

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 544**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2005** **E 05850495 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **12.09.2007** **EP 1831242**

54 Título: **Reducción del contenido de contaminantes proteínicos en composiciones que comprenden una proteína dependiente de la vitamina K de interés**

30 Prioridad:

23.12.2004 DK 200402008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.02.2013

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
ANDREASSTRASSE 15
8050 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**KRARUP, JANUS;
HANSEN, THOMAS BUDDE;
ARENTSEN, ANNE CHARLOTTE;
RASMUSSEN, DANIEL E.;
BOGSNES, ARE;
STABY, ARNE;
AHMADIAN, HALEH y
BANG, SUSANNE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 395 544 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

Reducción del contenido de contaminantes proteínicos en composiciones que comprenden una proteína dependiente de la vitamina K de interés

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de proteínas dependientes de la Vitamina K que tienen un contenido muy bajo, o insignificante, de contaminantes proteínicos. La presente invención se refiere a métodos aplicables en la preparación de estas composiciones de proteínas dependientes de la Vitamina K. En particular, los métodos de la invención son para reducir el contenido de Proteína S en una composición formada por una proteína recombinante dependiente de la Vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo celular. Estos métodos se pueden utilizar ya sea solos o en combinación secuencial con el propósito de reducir el contenido relativo de contaminantes proteínicos. La presente invención es particularmente relevante en la preparación de composiciones de factores de coagulación seleccionados de los polipéptidos del Factor X (FX/FXa), polipéptidos del Factor IX (FIX/FIXa), polipéptidos del Factor VII (FVII/FVIIa) y la Proteína C anticoagulante, en particular los polipéptidos del Factor VII.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] En la producción de proteínas recombinantes a partir de cultivos de microorganismos o líneas de células, el paso de producción final es la recuperación y opcionalmente la concentración del producto de interés. Los medios de cultivo en los cuales se han desarrollado las células y los cuales contienen proteínas secretadas y, en particular, lisados de células que contienen proteínas intracelulares de interés también contienen, a un grado mayor o menor, otras proteínas producidas por las células, además de otros contaminantes, tales como componentes de medios, ácidos nucleicos y similares. A fin de obtener un producto proteínico purificado, por lo tanto es necesario separar la proteína de interés de otras proteínas y polipéptidos y otras impurezas en el material crudo que contiene la proteína de interés.

[0003] Frecuentemente es difícil retirar el contaminante proteínico que comprende dominios del mismo carácter que el polipéptido de interés.

[0004] Las proteínas dependientes de la vitamina K se distinguen de otras proteínas al compartir una característica estructural común en su parte terminal amino de la molécula. La terminal N de estas proteínas, también referida como el dominio Gla, es rica en el aminoácido inusual ácido γ -carboxiglutámico el cual es sintetizado a partir de glutamato en una reacción dependiente de la vitamina K catalizada por la enzima γ -glutamylcarboxilasa. Debido a la presencia de aproximadamente 2 a 12 residuos de Gla, el dominio Gla está caracterizado por ser capaz de enlazar cationes divalentes tales como Ca^{2+} . Con el enlace de los iones metálicos, estas proteínas se someten a cambios conformacionales los cuales pueden medirse por medio de varias técnicas tal como el dicroísmo circular y la emisión de fluorescencia.

[0005] El descubrimiento de cambios conformacionales inducidos por metales de proteínas que contienen Gla (Nelsestuen et al., J. Biol. Chem. 1976; 251, 6886-6893) junto con la identificación de anticuerpos policlonales específicos para la conformación (Furie et al., J. Biol. Chem. 1978; 253, 8980-8987) abrió la puerta para la introducción de la cromatografía de inmovilización específica para la conformación. Estos anticuerpos pudieron reconocer y unirse al dominio Gla en presencia de iones Ca^{2+} pero liberaron la proteína con la remoción de los iones Ca^{2+} utilizando un quelador tal como EDTA o citrato.

