grupo amino, tal como un aminoácido, una fuente que proporciona iones Ca^{2+} , al menos un compuesto para regular la fuerza iónica del tampón, tal como sales inorgánicas, por ejemplo, NaCl, en particular a concentraciones ≤ 1 M, un detergente no iónico, y una sustancia tamponante para regular el pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, en particular a aproximadamente un valor neutro.

En otra realización del procedimiento de la invención, el alcohol puede seleccionarse del grupo de metanol, propanol y etilenglicol; el aminoácido puede seleccionarse del grupo de arginina, lisina e histidina; la fuente que proporciona Ca^{2+} puede ser CaCl_2 ; las sales inorgánicas pueden seleccionarse del grupo de KCl y NaCl; el detergente no iónico puede seleccionarse del grupo de Tween 20, Tween 80 y Pluronic F68; la sustancia tamponante puede seleccionarse del grupo de citrato de sodio, histidina, HEPES, MES y acetato de sodio a un pH entre 6-8.

En particular, la concentración del aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8 está presente en una cantidad de al menos $> 0,4$ M, en particular $> 0,5$ M. Si se emplea una concentración mayor que 1 M del aminoácido concreto, esto no produce más ventajas. Generalmente, la cantidad de arginina está en un intervalo de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 1,0 M, en particular en un intervalo de aproximadamente 0,7 M a aproximadamente 0,9 M. El compuesto orgánico que contiene un grupo hidroxilo, tal como un alcohol, por ejemplo, etilenglicol, está presente en particular en cantidades del 0 % (en v/v) al 30 % (en v/v), en particular de aproximadamente el 5 % al 15 %. La concentración de iones calcio debe estar en el intervalo de aproximadamente 0,0001 M a aproximadamente 0,1 M, en particular de aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 0,03 M. La concentración del compuesto para regular la fuerza iónica del tampón debe estar en el intervalo para proporcionar una conductividad de aproximadamente 15 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C. La cantidad de detergente no iónico generalmente está en el intervalo de aproximadamente el 0,001 % al 1 %.

En una realización del procedimiento de la invención se aplica un tampón de lavado a la resina multimodal. Este puede usarse para lavar los contaminantes y conservar el FVIII, antes de liberar el FVIII.

En otra realización del procedimiento de la invención, la resina de cromatografía "multimodal" contiene al menos uno de los siguientes testos:

i) un ligando de N-bencil-N-metiletanolamina cargado positivamente,

ii) un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente,

iii) un ligando de fenilpropilo,

iv) un ligando de N-hexilo,

v) un ligando de 4-mercaptoetilpiridina,

5 vi) un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)amino)fenil)amino)benzoico, o cualquiera de sus combinaciones.

En particular, en el procedimiento de la invención, la resina de cromatografía "multimodal" se selecciona de las siguientes resinas disponibles en el mercado: HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

10 En otra realización del procedimiento de la invención, la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad de FVIII, en la que la afinidad es proporcionada por un ligando de proteína, tal como un fragmento de anticuerpo que se expresa en levaduras.

15 Según el procedimiento de la invención, la secuencia de purificación comprende además etapas de inactivación/eliminación de patógenos, que comprenden una etapa de inactivación basada en procesos químicos, una etapa de eliminación basada en el tamaño, etapas cromatográficas o cualquiera de sus combinaciones, basándose dichas etapas en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno que se va a eliminar.

En una realización particular del procedimiento de la invención, la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:

i. el uso de una membrana aniónica, tal como Sartobind Q, en particular para la reducción del ADN;

20 ii. una resina multimodal catiónica, tal como Capto MMC;

iii. una resina de intercambio catiónico, tal como SP Sepharose FF;

iv. el uso de una membrana aniónica secundaria, tal como Sartobind Q, en particular para una mayor reducción del ADN;

25 v. una etapa de inactivación basada en procesos químicos para los virus con envuelta lipídica, en particular la inactivación con disolvente/detergente empleando fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100, tal como se describe en el documento EP-A-131.740;

vi. una resina de afinidad basada en un ligando de proteína expresado en levaduras, tal como VIIISelect o una resina de cromatografía multimodal aniónica, tal como Capto Adhere;

30 vii. una etapa de eliminación de patógenos mediante filtración con un tamaño medio de poro de aproximadamente 20 nm, tal como Planova 20N;

viii. una resina de intercambio aniónico, tal como Q Sepharose FF;

ix. una resina de cromatografía de exclusión molecular, tal como Superdex 200pg.

35 En particular, en el procedimiento de la invención, las condiciones de elución de la etapa de intercambio catiónico se basan en una concentración de iones Ca^{2+} que varía de 0,15-0,25 M, y la conductividad del tampón de elución no será mayor que 25 mS/cm a 25 °C.

Si se emplea el procedimiento de la invención, la pureza del producto obtenible es > 4000 UI/mg, después de la última etapa de purificación preferiblemente > 9000 UI/mg, y más preferiblemente > 10.000/mg de proteína y < 1.000 pg/1000 UI de FVIII, preferiblemente < 100 pg/1000 UI de FVIII, y más preferiblemente < 10 pg/1000 UI de FVIII con respecto a la contaminación por ADN.

40 Por tanto, también una composición de materia es sujeto de la invención, comprendiendo dicha composición de materia un FVIII recombinante purificado obtenible mediante el procedimiento según la invención (sin la adición o el uso de ningún aditivo humano o animal, tal como albúmina o ligandos de inmutofinidad basados en anticuerpos monoclonales).

45 El apéndice 1 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento según la invención, en el que la etapa de captura se realiza en una resina multimodal. Una suspensión de células se procesa mediante la adición de sales, se separan las células, seguido de una etapa de reducción del ADN, preferiblemente sobre una membrana-Q. La

membrana-Q (por ejemplo, Sartobind Q de Sartorius) es un intercambiador aniónico básico fuerte con grupos amonio cuaternario como resto de intercambio aniónico. Dentro de intervalos específicos de pH y conductividad, la membrana-Q se une de modo específico al ADN, mientras que el producto (y las proteínas de la célula hospedante) se mantienen en el flujo. En oposición a la cromatografía en columna de intercambio iónico convencional, el ligando cargado se une a un soporte de membrana para facilitar una alta capacidad de procesamiento y la facilidad del uso. La etapa de captura comprende el procedimiento de la invención usando la resina multimodal. A la etapa de captura le sigue una separación en un intercambiador iónico, SP Sepharose FF™ (GE HealthCare), seguido de otra reducción del ADN en una membrana-Q. Se realiza un tratamiento de inactivación del virus mediante el procedimiento de disolvente/detergente (procedimiento S/D) tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-131.740, y otra etapa de purificación, por ejemplo, sobre la resina de afinidad VIII Select™. Se realiza otra etapa de concentración/refinamiento en una columna de intercambio aniónico, por ejemplo en Q Sepharose FF™ (GE HealthCare). El producto concentrado después se procesa en una columna de filtración en gel (por ejemplo, Superdex 200 p.g.™ (GE HealthCare)) para intercambiar el tampón y eliminar los potenciales agregados y fragmentos. El producto resultante, eluato de GF (GF-eluato), se recoge. Las etapas respectivas se explican con más detalle en los ejemplos.

Los apéndices 2 y 3 muestran una realización alternativa, en la que la etapa de afinidad específica (VIIISelect™ (GE HealthCare)), tal como se describe en el apéndice 1, se sustituye por una cromatografía multimodal, Capto Adhere™ (GE HealthCare). De modo sorprendente, la secuencia de purificación, tal como se describe en el apéndice 2, ejerce la misma pureza que la secuencia de purificación descrita en el apéndice 1 (incluyendo la etapa de afinidad basada en anticuerpos específicos). Este resultado se repitió con el mismo material de partida, según se describe en el apéndice 3. Esto demuestra el amplio potencial de uso de la técnica de purificación multimodal más de una vez (en la etapa de captura, Capto MMC™ (GE HealthCare) y en otra etapa de purificación corriente abajo con Capto Adhere™ (GE HealthCare) según se describe en los apéndices 2 y 3), usando las condiciones de elución específicas para FVIII según la invención.

La invención se describe más a fondo mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

En todos los ejemplos, el valor real de M (Molar) es mol/kg (es decir, 10 gramos de sal se añaden a 1000 gramos de agua, no se añaden 10 gramos de sal al agua hasta 1000 ml).

Ejemplo 1: Producción de una suspensión celular que contiene FVIII

Células

La línea celular usada es un derivado de células de riñón embrionario humanas 293 (HEK 293), que está adaptada a un crecimiento sin suero. Este hospedante, HEK 293, se transfectó de modo estable con un módulo de expresión que porta el gen de FVIII humano con el dominio B delecionado bajo el control de un promotor fuerte (documento EP-A-1.739.179).

Procedimiento de cultivo

Las células se cultivaron en un medio sin suero, en un equipo general y según procedimientos generales muy conocidos en la técnica, por ejemplo cultivos agitados o removidos en matraces t, matraces agitadores y biorreactores (sistemas desechables y tanques agitados convencionales), realizados como cultivos en quimioestados discontinuos, de alimentación discontinua, perfusionados o continuos (Freshney, R.I. (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4ª ed, Wiley- Liss; Spier, R.E. ed. (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, Nueva York; Enfors, S.-O. y Häggström, L. (2000), Bioprocess technology: fundamentals and applications, Högskoletyckeriet, Royal Institute of Technology, Estocolmo; Vinci, V.A. y Parekh, S.R. (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, EEUU). Generalmente, se emplea la perfusión del medio para aumentar el número de células y las titulaciones del producto más allá de los niveles del cultivo discontinuo convencional. El rendimiento del producto y la cantidad de proteínas de la célula hospedante son distintos dependiendo del modo de cultivo:

- la titulación del producto generalmente aumenta con el número de células;
- el contenido total en proteínas y el contenido de ADN generalmente aumenta con el número de células;
- el contenido total en proteínas y el contenido de ADN también puede aumentar con la longevidad del cultivo;
- los cultivos discontinuos acumulan proteínas y ADN; nada se añade de modo externo, nada se retira;

- los procedimientos de perfusión enjuagan los metabolitos, las proteínas, el ADN y otras impurezas de los cultivos celulares; se emplean generalmente filtros o centrifugados de células para la retención de las células.

5 Puesto que el producto recombinante está asociado con las células, la suspensión celular es lo que se recolecta. Las propiedades de lo recolectado (titulaciones del producto e impureza, según se mencionó anteriormente) son distintas dependiendo del modo de cultivo usado.

Ejemplo 2: Producción del material de partida de FVIII sin células

10 El material de partida de FVIII sin células para la purificación cromatográfica se consiguió como sigue. Una solución madre de cloruro de sodio y cloruro de calcio se añadió a la suspensión celular, producida según el ejemplo 1, para producir unas concentraciones finales de 0,3 M y 30 mM, respectivamente, y una conductividad de 30-40 mS/cm a 35 °C. La solución se mezcló durante aproximadamente 30 minutos, tras lo cual las células se retiraron mediante centrifugación y después se realizó una etapa de filtración para eliminar cualquier resto celular remanente (para inhibir la coagulación de las siguientes etapas en columna).

Ejemplo 3: Condiciones de elución para la resina catiónica multimodal Capto MMC

15 Se realizó la siguiente serie de experimentos para comparar las diferentes condiciones de elución sobre la resina catiónica multimodal Capto MMC.