[0006] En la década de 1980, la cromatografía de pseudoafinidad específica para la conformación se desarrolló haciendo uso de la propiedad única de las proteínas que contenían Gla para someterse a cambios inducidos por metales en la conformación. La cromatografía de pseudoafinidad difiere de la cromatografía de afinidad convencional debido a que no existe un ligando de afinidad inmovilizado que esté implicado y se realiza sobre una matriz cromatográfica convencional (Yan S. B., J. Mol. Recog. 1996; 9, 211-218). La proteína Gla puede ser absorbida en un material de intercambio aniónico al eliminar los iones metálicos divalentes. Posteriormente, la elución se realiza al agregar Ca^{2+} al tampón de elución.

[0007] En 1986, Bjørn y Thim reportaron la purificación del Factor VII recombinante en un material de intercambio aniónico tomando ventaja de la propiedad de enlaces de Ca^{2+} del dominio Gla del Factor VII (Bjørn S. y Thim L., Research Disclosure, 1986, 26960-26962.). La absorción se logró en un tampón sin Ca^{2+} y la elución del Factor VII fue posible utilizando un tampón que contenía Ca^{2+} con una baja intensidad iónica y bajo condiciones suaves.

[0008] Yan et al. han utilizado el mismo principio para la purificación de la Proteína C humana recombinante (Yan S. B. et al., Bio/technology. 1990; 8, 655-661).

[0009] Mientras que la presencia del dominio Gla proporciona una ventaja para la separación de proteínas que contienen Gla de otras proteínas, los inventores de la presente invención observaron que propiedades similares y el comportamiento de las proteínas que contienen Gla hace difícil separarlas unas de las otras. Varios anticuerpos específicos conformacionales

producidos contra unas proteínas Gla muestran reactividad cruzada con otras proteínas Gla (Furie B. y Furie B., J. Biol. Chem. 1979; 254, 9766-9771; Church et al., J. Biol. Chem. 1988; 263, 6259-6267).

[0010] Brown et al. (Brown et al., J. Biol. Chem. 2000; 275, 19795-19802.) han reportado anticuerpos monoclonales que son específicos para los residuos Gla. Estos anticuerpos podrían reconocer todas las proteínas Gla sometidas a prueba: Factor VII, Factor IX, Factor II, Proteína C, Proteína S, GAS-6, proteína Gla de matriz ósea, conantocina G.

[0011] Las proteínas con un dominio GLA comprenden, pero no están limitadas a, las siguientes proteínas: GAS-6, Proteína S, Factor II (Protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Proteína C, Factor VII/VIIa, Proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína Gla de Matriz y Osteocalcina.

[0012] El documento US 5,633,350 describe un método para la separación de proteínas dependientes de la vitamina K a partir de proteínas complementarias no dependientes de la vitamina K.

[0013] La necesidad de separar eficientemente una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, tal como un polipéptido que contiene el dominio Gla de interés, a partir de contaminantes proteínicos es un problema particularmente relevante cuando se trata de la purificación de estos polipéptidos producidos en cultivos celulares, debido a que la célula huésped (la cual puede no ser una línea de células humana) puede producir cantidades significativas de contaminantes proteínicos que pueden causar reacciones inmunogénicas indeseables con el uso del polipéptido.

[0014] De esta manera, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos adecuados para la reducción o incluso la eliminación del contenido de contaminantes proteínicos en composiciones que comprendan una proteína dependiente de la vitamina K de interés. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar composiciones que comprendan una proteína dependiente de la vitamina K de interés con un contenido muy bajo o aún insignificante de contaminantes proteínicos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0015] La invención se refiere a varios métodos para reducir o incluso eliminar el contenido de Proteína S en composiciones que comprenden una proteína dependiente de la vitamina K de interés.