Ejemplo 3a: Evaluación de las diferentes concentraciones de sales y pH para eluir el FVIII de la resina Capto MMC (ejemplo de referencia)

Columna y resina

20 La resina Capto MMC se cargó hasta una altura del lecho de 10 cm en una columna C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 8 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317).

Material de partida

Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

25 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

30 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida con un caudal de 5 ml/min. El FVIII se unió a la resina durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución según se describe en la tabla 1, y la cantidad de FVIII resultante que sale de la columna se analizó con el procedimiento de FVIII:C y se calculó como porcentaje con relación a la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 1

Condiciones de elución	Volumen eluido (VC)	FVIII:C encontrado en el eluato (%)
NaCl 0,1 M, pH 6,5*	10	0
NaCl 0,3 M, pH 7,0*	90	0
NaCl 1 M, pH 6,5**	20	0
NaCl 2 M, pH 6,5** (OgH07-626)	15	0
* Los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, CaCl ₂ 0,01 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % en p/p.		
** El tampón de elución incluye L-histidina 0,05 M, CaCl ₂ 0,05 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % en p/p.		

Conclusión del ejemplo de referencia 3a

35 Tal como puede observarse en la tabla 1, la unión de FVIII a la columna de Capto MMC no es una interacción iónica.

Ejemplo de referencia 3b: Evaluación de las condiciones de elución para Capto MMC, con diferentes concentraciones de NaCl con un contenido de etilenglicol al 50 % constante

Columna y resina

5 La resina Capto MMC se cargó hasta una altura del lecho de 2 cm en una columna XK16/20 (1 volumen de columna (VC) = 4 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317).

Material de partida

Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

10 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

15 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min. El FVIII se unió a la resina durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución según se describe en la tabla 2, y la cantidad de FVIII resultante que sale de la columna se analizó con el procedimiento de FVIII:C y se calculó como porcentaje con relación a la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 2

Condiciones de elución*	Volumen eluido (VC)	FVIII:C encontrado en el eluato (%)
NaCl 0,5 M + etilenglicol al 50 %, pH 6,5	3	23
NaCl 1 M + etilenglicol al 50 %, pH 6,5	6	52
NaCl 1,5 M + etilenglicol al 50 %, pH 7,5	4	73
NaCl 1,5 M + etilenglicol al 50 %, pH 6,5	2	82
NaCl 2,5 M + etilenglicol al 50 %, pH 6,5	3	84

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,02 M, CaCl₂ 0,02 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % en p/p.

Conclusión del ejemplo de referencia 3b

20 Tal como puede observarse en la tabla 2, la unión de FVIII a la columna de Capto MMC puede ser inhibida mediante una combinación de etilenglicol y NaCl. El etilenglicol al 50 % se usa habitualmente como tampón de elución para resinas de afinidad basadas en proteínas convencionales. La elución de FVIII mejora si el etilenglicol se combina con una mayor concentración de cloruro de sodio de hasta 1,5 M. Los dos pH diferentes ensayados (pH 6,5 y 7,5) no cambian la recuperación de FVIII, lo cual indica que el pH no puede usarse como parámetro de elución para FVIII, dentro de los límites de estabilidad para la proteína (aproximadamente 6-8). Un aumento en la concentración de NaCl de hasta 2,5 M no mejora la recuperación de FVIII:C en el eluato.

Ejemplo 3c: Variación de la arginina como un componente de la elución para Capto MMC

Columna y resina

30 La resina Capto MMC se cargó hasta una altura del lecho de 8 cm en una columna Tricorn 5/100 (1 volumen de columna (VC) = 1,6 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317-10).

Material de partida

Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

35 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

5 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida con un caudal de 0,6 ml/min. El FVIII se unió a la resina durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución secuencial (aproximadamente 10 volúmenes de columna (VC) cada una) según se describe en la tabla 3, y la cantidad de FVIII resultante que eluye de la columna se analizó con el procedimiento de FVIII:C y se calculó como porcentaje con relación a la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 3

Condiciones de elución*	FVIII encontrado en el eluato (%)
etilenglicol al 20 %	0
arginina 0,1 M + etilenglicol al 20 %	0
arginina 0,2 M + etilenglicol al 20 %	0
arginina 0,3 M + etilenglicol al 20 %	0
arginina 0,4 M + etilenglicol al 20 %	1
arginina 0,5 M + etilenglicol al 20 %	10
arginina 0,6 M + etilenglicol al 20 %	37
arginina 0,7 M + etilenglicol al 20 %	32
arginina 0,8 M + etilenglicol al 20 %	8
arginina 0,9 M + etilenglicol al 20 %	1
arginina 1,0 M + etilenglicol al 20 %	0
* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl ₂ 0,01 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.	

Conclusión del ejemplo 3c (según la invención)

10 Tal como puede observarse en la tabla 3, la unión de FVIII a la columna de Capto MMC puede ser inhibida, de modo sorprendente, mediante una combinación de etilenglicol y arginina. Se observa la elución de FVIII en los eluatos que contienen arginina hasta 0,9 M junto con etilenglicol al 20 % (en p/p).

Ejemplo 3d (según la invención): Comparación de la arginina y la lisina como componentes de la elución para Capto MMC

15 Columna y resina

La resina Capto MMC se cargó hasta una altura del lecho de 4-8 cm en una columna Tricorn 5/100 o C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 1,6-3 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317).

Material de partida

20 Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

25 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida con un caudal que representa un tiempo de contacto de 1-2 minutos. El FVIII se unió a la resina durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución según se describe en la tabla 4, y la cantidad de FVIII resultante que sale de la columna se analizó con el procedimiento de FVIII:C y se calculó como porcentaje con relación a la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 4

Condiciones de elución*	Volumen eluido (VC)	FVIII encontrado en el eluato (%)
lisina 0,5 M + etilenglicol al 20 %	40	3
lisina 0,65 M + etilenglicol al 20 %	40	16
lisina 0,75 M + etilenglicol al 20 %	40	13
arginina 0,4 M + etilenglicol al 20 %	20	4
arginina 0,75 M + etilenglicol al 20 %	20	89

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.

Conclusión del ejemplo 3d (según la invención)

5 Tal como puede observarse en la tabla 4, la unión de FVIII a la columna de Capto MMC se ha estudiado con etilenglicol al 20 % en combinación con lisina y arginina a diferente concentración. La arginina eluye el FVIII mejor que la lisina, y una concentración de 0,75 M parecer producir aproximadamente el 90 % de recuperación. Parece posible usar cantidades menores de cualquiera de los aminoácidos en combinación con etilenglicol, como etapa de lavado para eliminar las impurezas de la molécula de FVIII, antes de eluir FVIII, por ejemplo, con arginina 0,75 M.

10 **Ejemplo 3e: Evaluación de la pureza y de la recuperación usando diferentes condiciones de lavado y elución para la resina Capto MMC**

Columna y resina

La resina Capto MMC se cargó en diferentes tamaños de columna (altura del lecho de 2-9 cm, volumen 1,6-48 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317).

Material de partida

15 Los materiales de partida usados fueron disoluciones de proteínas que contenían rFVIII, obtenidas según se describe en el ejemplo 2, con una pureza típica de aproximadamente 100 UI de FVIII/mg de proteína (tal como puede observarse en el ejemplo 9, tabla 18).

Tampón de equilibrio

20 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

25 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida con el caudal apropiado (dependiendo del tamaño de la columna, aproximadamente 13-300 cm/h). El FVIII se unió a la resina durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de lavado y elución según se describe en la tabla 5, y la cantidad de FVIII resultante que sale de la columna se analizó con el procedimiento de FVIII:C y se calculó como porcentaje con relación a la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 5

Tampón de lavado	Tampón de elución	Recuperación de FVIII (%)	Pureza** del eluato (UI/mg)
etilenglicol al 20 % + arginina 0,4 M, 40 VC	arginina 0,8 M + etilenglicol al 20 %	83	5741
etilenglicol al 20 % + arginina 0,45 M, 20 VC	arginina 0,8 M	69	na

* Todos los tampones incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 mM, y polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5.

** Medido con Bradford.

Conclusión del ejemplo 3e

5 Tal como puede observarse en la tabla 5, la combinación de etilenglicol al 20 % y arginina 0,4 M en una etapa de lavado antes de aplicar una concentración mayor de arginina en el tampón de elución produce un producto puro y con alto rendimiento, y la concentración de arginina en el tampón de lavado no debe exceder de 0,4 M debido a la recuperación relativamente baja de FVIII resultante.

Conclusión del ejemplo 3

10 Es evidente que la resina multimodal catiónica (Capto MMC) no puede eluirse usando condiciones de elución de intercambio iónico convencionales (alto contenido de sales) o de resinas de interacción hidrófoba (bajo contenido de sales). Una mayor cantidad de aminoácido cargado por sí solo o en combinación con etilenglicol puede liberar, de modo sorprendente, la molécula de FVIII unida de la resina Capto MMC. Además, las concentraciones de NaCl, arginina, lisina y etilenglicol pueden variar durante el lavado y la elución de la resina, para optimizar la recuperación y la pureza del eluato de Capto MMC.

15 **Ejemplo 4: Condiciones de elución para la resina aniónica multimodal Capto Adhere (comparativo)**

Se realizó la siguiente serie de experimentos para comparar las diferentes condiciones de elución sobre la resina aniónica multimodal Capto Adhere.

Columna y resina

20 La resina Capto Adhere se cargó hasta una altura del lecho de 13,5 cm en una columna C10/20. La resina Capto Adhere se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5444).

Material de partida

Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 6C.

Tampón de equilibrio

25 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 30 ± 3 mS/cm a 25 °C.

La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución según se describe en la tabla 6, y se analizó la cantidad de FVIII resultante que sale de la columna.

30

Tabla 6

Muestra	Volumen, ml	FVIII, UI/ml	FVIII total, UI	FVIII total (%)
Material de partida (carga)	184	140	25760	100
A (tampón de equilibrio)	159	0,0	0	0
B (alto contenido de sales)	212	0,0	0	0
C (bajo contenido de sales)	53	0,0	0	0
D (bajo contenido de aminoácidos + bajo contenido de etilenglicol)	212	3,5	935	4
E (aminoácido)	32	701	22432	87

Condición de elución A

5 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 30 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condición de elución B (alto contenido de sales)

L-histidina 0,05 M, CaCl₂ 0,05 M, NaCl 2,0 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 140 ± 5 mS/cm a 25 °C.

Condición de elución C (bajo contenido de sales)

10 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 13 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condición de elución D (bajo contenido de aminoácidos + bajo contenido de etilenglicol)

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, hidrocloreuro de arginina 0,3 M, etilenglicol al 20 % en p/p, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 28 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condición de elución E (aminoácido)

15 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, hidrocloreuro de arginina 0,8 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 53 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Conclusión del ejemplo 4

20 Es evidente que la resina multimodal aniónica (Capto Adhere) no puede eluirse usando condiciones de elución de intercambio iónico convencionales (alto contenido de sales) o de resinas de interacción hidrófoba (bajo contenido de sales). Una mayor cantidad de aminoácido cargado por sí solo o en combinación con etilenglicol puede liberar, de modo sorprendente, la molécula de FVIII unida.

Ejemplo 5: Comparación de una etapa de intercambio catiónico convencional (SP Sepharose FF) con una resina multimodal catiónica (Capto MMC) como una etapa de purificación (etapa de captura)Columna y resina

La resina Capto MMC se cargó hasta una altura del lecho de 11 cm en una columna C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 8,5 ml). La resina Capto MMC se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5317).

La resina SP Sepharose FF se cargó hasta una altura del lecho de 18 cm en una columna XK26/20 (1 volumen de columna (VC) = 100 ml). La resina SP Sepharose FF se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-0729).

Material de partida

30 Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2 (se usó el mismo material de partida en ambos experimentos). Para la resina SP Sepharose FF, el material de partida se diluyó con tampón de dilución hasta una conductividad de 12 mS antes de aplicar la resina, para que el FVIII pudiera unirse.

Tampón de dilución SP

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,07 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.

Tampón de equilibrio MMC

5 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 7,0, conductividad 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Tampón de equilibrio SP

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

10 Las columnas se equilibraron con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 5 ml/min, respectivamente, 40 ml/min. El FVIII se unió a las resinas durante estas condiciones de tampón (no pudo detectarse FVIII en el flujo). Después la resina se sometió a diferentes condiciones de lavado y elución, cuyo principio se describe en el ejemplo 3d (lavado: lisina 0,75 M + etilenglicol al 20 %) y el ejemplo 3b (elución: NaCl 1,5 M + etilenglicol al 50 %) para la etapa de Capto MMC, y en el ejemplo 6b para la etapa de SP Sepharose FF (lavado: NaCl 0,15 M; y elución: NaCl 0,36 M). En la tabla 7 pueden estudiarse las diferencias entre las dos etapas de purificación.

15

Tabla 7

Resina de captura	Conductiv. en el material de carga, mS/cm a 25 °C	Volumen de carga del material, ml	FVIII total aplicado, UI	FVIII/ml de resina de captura	Recuperación de FVIII*, %	Pureza**, UI/mg	ADN/FVIII, ng/UI
Capto MMC OgH07-648	35	1235	29022	3400	68 %	2414	2,3
SP-SepHFF OgH07-647	12	5759	20147	202	59 %	596	22,1

* Calculado a partir del material de partida sin diluir.
 ** Medido con Bradford.

Conclusión del ejemplo 5 (comparativo)

20 El resultado de la tabla 7 demuestra que el uso de la etapa de Capto MMC como etapa de captura/purificación para FVIII ejerce varias ventajas, que incluyen:

- una mejor recuperación de FVIII
- una mayor pureza con respecto a las proteínas de la célula hospedante
- una mayor pureza con respecto al ADN
- una mayor capacidad de unión de FVIII/ml de resina

25 · un tiempo del procedimiento más corto debido a una menor dilución (la resina MMC puede procesarse con una mayor conductividad)

Ejemplo 6: Elución específica (Ca) y componentes del lavado para FVIII y su purificación en una resina de intercambio catiónico (SP Sepharose FF) (comparativo)

30 Se realizó la siguiente serie de experimentos para evaluar las diferentes condiciones de elución sobre la resina SP Sepharose FF.

Ejemplo 6a: El cloruro de sodio y la arginina como componentes de elución y lavado específicos usados con una resina de intercambio catiónico (SP Sepharose FF)

Columna y resina

La resina SP Sepharose FF se cargó hasta una altura del lecho de 15 cm en una columna XK16. La resina SP Sepharose FF se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-0729).

Material de partida

- 5 Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2, y posteriormente procesada en una resina Capto MMC, según se describe en el ejemplo 9. El eluato de la columna de Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad hasta aproximadamente 12 mS/cm, lo cual permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sepharose FF.

Tampón de dilución

- 10 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,07 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.

Tampón de equilibrio

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

- 15 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución, según se describe en la tabla 8, y se analizó la cantidad resultante de FVIII que sale de la columna.

Tabla 8

Muestra	Volumen, ml	FVIII, UI/ml	FVIII total, UI	Total, %	Actividad específica**, UI/mg
Material de partida (carga)	2830	5	14150	100	178
Lavado con tampón de equilibrio	300	0,0	0	0	na
Lavado A	600	0,0	0	0	na
Elución	90	153	13770	97	362
na - no analizado					
** Medido con Bradford					

Lavado A

- 20 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,15 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 16,5-18,0 mS/cm a 25 °C.

Tampón de elución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,035 M, NaCl 0,34 M, D-sorbitol 0,2 M, hidrocloreuro de arginina 0,045 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 36 ± 2 mS/cm a 25 °C.

- 25 Conclusión del ejemplo 6a (comparativo)

El FVIII unido fue eluido de modo eficaz de la columna de SP Sepharose FF cuando se emplea un tampón de elución con una conductividad de 36 mS/cm. Esta conductividad es un efecto de la concentración de NaCl y en parte de las concentraciones de CaCl₂ y de arginina. El sorbitol y la arginina se incluyeron en el tampón para estabilizar la molécula de FVIII durante el procesamiento, la congelación y la descongelación.

- 30 **Ejemplo 6b: El cloruro de sodio como componente de elución y lavado específico usado con una resina de intercambio catiónico (SP Sepharose FF)**

Columna y resina

La resina SP Sepharose FF se cargó hasta una altura del lecho de 15 cm en una columna C10/20. La resina SP Sepharose FF se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-0729).

Material de partida

- 5 Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2 y en el ejemplo 9. El eluato de la columna de Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad, lo cual permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sepharose FF.

Tampón de dilución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,01 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.

- 10 Tampón de equilibrio

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

- 15 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución, según se describe en la tabla 9, y se analizó la cantidad resultante de FVIII que sale de la columna.

Tabla 9

Muestra	Volumen, ml	FVIII, UI/ml	FVIII total, UI	Total, %	Actividad específica**, UI/mg
Material de partida (carga)	540	12,8	6912	100	799
Lavado con tampón de equilibrio	120	0,0	0	0	na
Lavado B	490	0,0	0	0	na
Elución	27	221	5967	86	948
** Medido con Bradford					

Lavado B

- 20 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,15 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 16,5-18,0 mS/cm a 25 °C.

Tampón de elución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,035 M, NaCl 0,36 M, D-sorbitol 0,2 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 36 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Conclusión del ejemplo 6b

- 25 Se empleó un tampón de elución con una conductividad de 36 mS/cm. Comparado con el usado en el experimento 5a, la arginina fue excluida y la conductividad se ajustó a 36 mS/cm mediante la adición de una concentración de NaCl ligeramente mayor. El porcentaje de FVIII eluido fue ligeramente menor que en el experimento 5a, lo cual indica que la arginina tiene una función positiva durante el procedimiento.

- 30 **Ejemplo 6c: El cloruro de calcio como componente de elución y lavado específico usado con una resina de intercambio catiónico**

Columna y resina

La resina SP Sepharose FF se cargó hasta una altura del lecho de 15,5 cm en una columna XK26. La resina SP Sepharose FF se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-0729).

Material de partida

Los materiales de partida usados fueron una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenida según se describe en el ejemplo 2 y en el ejemplo 9. El eluato de la columna de Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad, lo cual permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sepharose FF.

5 Tampón de dilución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,05 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5.

Tampón de equilibrio

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

10 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de elución, según se describe en la tabla 10, y se analizó la cantidad resultante de FVIII que sale de la columna.

Tabla 10

Muestra	Volumen, ml	FVIII, UI/ml	FVIII total, UI	Total, %	Actividad específica**, UI/mg
Material de partida (carga)	2000	31,7	63400	10	578
Lavado con tampón de equilibrio	830	0,0	0	0	na
Lavado B	3320	0,0	0	0	na
Lavado C (sorbitol)	249	0	0	0	na
Elución (cloruro de calcio)	410	149	61090	96	2811
** Medido con Bradford					

15 Lavado B

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,15 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 16,5-18,0 mS/cm a 25 °C.

Lavado C (sorbitol)

20 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, D-sorbitol 0,2 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Tampón de elución (cloruro de calcio)

L-histidina 0,02 M, CaCl₂ 0,2 M, NaCl 0,1 M, D-sorbitol 0,2 M, polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 18,7 (18,0-19,0) mS/cm a 25 °C.

Conclusión del ejemplo 6c (6a, 6b)

25 En este experimento (6c), la concentración de NaCl disminuyó y se empleó una concentración mayor de CaCl₂ en el tampón de elución. Este cambio produce una conductividad de 18,7 mS/cm. La capacidad de elución del FVIII desde SP Sepharose FF fue igualmente buena que en el experimento 5a, en el que la conductividad en el tampón de elución era de 36 mS/cm. Fue un descubrimiento sorprendente el que la recuperación del FVIII fuera igual o mejor con un tampón de elución con casi las mitad de la conductividad. En una cromatografía de intercambio iónico, normalmente, la elución de las proteínas depende mucho de la conductividad (fuerza iónica) y/o del pH. En este ejemplo, parece que el ion Ca²⁺ ejerce unos efectos específicos sobre la molécula de FVIII, distintos de los derivados solamente de la fuerza iónica. Esto también es verificado por la pureza, que es mayor (2811 comparada con 362 y 948, respectivamente, en 6a y 6b) cuando se usa la elución basada en Ca con menor conductividad.

30

Ejemplo 7: Purificación con un ligando de afinidad de FVIII derivado de levaduras

Se realizó el siguiente experimentos para evaluar las condiciones de elución con la resina de afinidad VIIISelect.

Columna y resina

5 Una columna C10/20 se cargó con la resina VIIISelect hasta una altura del lecho de 7 cm en una columna XK26. La resina VIIISelect se obtuvo en GE HealthCare (nº de catálogo 17-5450).

Material de partida

El material de partida usado fue un eluato de SP Sepharose que contenía rFVIII, obtenido en principio como se describe en el ejemplo 6b para la etapa de SP Sepharose FF (lavado: NaCl 0,15M; y elución: NaCl 0,36 M):

Composiciones tampón:

10 Tampón A (tampón de equilibrio con productos químicos S/D añadidos)

NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg (2 x H₂O), L-histidina 0,02 mol/kg, Triton X-100 al 1 % en p/p, TNBP al 0,3 % en p/p, pH 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Lavado B (tampón de equilibrio sin productos químicos S/D)

15 NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Lavado C (tampón de lavado con alta concentración de sales)

NaCl 1,0 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5 ± 0,1, conductividad: 85 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Tampón D (tampón de elución)

20 NaCl 1,5 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), etilenglicol (EG) al 50 % (en p/p), pH 6,5 ± 0,1, conductividad: 39 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Los tampones de equilibrio, de lavado y de elución no están limitados al pH, a las concentraciones y los tipos de tampón, a las sales o los detergente mencionados.

25 La columna se equilibró con tampón de equilibrio A, seguido de la carga del material de partida. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de lavado y elución según se describe en la tabla 11, y se analizó la cantidad resultante de FVIII que sale de la columna.

Tabla 11. Resultados del experimento con VIIISelect

Muestra	Volumen, ml	FVIII, UI/ml	Total, UI	Total, %	Actividad específica (UI/mg de proteína)	Contenido de ADN (pg/1000 UI)
Material de partida (carga)	45	483	21735	100	1959*	1681
Lavado B	127,5	0,1	13	0	-	-
Lavado C	55	0	0	0	-	-
Elución	27,5	642	17655	81	8758*	1399
* Medido con Bradford						

30 La figura 1 muestra un SDS-PAGE teñido con plata que muestra el perfil de pureza del material de partida (carril 1) y el eluato de VIIISelect (carril 2) después de la etapa de cromatografía de afinidad.