Proteínas dependientes de la vitamina K de interés

[0016] La presente invención se refiere en un amplio aspecto a la purificación de una proteína dependiente de la vitamina K de interés y composiciones descritas aquí como purificadas que comprenden estas proteínas. El término “de interés” se aplica en este documento como un indicador a la especie particular (una proteína dependiente de la vitamina K) la cual es relevante para la obtención en la forma más pura, por ejemplo con el propósito de utilizar la proteína dependiente de la vitamina K en un contexto terapéutico.

[0017] Los métodos descritos en este documento pueden ser aplicables en principio a la purificación de cualquier proteína dependiente de la vitamina K que comprenda, pero que no está limitada a, GAS-6, Proteína S, Factor II (Protrombina), Trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Proteína C, Factor VII/VIIa, Proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína Gla de Matriz y Osteocalcina), en particular los factores de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionados de los polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada. El método se utiliza para la purificación de proteínas dependientes de la vitamina K recombinantes de interés que son producidas bajo condiciones de cultivos de células, en particular cultivos de células no humanas.

[0018] En una forma de realización particular, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX, tal como FIX y FIXa.

[0019] En otra forma de realización particular, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII, tal como el polipéptido relacionado con el Factor VII, o derivados del Factor VII o un conjugado del Factor VII, en particular un polipéptido del Factor VII humano, en particular el Factor VII humano de tipo natural o el Factor VIIa humano de tipo natural.

[0020] Como se utiliza en este documento, los términos “polipéptido del Factor VII” y “polipéptido FVII” significan cualquier proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos 1-406 del Factor VIIa humano de tipo natural (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la patente norteamericana No. 4 784 950), variantes del mismo así como también polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII. Esto incluye las variantes del Factor VII, polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII que exhiben sustancialmente una actividad biológica igual o mejorada con relación al Factor VIIa humano de tipo natural.

[0021] Los términos “Factor VII” o “FVII” se proponen para incluir los polipéptidos del Factor VII en su forma escindida (zimógeno), así como también aquellas que han sido procesadas proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, las cuales pueden designarse como el Factor VIIa. Típicamente, el Factor VII es escindido entre los residuos 152 y 153 para producir el Factor VIIa. Estas variantes del Factor VII pueden exhibir diferentes propiedades con relación al Factor VII humano, inclusive estabilidad, enlaces de fosfolípidos, actividad específica alterada y similares.

[0022] Como se utiliza en este documento, “Factor VII humano de tipo natural” es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la patente norteamericana No. 4 784 950.

[0023] Como se utiliza en este documento, “polipéptidos relacionados con el Factor VII” incluye polipéptidos, inclusive variantes (o análogos), en los cuales la actividad biológica del Factor VIIa ha sido modificada sustancialmente, tal como reducida, con relación a la actividad del Factor VIIa de tipo natural. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, el Factor VII o el Factor VIIa en el cual se han introducido alteraciones de secuencias de aminoácidos que modifican o alteran la bioactividad del polipéptido.

[0024] El término “derivado del Factor VII”, como utilizado en este documento, se propone para designar un polipéptido del Factor VII que exhibe una actividad biológica sustancialmente igual o mejorada con relación al Factor VII de tipo natural, en el cual uno o más aminoácidos del péptido precursor han sido modificados genética y/o química y/o enzimáticamente, por ejemplo por medio de la alquilación, glicosilación, PEGilación, GlicoPEGilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similares. Esto incluye pero no está limitado a Factor VIIa humano conjugado a PEG, Factor VIIa humano conjugado a cisteína-PEG y variantes de los mismos. Los ejemplos no limitantes de derivados del Factor VII incluyen derivados del Factor VII conjugados a GlicoPeg como se describe en el documento WO 03/31464 y las solicitudes de patente norteamericanas Nos. US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557 y US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); conjugados del Factor VII como se describen en el documento WO 01/04287, solicitud de patente norteamericana No. 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764, solicitud de patente norteamericana 20030211094 (University of Minnesota).