Conclusión del ejemplo 7

La etapa de VIIISelect es una poderosa etapa de purificación que produce un eluato puro.

Ejemplo 8: Comparación de una secuencia de purificación con la resina de afinidad VIIISelect o con una resina multimodal (Capto Adhere) (apéndice 3)

Se realizaron dos esquemas de purificación diferentes a pequeña escala según el ejemplo 7 (VIIISelect) y el ejemplo 10 (Capto Adhere)

5 Tabla 12. Comparación de la recuperación y pureza de FVIII mediante el uso de una etapa de purificación con FVIIISelect o Capto Adhere

Esquema de FVIIISelect	Actividad específica (UI/mg de proteínas totales)	FVIII, recuperación de UI (%)	Contenido de ADN (pg/1000 UI)	Esquema de Capto Adhere	Actividad específica (UI/mg de proteínas totales)	FVIII, recuperación de UI (%)	Contenido de ADN (pg/1000 UI)
Material de partida (Sp-filtrado)	1588*	100	1442	Material de partida (Sp-filtrado)	1588*	100	1442
Eluato de VIIISelect	8759*	81	1399	Eluato de Adhere	5112*	86	504
Q-eluato de VIIISelect	na	106	840	Q-eluato (Adhere)	na	105	82
GF-eluato de VIIISelect	10322**	88	214	GF-eluato (Adhere)	10679**	103	181

na = no analizado

* Medido con Bradford

** Medido con análisis de aminoácidos

La figura 2 muestra la tinción con plata de un SDS-PAGE de las muestras descritas en la tabla 12 (comparación del esquema de purificación con VIIISelect y del esquema de purificación con Capto Adhere)

10 El carril 1 muestra la pureza del material de partida (SP-filtrado) antes de la columna de VIIISelect cargada a una concentración de FVIII de 483 UI/ml.

El carril 2 muestra la pureza del eluato de VIIISelect cargado a una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

El carril 3 muestra la pureza después de la secuencia de purificación de SP-VIIISelect-Q Seph, cargado a una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

15 El carril 4 muestra la pureza después de la secuencia de purificación de SP-VIIISelect-Q Seph-filtración en gel, cargado a una concentración de FVIII de 385 UI/ml.

El carril 5 muestra la pureza del material de partida (SP-filtrado) antes de la columna de Capto Adhere cargada a una concentración de FVIII de 493 UI/ml.

El carril 6 muestra la pureza del eluato de Capto Adhere cargado a una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

20 El carril 7 muestra la pureza después de la secuencia de purificación de SP-Capto Adhere-Q Seph, cargado a una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

El carril 8 muestra la pureza después de la secuencia de purificación de SP-Capto Adhere-Q Seph-filtración en gel, cargado a una concentración de FVIII de 493 UI/ml.

El carril 9 muestra un marcador molecular.

25 conclusión del ejemplo 8

Puede lograrse la misma pureza usando la etapa de afinidad con VIIISelect o la etapa de cromatografía con Capto Adhere, si la pureza se compara en el producto final (GF-eluato). La pureza después de la etapa de VIIISelect es mayor comparada con la obtenida después de la etapa de Capto Adhere, pero después de las etapas de purificación que quedan (Q y GF), no se advierte diferencia en la pureza con los procedimientos analíticos usados.

La recuperación usando la etapa de Capto Adhere es ligeramente mayor, comparado con la secuencia que emplea VIIISelect.

Ejemplo 9: Secuencia de purificación a escala industrial, incluyendo la resina de afinidad VIIISelect

5 Para estudiar la reproducibilidad de la recuperación y la pureza, se realizaron las etapas de purificación 1-9 descritas a continuación, en 3-4 lotes a escala piloto. Cada lote procede de una suspensión celular de 40-100 l, según se describe en el ejemplo 1-2.

Etapa 1: Etapa de reducción del ADN nº 1 (cromatografía aniónica)

La principal reducción del ADN se realiza con filtración a través de una membrana-Q (Sartobind Q, Sartorius). La membrana-Q se equilibra con tampón antes de la filtración (tabla 13).

10 Tabla 13. Tampón usado para la membrana-Q

membrana-Q/reducción del ADN	Tampón de equilibrio	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 7
------------------------------	----------------------	---

El filtrado celular (del ejemplo 2) se procesa a través de una membrana-Q y se recoge el flujo que contiene el producto. La membrana se lava con tampón de equilibrio para recuperar el FVIII remanente en la membrana.

Etapa 2: Etapa de captura (cromatografía multimodal, Capto MMC)

15 Se realiza la principal purificación y concentración (captura) del producto a 500-10.000 UI de FVIII/ml de gel de cromatografía de intercambio catiónico multimodal (Capto MMC). El gel, antes de la aplicación del producto, se equilibra con tampón de equilibrio de Capto MMC. El filtrado de la etapa 1 se carga en la columna de Capto MMC que después se enjuaga con tampón de equilibrio de Capto MMC y después se lava secuencialmente con tampón de lavado 1-3, seguido por la elución del FVIII, tal como se describe en la tabla 14.

20 Tabla 14

Cromatografía multimodal/Capto MMC	Tampón de equilibrio	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 7
	Tampón de lavado 1	NaCl 1 mol/kg, CaCl ₂ 0,05 mol/kg, L-histidina 0,05 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 6,5
	Tampón de lavado 2	NaCl 0,1 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de lavado 3	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,4 mol/kg, etilenglicol al 10 % (en p/p), polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,8 mol/kg, etilenglicol al 10 % (en p/p), polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5

Etapa 3: Cromatografía de intercambio catiónico, SP Sepharose FF

25 La solución que contiene FVIII (eluito de Capto MMC) de la etapa 2 se purifica aún más usando un gel de SP-Sepharose FF (GE HealthCare nº de catálogo 17-0729). Antes de la aplicación del producto, la columna se equilibra con tampón de equilibrio de SP-Sepharose, y la solución de proteínas se diluye para alcanzar la fuerza iónica y el pH del tampón de equilibrio, para que el FVIII pueda unirse al gel. La solución de proteínas diluida se aplica a la columna de SP Sepharose, que después se enjuaga con tampón de equilibrio y después se lava con tampón de lavado, seguido de la elución del FVIII, según se describe en la tabla 15.

Tabla 15. Tampones usados para la cromatografía de intercambio catiónico

Cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF)	Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de lavado	NaCl 1,5 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,05 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,34 mol/kg, CaCl ₂ 0,035 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,045 mol/kg, sorbitol 0,2 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5

Etapa 4: Etapa de reducción del ADN nº 2 (cromatografía aniónica)

- 5 La reducción secundaria del ADN se realiza con filtración a través de una membrana-Q (Sartobind Q, Sartorius). La membrana-Q se equilibra con tampón antes de la filtración (tabla 16).

Tabla 16. Tampón usado para la membrana-Q

membrana-Q/reducción del ADN	Tampón de equilibrio	NaCl 0,34 mol/kg, CaCl ₂ 0,035 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,045 mol/kg, sorbitol 0,2 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
------------------------------	----------------------	---

- 10 El SP-eluato de la etapa 3 se filtra a través de la membrana-Q, y el flujo que contiene el producto se recoge para su posterior procesamiento. La membrana se lava con tampón de equilibrio para recuperar el FVIII remanente en la membrana.

Etapa 5: Inactivación de los virus (tratamiento con disolvente/detergente (S/D))

Se inactivan los virus del filtrado de la etapa 4 mediante un tratamiento con S/D (disolvente/detergente) con Triton X-100 al 1 % y tri-(n-butyl)fosfato (TNBP) al 0,3 %. La inactivación de los virus se realiza en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

- 15 Etapa 6: Purificación con una resina de cromatografía de afinidad derivada de levaduras

La solución de FVIII con los virus inactivados de la etapa 5 se procesa a través de una columna de afinidad de VIIISelect según la descripción del ejemplo 7. Se cargan aproximadamente 5-20.000 UI de FVIII por ml de resina.

Etapa 7: Nanofiltración

- 20 El eluato de VIIISelect de la etapa 6 se nanofiltra para la eliminación de agentes adventicios potenciales, tales como virus sin envuelta, usando un nanofiltro Planova 20N (Asahi Kasei Medical). Se recoge el flujo que contiene el producto.

Etapa 8: Etapa de cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

- 25 La resina Q Sepharose FF se obtuvo de GE HealthCare (nº de catálogo 17-0510). El material de partida usado fue un nanofiltrado obtenido en la etapa 7, mientras que la sal y el pH se han ajustado para ser comparables con el tampón de equilibrio en la tabla 17. La solución de proteínas diluida se aplica a la columna de Q Sepharose FF con una carga de 5.000-25.000 UI/ml de gel, que después se enjuaga con tampón de equilibrio y después se lava con tampón de lavado, seguido de la elución del FVIII, según se describe en la tabla 17.

Tabla 17. Tampón usado para la etapa de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

Intercambiador aniónico/Q-Sepharose FF	Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 7,5
	Tampón de lavado	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 7,5
	Tampón de elución	NaCl 0,4 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 6,0

Etapa 9: Etapa de cromatografía de filtración en gel

5 Una resina de filtración en gel (Superdex 200pg, GE HealthCare nº de catálogo 17-1043) se cargó hasta una altura del lecho de 60-75 cm. El material de partida usado fue el Q-eluato obtenido en la etapa 8. La columna se equilibra con una composición fisiológica aceptable que protege el producto de la adsorción superficial y lo estabiliza durante la congelación, el almacenaje, la liofilización, etc. El Q-eluato se aplica a la columna de filtración en gel con un volumen del 2-8 % del volumen total de la columna. El eluato que contiene FVIII formulado, sin fragmentos ni agregados, se recoge después de la columna (GF-eluato).

10 Tabla 18. Resumen de los resultados sobre las etapas de purificación descritas en la etapa 1-4 de cuatro lotes de purificación a escala piloto (que proceden de aproximadamente 50 l (BPP077-078) y 100 l (BPP080-081) de material de suspensión celular (descrito en el ejemplo 1)

	BPP077	BPP078	BPP080	BPP081
Material de partida (descrito en el ejemplo 2)				
Peso (kg)	81	72	162	160
FVIII total (UI)	2327570	1699200	4032180	3870400
Rendimiento de FVIII (%)	100	100	100	100
Actividad específica* (UI/mg)	83	67	107	107
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	1,4*10 ⁸	5,93*10 ⁹	5,3*10 ⁹	-
MMC-eluato (etapa 2)				
Peso (kg)	3,5	4,4	10,9	9,6
FVIII total (UI)	412654	1023103	3844487	3428212
Rendimiento de FVIII (%)	24	70	104	96
Actividad específica* (UI/mg)	846	512	578	646
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	1,8*10 ⁵	1,1*10 ⁶	4,6*10 ⁶	-
SP-filtrado (etapa 4)				
Peso (kg)	3,1	3,3	5,0	4,6
Total (UI)	1524582	1025994	3430796	3000515
FVIII (%)	112	116	119	108
Actividad específica* (UI/mg)	1588	793	1362	1277
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	< 206	4463	1313	-
* Medido con Bradford				

ES 2 391 613 T3

Los lotes de recolección de captura BPP077 y BPP078 se reunieron con el lote de purificación corriente abajo BPP079, mientras que el lote BPP080 se denomina BPP083 y el lote BPP081 se denomina BPP084.

	BPP079	BPP083	BPP084
Material de partida (etapa 4)			
Peso (kg)	5476	4928	4220
FVIII total (UI)	1642680	2389094	2022646
Rendimiento de FVIII (%)	100	100	100
Actividad específica*** (UI/mg)	1107	1254	1210
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	3733	-	-
VIIISelect-eluato (etapa 6)			
Peso (g)	666	785	810
FVIII total (UI)	1251414	2094380	1674270
Rendimiento de FVIII (%)	76	88	83
Actividad específica*** (UI/mg)	8064	-	-
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	1554	-	-
Nanofiltrado (etapa 7)			
Peso (g)	7680	8205	9555
FVIII total (UI)	1051392	1822331	1763853
Rendimiento de FVIII (%)	94	88	97
Actividad específica (UI/mg)	-	-	-
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	< 730	-	-
Q-eluato (etapa 8)			
Peso (kg)	281	291	263
FVIII total (UI)	1002327	1755603	1857832
Rendimiento de FVIII (%)	95	96	105
Actividad específica*** (UI/mg)	10975	-	10312
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	47	43	< 14
GF-eluato (etapa 9)			
Peso (kg)	562	740	860
FVIII total (UI)	627754	1124800	926220
Rendimiento de FVIII** (%)	79	116	101
Actividad específica*** (UI/mg)	12275	10000	10663
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	-	< 66	-
* Rendimiento calculado sobre la etapa Q, ** Rendimiento calculado sobre la etapa GF, *** Medido con Bradford, **** Medido con análisis de aminoácidos			

La figura 3 muestra un patrón de tinción de plata de SDS-PAGE del producto final antes de la formulación (carril 3 - BPP083, carril 7 - BPP084) y después de la formulación (carril 6 - C810A139, carril 8 - C811A139), purificado según el ejemplo 9 (tabla 18-19). El carril 2 muestra un marcador molecular, el carril 3 muestra una muestra control de FVIII, y el carril 4 muestra un producto de FVIII disponible en el mercado (ReFacto® - lote C66202).

5 La figura 4 muestra una transferencia Western de FVIII usando anticuerpos anti-FVIII humano policlonales. Los carriles 1 y 10 están vacíos, el carril 2 muestra un patrón de masa molecular (Precision Plus Protein Western C de Bio-Rad), el carril 3 muestra un producto de FVIII disponible en el mercado (ReFacto® - lote C66202), los carriles 4-6 muestran muestras control de FVIII, los carriles 7-9 muestran los productos formulados finales de los lotes BPP079, BPP083 y BPP084 purificados según el ejemplo 9 (tabla 17-18). Las muestras se diluyeron hasta una
10 concentración de FVIII que corresponde a 5 UI de FVIII:C/ml antes de aplicar a la transferencia Western.

La figura 5 muestra un 2-D-PAGE tras la tinción con plata y la transferencia Western de los productos formulados finales de los lotes BBP079 y BPP083, el producto final (GF-eluato) del lote BPP079 y el GF-eluato del lote BPP083, purificados según el ejemplo 9 (tabla 17-18). Se empleó un producto de FVIII disponible en el mercado (ReFacto® - lote 70591) como referencia. Panel izquierdo: imágenes teñidas con plata de geles con los GF-eluatos de BPP079 y BPP083 y ReFacto®. Panel derecho: imágenes de la transferencia Western con GF-eluatos de BPP083 y ReFactor®.
15

Conclusión del ejemplo 9

El procedimiento de purificación descrito puede realizarse a escala industrial de una manera que es reproducible con respecto a la recuperación, la pureza y la calidad del producto. Además, cumple la alta demanda de pureza para poder usar el producto para el tratamiento de seres humanos.
20

Ejemplo 10: Escala industrial de la secuencia de purificación sin ligando de afinidad específico (resina multimodal aniónica; ahora Capto Adhere)

Para estudiar la reproducibilidad de la recuperación y la pureza, se realizaron las etapas de purificación 2-3 (Capto MMC y SP Sepharose FF) y la etapa 5 (inactivación de los virus), según se describe en el ejemplo 9, para dos lotes (BPP068-069) a escala piloto. Después los dos lotes se reunieron en un lote corriente abajo (BPP071) y se procesó según la etapa 6-9 en el ejemplo 9, con la excepción de que la etapa 6 (el gel de VIIISelect) se sustituyó por una etapa de cromatografía multimodal de intercambio aniónico (Capto Adhere). La secuencia de purificación completa puede estudiarse en el apéndice 2. Cada lote (BPP068-069) procede de una suspensión de células de aproximadamente 50 l, según se describe en el ejemplo 1-2.
25

La etapa de Capto Adhere

La columna multimodal de intercambio aniónico (Capto Adhere, GE HealthCare, nº de catálogo 17-5444) se cargó en el intervalo de 5.000-10.000 UI de FVIII/ml de resina. El gel, antes de la aplicación del producto, se equilibra con tampón de equilibrio. La solución con virus inactivados (según se describe en el ejemplo 9, etapa 5) se carga en la columna de Capto Adhere que después se enjuaga con tampón de equilibrio y se lava secuencialmente con tampón de lavado 1-3, seguido de la elución del FVIII, según se describe en la tabla 20.
30
35

Tabla 20

Cromatografía multimodal/Capto Adhere	Tampón de equilibrio	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 7
	Tampón de lavado 1	NaCl 2 mol/kg, CaCl ₂ 0,05 mol/kg, L-histidina 0,05 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de lavado 2	NaCl 0,1 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de lavado 3	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,3 mol/kg, etilenglicol al 20 % (en p/p), polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, hidrocloreuro de L-arginina 0,8 mol/kg, polisorbato 80 al 0,02 % (en p/p), pH 6,5

ES 2 391 613 T3

Tabla 21. Resumen de los resultados a lo largo de las dos primeras etapas de cromatografía (según el ejemplo 9, etapa 2-3) de dos lotes de purificación a escala piloto

	BPP068	BPP069
Material de partida (según se describe en el ejemplo 1-2)		
Peso (kg)	98,6	110,5
FVIII total (UI)	734.570	596.700
Rendimiento de FVIII (%)	100	100
Actividad específica* (UI/mg)	43	52
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	2,1*10 ⁹	7,1*10 ⁸
Eluato de Capto MMC (etapa 2 del ejemplo 9)		
Peso (kg)	3,8	4,0
FVIII total (UI)	500.813	389.814
Rendimiento de FVIII (%)	68	65
Actividad específica* (UI/mg)	449	596
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	3,4*10 ⁷	3,5*10 ⁷
Eluato de SP (etapa 3 del ejemplo 9)		
Peso (kg)	2,2	3,1
FVIII total (UI)	368.903	315.000
Rendimiento de FVIII ¹⁾ (%)	88	79
Actividad específica* (UI/mg)	1490	2071
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	1,6*10 ⁷	4,3*10 ⁶
1) Rendimiento calculado sobre la etapa de SP.		
* Medido con Bradford		

5

Tabla 22. Resumen de los resultados a lo largo de las etapas de cromatografía (etapa 5 - ejemplo 9, Capto Adhere, etapa 8-9 - ejemplo 9) en la parte corriente debajo de un lote de purificación a escala piloto

	BPP071
Material de partida (etapa 5 del ejemplo 9)	
Peso (kg)	5,2
FVIII total (UI)	568.326
Rendimiento de FVIII (%)	100
Actividad específica (UI/mg)	-
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	-
Eluato de Capto Adhere	
Peso (g)	296

FVIII total (UI)	543.752
Rendimiento de FVIII ²⁾ (%)	96
Actividad específica* (UI/mg)	5117
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	2,5*10 ⁵
Q-eluito (etapa 8, ejemplo 9)	
Peso (g)	244
FVIII total (UI)	266212
Rendimiento de FVIII ³⁾ (%)	52
Actividad específica (UI/mg)	-
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	1121
G-eluito (etapa 9, ejemplo 9)	
Peso (g)	12
FVIII total (UI)	5610
Rendimiento de FVIII ⁴⁾ (%)	84
Actividad específica* (UI/mg)	8061
Contenido de ADN (pg/1000 UI)	836
2) Rendimiento calculado sobre la etapa de Capto Adhere.	
3) Rendimiento calculado sobre la etapa de Q Sepharose.	
4) Rendimiento calculado sobre la etapa de filtración en gel.	
*Medido con Bradford	

5 La figura 6 muestra un gel teñido con plata de SDS-PAGE de las muestras del lote piloto BPP071 purificadas según el ejemplo 10. El carril 1 muestra un producto de FVIII disponible en el mercado (ReFactor®). El carril 2 muestra el material de partida (SP-filtrado) antes de la etapa de Capto Adhere. El carril 3 muestra el perfil de pureza del eluito de Capto Adhere. El carril 4 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-filtrado - Capto Adhere - Q Seph. El carril 5 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-filtrado - Capto Adhere - Q Seph - filtración en gel.

10 La figura 7 muestra un gel de un transferencia Western de muestras procedentes del lote piloto BPP071 purificadas según el ejemplo 10. El carril 1 muestra un producto de FVIII disponible en el mercado (ReFactor®). El carril 2 muestra el eluito de Capto Adhere. El carril 3 muestra el resultado de la secuencia de purificación SP-filtrado - Capto Adhere - Q Seph. El carril 4 muestra los resultados después de la secuencia de purificación SP-filtrado - Capto Adhere - Q Seph - filtración en gel.

Conclusión del ejemplo 10

15 El procedimiento de purificación a escala piloto, que incluye una etapa de cromatografía multimodal (Capto Adhere) en lugar del ligando de afinidad de VIIISelect, revela la misma recuperación, pureza y calidad del producto en el GF-eluito final.

Descripción de los análisis

FVIII:C, procedimiento de selección basado en Coatest

20 El procedimiento se basa en el principio de dos etapas, y se realizó usando una técnica de microplaca. En la etapa uno, se genera el factor X activado (Xa) a través de la vía intrínseca, en la que FVIII:C actúa como cofactor. En la etapa dos, se determina después el factor Xa mediante el uso de un sustrato cromogénico sintético, S-2222, en

presencia de un inhibidor de trombina, I-2581, para evitar la hidrólisis del sustrato por la trombina. La reacción se detiene con ácido, y se determina la actividad VIII:C, que es proporcional a la liberación de pNA (para-nitroanilina), de modo fotométrico a 405 nm contra un reactivo blanco.

5 El procedimiento cumple los requisitos de la Farmacopea Europea. Las unidades de FVIII:C se expresan en unidades internacionales (UI) según se define en el actual International Concentrate Standard (IS), establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El procedimiento que usa tampón que contiene BSA al 1 % en lugar de plasma de hemofílicos graves para prediluciones se ha validado. Véanse también las referencias bibliográficas (European Pharmacopoeia Supplement 2000, General Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosén S. (1984), Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate, *J. Haematol. Suppl.*, 40, vol. 33, 139-145, 1984; Carlebjörk G., Oswaldsson U., Rosén S. (1987), A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity, *Thrombosis Research*, 47:5-14, 1987; Mire-Sluis A.R., Gerrard T., Gaines das R., Padilla A. y Thorpe R., *Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products*, Biological, 24, 351-362 (1996)).

Determinación del contenido total de proteínas según Bradford

15 La determinación de las proteínas según Bradford se basa en la observación de que el máximo de absorbancia para una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión de proteínas. Tanto las interacciones hidrófobas como las interacciones iónicas estabilizan la forma aniónica del tinte, provocando un cambio visible en el color. El ensayo es útil puesto que el coeficiente de extinción de la solución del complejo de tinte-albumina es constante a lo largo de un intervalo de concentración en 10 veces. Véase también la referencia, Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254. 1976, para más información.

Determinación de las proteínas totales según el análisis de aminoácidos (AAA)

25 Antes del AAA se hidrolizan todas las proteínas mediante HCl 6 M durante 24 h a 110 °C. Los aminoácidos se separan mediante una cromatografía de intercambio catiónico sobre resinas de poliestireno sulfonadas y se detectan de modo continuo en el eluyente. La detección se basa en una derivatización con ninhidrina después de la columna usando un fotómetro dual para la medición simultánea a 440 nm para la prolina y la hidroxiprolina, y a 570 nm para el resto de los aminoácidos. Los aminoácidos asparagina y glutamina se desamidán durante el AAA y se determinan como ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. Así, los resultados del ácido aspártico y ácido glutámico representan la suma de ácido aspártico/asparagina (Asx) y ácido glutámico/glutamina (Glx), respectivamente, en la muestra original. El triptófano no genera una respuesta diferenciada usando este procedimiento y, por tanto, no se cuantifica mediante AAA. La cisteína se destruye durante la hidrólisis y no se cuantifica. El AAA se describe más a fondo en la referencia: Total protein AAA analytical method, Spackman, D.H., Stein, W.H., y Moore, S. (1958), *Anal. Biochem.*, 30:1190-1206.

35 Pureza o actividad específica (FVIII:C/proteína total)

La pureza (o también denominada actividad específica) de una muestra se calcula tomando el valor obtenido del análisis de FVIII:C y dividiéndolo entre el valor obtenido del análisis de las proteínas totales.

SDS-PAGE (distribución del peso molecular)

40 La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas basándose en su tamaño. Este procedimiento describe la SDS-PAGE de proteínas, que se realiza bajo condiciones reducidas. Calentando la muestra bajo condiciones de desnaturalización y reducción, las proteínas se despliegan y se revisten con el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS), adquiriendo una alta carga negativa neta que es proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica. Cuando se cargan sobre una matriz de gel de poli(acrilamida) y se colocan en un campo eléctrico, las moléculas de proteína cargadas negativamente migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan mediante un efecto de tamiz molecular, es decir, por su peso molecular. Los geles de poli(acrilamida) implican que las moléculas más grandes migren con tanta rapidez como las moléculas más pequeñas. Debido a que la proporción de carga a masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de las proteínas depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración relativa de una proteína (R_f) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si se ensayan proteínas de masa conocida de modo simultáneo con las proteínas desconocidas, puede representarse gráficamente la relación entre R_f y la masa, y calcularse las masas de proteínas desconocidas. Las bandas de proteínas separadas mediante electroforesis se visualizan mediante tinción con plata. La evaluación se realiza de modo visual juzgando el aspecto de los patrones, la referencia (muestra control) y las muestras analizadas.

Procedimiento analítico de ADN (reacción en cadena de polimerasa cuantitativa, qPCR)

5 El ensayo es un ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), basado en la química de SYBR verde 1. Se basa en una publicación de Umetani et al. con algunas mejoras añadidas (Umetani N., Kim J., Hiramatsu S., Reber H.A., Hines O.J., Bilchik A.J. y Hoon D.S.B., Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats, Clin. Chem., 2006, 52:1062-1069). Durante cada ciclo de PCR los cebadores amplifican un fragmento de 115 pares de bases de las familias de la secuencia ALU, ALU115-F y ALU115-R. La familia de la secuencia ALU, muy abundante, se limita al genoma de la familia *Hominidae* (chimpancé, gorila, ser humano y orangután), pero el ensayo sólo amplifica el ADN de origen humano. El procedimiento permite un análisis de alta capacidad de procesamiento del ADN residual de HEK293F en un medio de cultivo de tejidos sin células y sus procedimientos de purificación cadena abajo.

10 Transferencia Western, distribución de la masa molecular de FVIII

15 Las proteínas y los péptidos en las preparaciones de FVIII se separan según la masa molecular mediante una electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones reductoras. Después, las proteínas se trasladan electroforéticamente desde la matriz de gel hacia una membrana de nitrocelulosa que después se incuba con un agente de bloqueo. Entonces se añade anticuerpos de oveja policlonales dirigidos a la molécula de FVIII completa, seguido de un anticuerpo secundario que es específico para la parte Fc de los anticuerpos de cabra/oveja. Como tercera etapa se añaden complejos de anticuerpo de cabra con peroxidasa de rábano (HRP) y HRP. Entonces pueden detectarse los polipéptidos de FVIII mediante la aparición de bandas azules después de una incubación con el sustrato 4-cloro-1-naftol.

20 Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2-D PAGE)

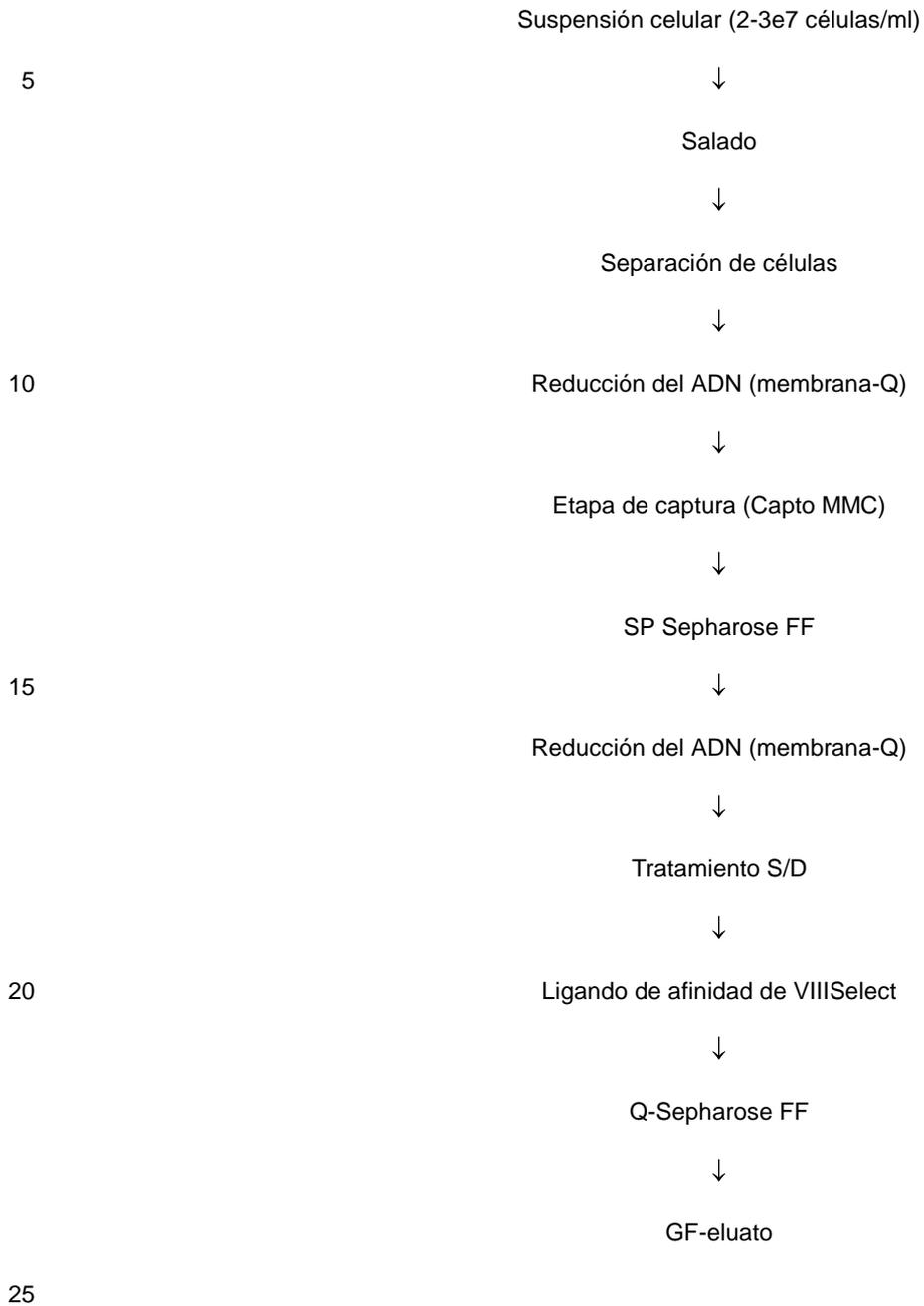
25 La 2-D PAGE se realizó para estudiar el patrón de bandas electroforéticas de las cadenas de proteína del cl rhFVIII humano. Se realizó un enfoque isoeléctrico como el ensayo en la primera dimensión usando un gradiente de pH lineal de pH 3 a 10. La segunda dimensión del SDS-PAGE se realizó usando geles de gradiente de poliacrilamida (al 3-8 %). Los geles se tiñeron con tinte de plata tras el ensayo en la segunda dimensión, o se sometieron a una transferencia Western (O'Farrell P.H. (1975), High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, J. Biol. Chem., 250: 4007-4021).

REIVINDICACIONES

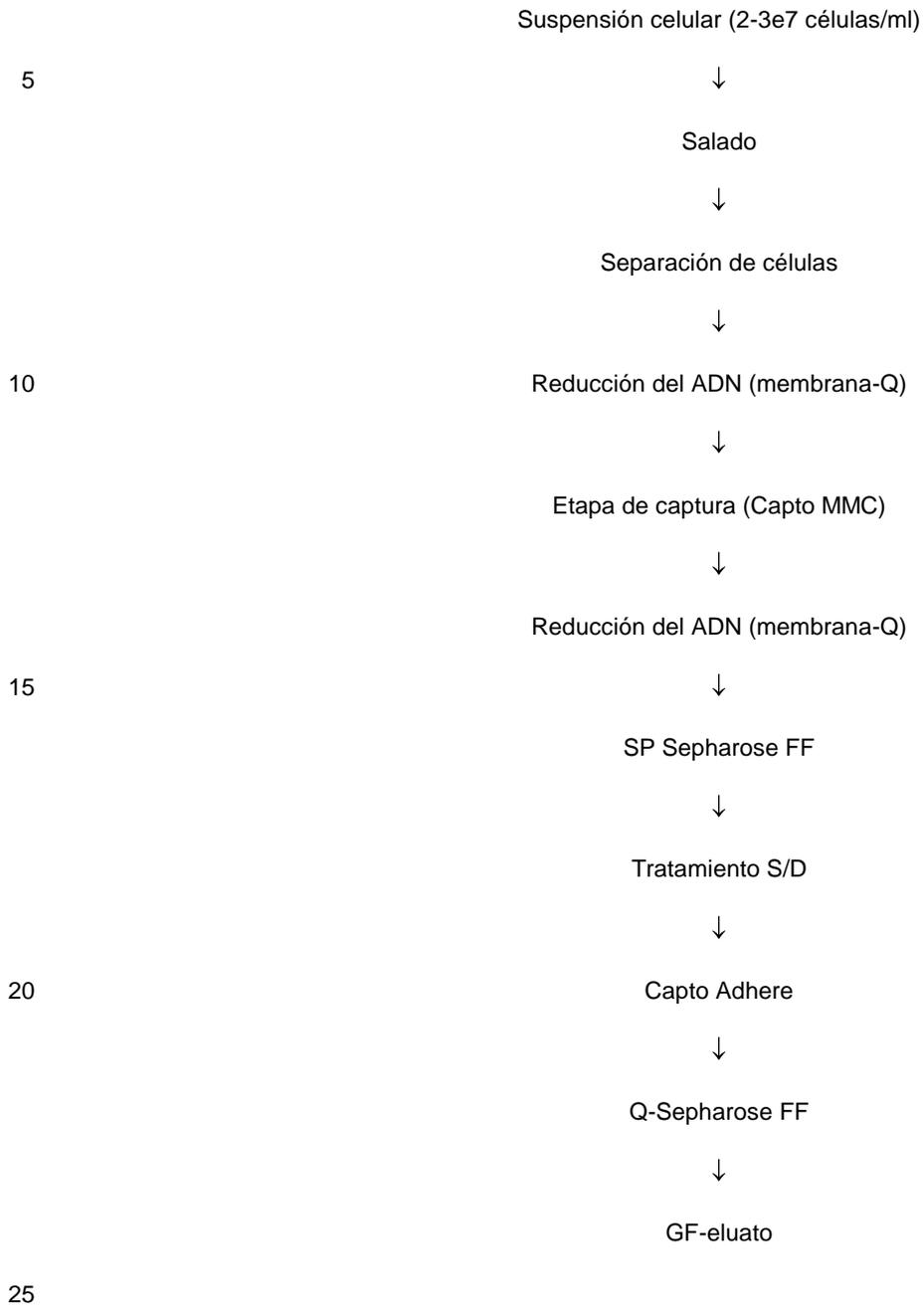
- 5 1.- Un procedimiento para purificar o enriquecer el FVIII de coagulación empleando cromatografía en una resina multimodal que tiene restos unidos a una matriz, y siendo los restos capaces de interactuar con FVIII en una mezcla mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- proporcionar una fracción que contiene FVIII en una solución acuosa que tiene una alta fuerza iónica;
 - poner en contacto la fracción que contiene FVIII con la resina multimodal;
 - opcionalmente, lavar la resina multimodal que tiene el FVIII adsorbido con un tampón de lavado acuoso;
 - 10 - eluir las fracciones que contienen FVIII mediante un tampón de elución acuoso formado por al menos un aminoácido que está cargado positivamente a pH 6 a 8, seleccionado de lisina, arginina, histidina y sus combinaciones; y
 - opcionalmente, recoger las fracciones que contienen FVIII en forma purificada o enriquecida.
- 15 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la resina multimodal comprende restos unidos a una matriz y los restos son capaces de interactuar con FVIII en un entorno acuoso mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones, tales como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas.
- 3.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **que se caracteriza porque** el FVIII es FVIII recombinante, en particular FVIII con el dominio B deletado.
- 20 4.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, **que se caracteriza porque** la solución acuosa comprende FVIII en una solución con un alto contenido de sales que se corresponde con una conductividad de aproximadamente 25 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C.
- 5.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, **que se caracteriza porque** está presente lisina, arginina o histidina en concentraciones > 0,4 M, en particular > 0,5 M.
- 25 6.- El procedimiento de las reivindicación 5, **que se caracteriza porque** el tampón de elución comprende además compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo hidroxilo, tales como un alcohol, compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo amino, tales como un aminoácido, al menos una fuente que proporciona iones Ca^{2+} , al menos un compuesto para regular la fuerza iónica del tampón, tal como sales inorgánicas, al menos un detergente no iónico, y al menos una sustancia tamponante para regular el pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, en particular a aproximadamente un valor neutro.
- 30 7.- El procedimiento de las reivindicación 6, **que se caracteriza porque** el alcohol se selecciona del grupo que consiste en metanol, propanol, etilenglicol y propilenglicol; la fuente que proporciona Ca^{2+} es CaCl_2 ; las sales inorgánicas se seleccionan del grupo que consiste en KCl y NaCl; el detergente no iónico se selecciona del grupo que consiste en Tween 20, Tween 80 y Pluronic F68; la sustancia tamponante se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, histidina, HEPES, MES y acetato de sodio a un pH entre 6-8.
- 35 8.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, **que se caracteriza porque** el tampón de lavado se aplica a la resina multimodal para arrastrar los contaminantes y conservar el FVIII, antes de liberar el FVIII.
- 9.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **que se caracteriza porque** la resina de cromatografía "multimodal" contiene al menos uno de los siguientes restos:
- a. un ligando de N-bencil-N-metiletanolamina cargado positivamente,
 - 40 b. un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente,
 - c. un ligando de fenilpropilo,
 - d. un ligando de N-hexilo,
 - e. un ligando de 4-mercaptoetilpiridina,
 - 45 f. un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)amino)fenil)amino)benzoico, o cualquiera de sus combinaciones.

- 10.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **que se caracteriza porque** la resina de cromatografía "multimodal" se selecciona de las siguientes resinas disponibles en el mercado: HEP Hypercel™; PPA Hypercel™ ; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.
- 5 11.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **que se caracteriza porque** la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad de FVIII en la que la afinidad es proporcionada por un ligando a base de una proteína expresada en levaduras.
- 10 12.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **que se caracteriza porque** la secuencia de purificación comprende además etapas de inactivación/eliminación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación basada en procesos químicos, una etapa de eliminación basada en el tamaño, etapas cromatográficas o cualquiera de sus combinaciones, basándose dichas etapas en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno que se va a eliminar.
- 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **que se caracteriza porque** la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:
- 15 i. una membrana aniónica, tal como Sartobind Q, en particular para la reducción del ADN;
- ii. una resina multimodal catiónica, tal como Capto MMC;
- iii. una resina de intercambio catiónico, tal como SP Sepharose FF;
- iv. una membrana aniónica, tal como Sartobind Q, en particular para una reducción adicional del ADN;
- v. una etapa de inactivación basada en procesos químicos para los virus con envuelta lipídica, en particular la inactivación con disolvente/detergente empleando fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100;
- 20 vi. una resina de afinidad a base de un ligando de proteína, tal como VIIISelect, consistiendo el ligando de VIIISelect en un fragmento de anticuerpo expresado en levaduras, o una resina de cromatografía multimodal aniónica, tal como Capto Adhere;
- vii. una etapa de eliminación de patógenos mediante filtración con un tamaño medio de poro de aproximadamente 20 nm, tal como Planova 20N;
- 25 viii. una resina de intercambio aniónico, tal como Q Sepharose FF;
- ix. una resina de cromatografía de exclusión molecular, tal como Superdex 200pg.
- 14.- El procedimiento de la reivindicación 13, **que se caracteriza porque** las condiciones de elución para FVIII de la etapa de intercambio catiónico se basan en Ca, la concentración varía de 0,15-0,25 M y la conductividad total del tampón de elución no es mayor que 25 mS/cm a 25 °C.
- 30 15.- El procedimiento de la reivindicación 13 y/o 14, **que se caracteriza porque** la pureza después de la última etapa de purificación es > 4.000 UI/mg, preferiblemente > 9.000 UI/mg, y más preferiblemente >10.000 UI/mg de proteína, y porque en contenido de ADN es < 1.000pg/1.000 UI de FVIII, preferiblemente <1 00pg/1.000 UI de FVIII.

Apéndice 1



Apéndice 2



Apéndice 3

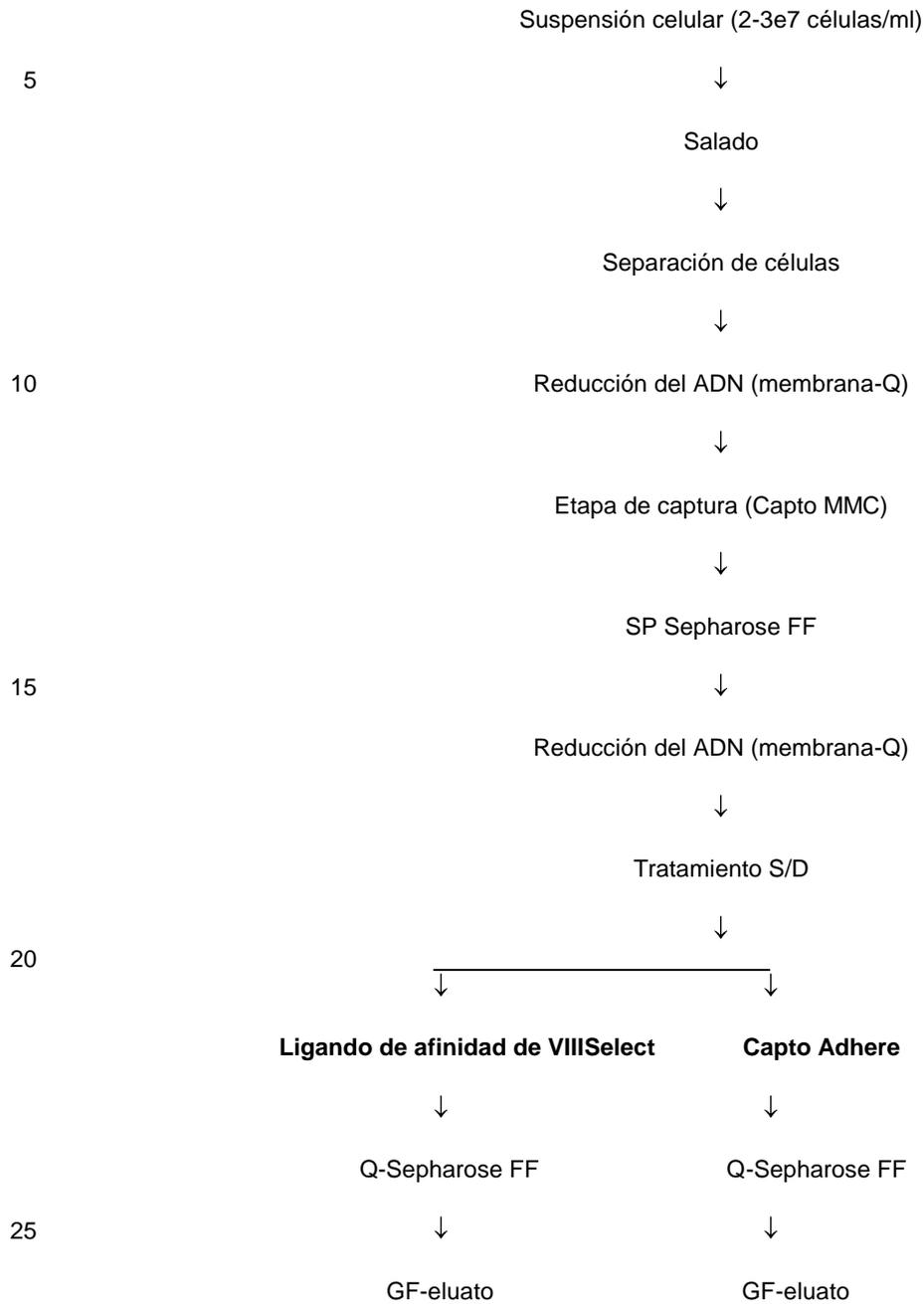


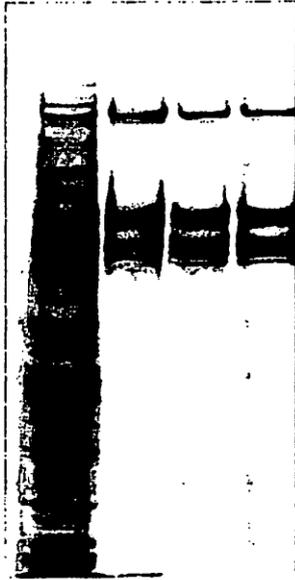
Figura 1



Carril 1 2

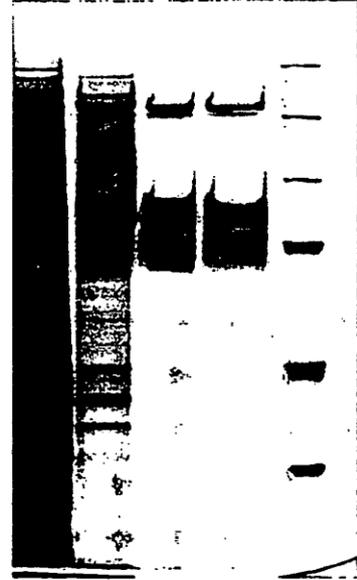
Figura 2

Esquema de VIIISelect



Carril 1 2 3 4

Esquema de Capto Adhere



5 6 7 8 9

Figura 3

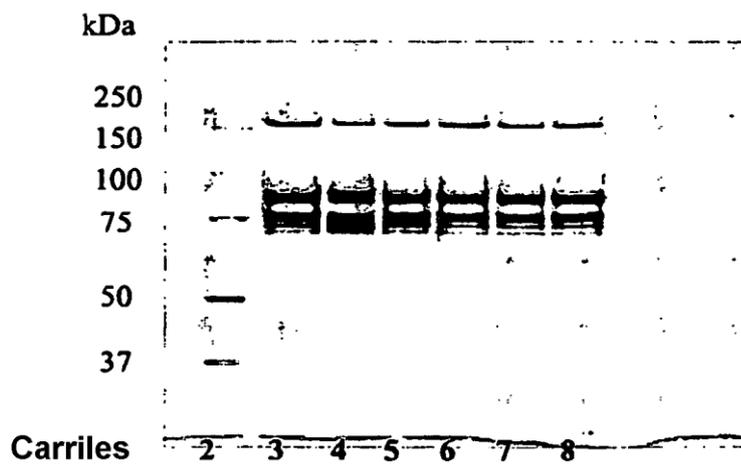


Figura 4

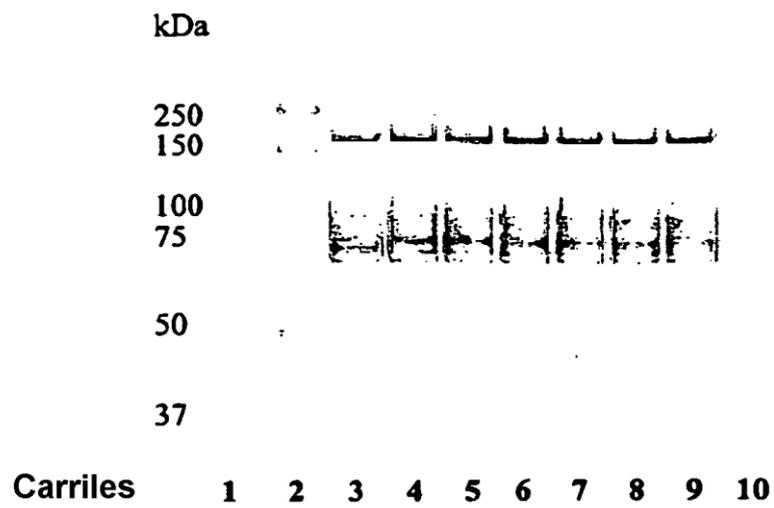


Figura 5a

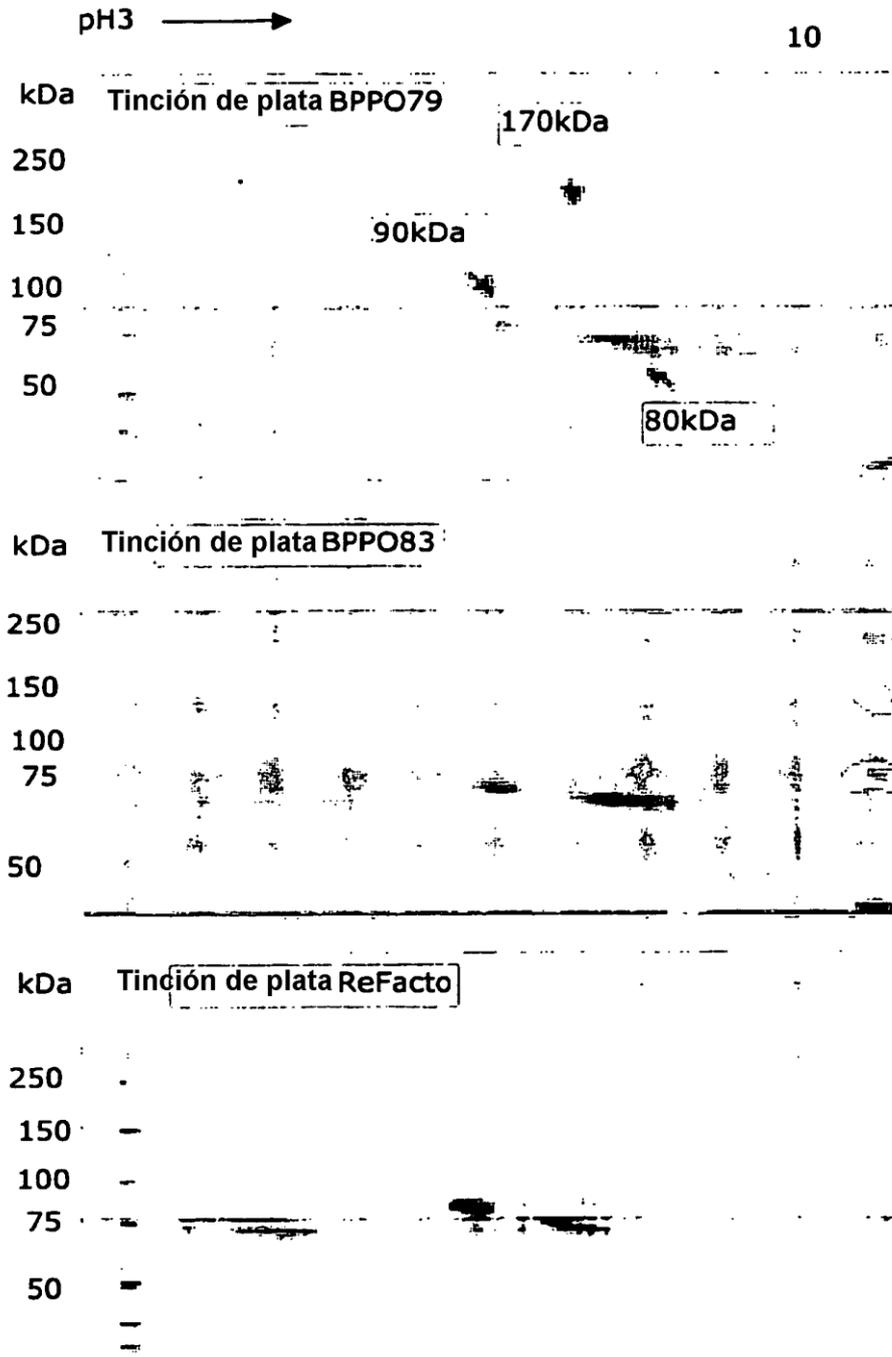


Figura 5b

kDa Transf. Western BPPO83

250
150
100
75
50



kDa Transf. Western ReFacto

250
150
100
75
50

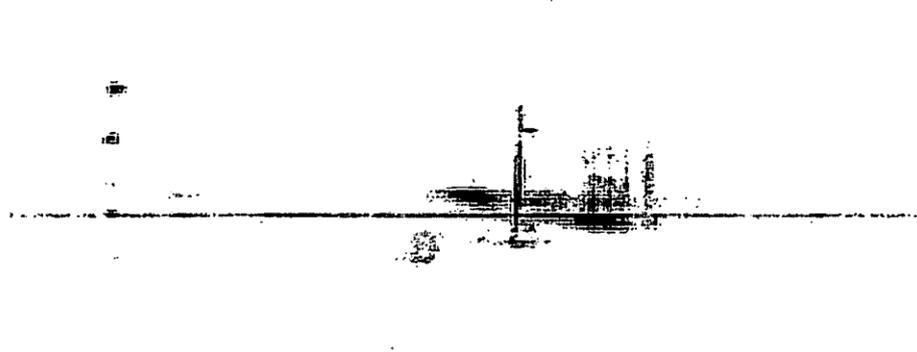


Figura 6

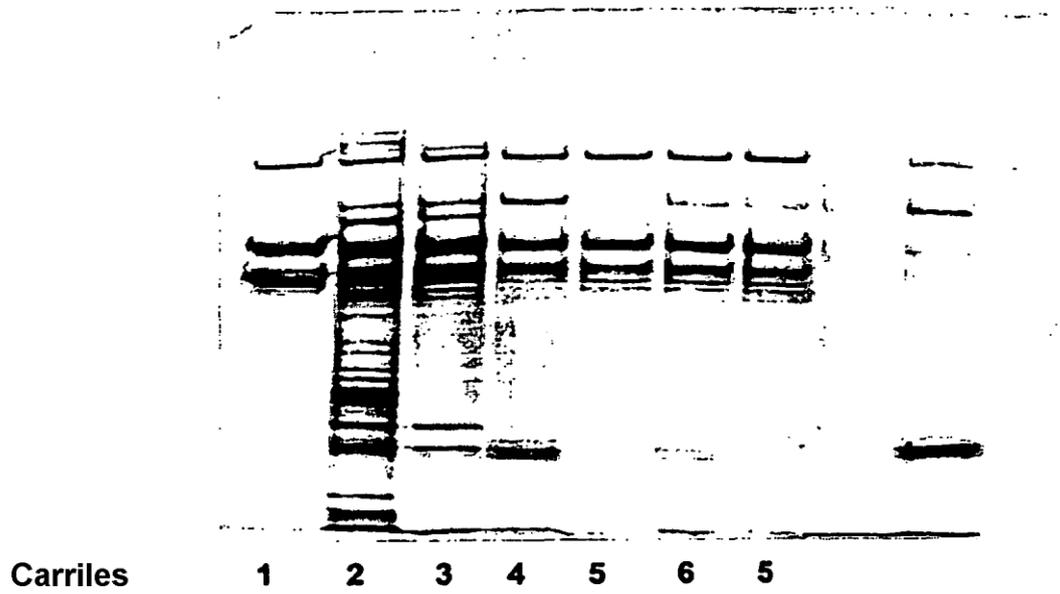


Figura 7