[0025] El término “actividad biológica mejorada” se refiere a los polipéptidos del Factor VII con i) una actividad proteolítica sustancialmente igual o incrementada en comparación con el Factor VIIa humano de tipo natural recombinante o ii) a los polipéptidos del Factor VII con una actividad de enlace de TF sustancialmente igual o incrementada en comparación con el Factor VIIa humano de tipo natural recombinante o iii) polipéptidos del Factor VII con un período de vida promedio sustancialmente igual o incrementado en el plasma sanguíneo en comparación con el Factor VIIa humano de tipo natural recombinante. El término “Factor VIIa humano conjugado a PEG” significa el Factor VIIa humano, que tiene una molécula de PEG conjugada al polipéptido del Factor VIIa humano. Se debe entender que la molécula de PEG puede estar unida a cualquier parte del polipéptido del Factor VIIa que incluye cualquier residuo de aminoácido o porción de carbohidrato del polipéptido del Factor VIIa. El término “Factor VIIa humano conjugado a cisteína-PEG” significa el Factor VIIa que tiene una molécula de PEG conjugada a un grupo sulfhidrilo de una cisteína introducida en el Factor VIIa humano.

[0026] Los ejemplos no limitantes de las variantes del Factor VII que tienen una actividad proteolítica sustancialmente igual o incrementada en comparación con el Factor VIIa humano de tipo natural recombinante incluyen S52A-Factor VIIa, S60A-Factor VIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes del Factor VIIa que exhiben estabilidad proteolítica incrementada como se describe en la patente norteamericana No. 5,580,560; el Factor VIIa que ha sido escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas del Factor VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes del Factor VII como se describe en PCT/DK02/00189 (correspondiente al documento WO 02/077218); y variantes del Factor VII que exhiben estabilidad proteolítica incrementada como se describe en el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes del Factor VII que tienen un dominio Gla modificado y que exhiben un enlace de membrana mejorado como se describe en el documento WO 99/20767, patentes norteamericanas Nos. US 6017882 y US 6747003, solicitud de patente norteamericana No. 20030100506 (University of Minnesota) y el documento WO 00/66753, solicitudes de patente norteamericanas Nos. US 20010018414, US 2004220106 y US 200131005, patentes norteamericanas Nos. US 6762286 y US 6693075 (University of Minnesota); y variantes del Factor VII como se describe en el documento WO 01/58935, patente norteamericana No. US 6806063, solicitud de patente norteamericana No. 20030096338 (Maxygen ApS), el documento WO 03/93465 (Maxygen ApS) y el documento WO 04/029091 (Maxygen ApS).

[0027] Los ejemplos no limitantes de variantes del Factor VII que tienen actividad biológica incrementada en comparación con el Factor VIIa de tipo natural incluyen las variantes del Factor VII descritas en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635 (correspondiente al documento WO 03/027147), solicitud de patente danesa No. PA 2002 01423 (correspondiente al documento WO 04/029090), solicitud de patente danesa No. PA 2001 01627 (correspondiente al documento WO 03/027147); WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes del Factor VII con actividad mejorada como se describe en el documento JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

[0028] Los ejemplos de las variantes del Factor VII incluyen, sin limitación, P10Q P10Q-FVII, K32E-FVII, P10Q/K32E-FVII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298Q-FVII, and S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/5314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII,

F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 5 F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 10 F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII,
 15 F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/5314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 20 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 S52A- Factor VII, S60A-Factor VII; R152E-Factor VII, S344A-Factor VII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII,
 R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII que tiene sustituciones,
 adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de 233Thr a 240Asn; FVII que tiene sustituciones, adiciones o
 supresiones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cys; y FVII que tiene sustituciones, adiciones o
 supresiones en la secuencia de aminoácidos de 153Ile a 223Arg.

25 [0029] De esta manera, las variantes de sustitución en un polipéptido del Factor VII incluyen, sin limitación, sustituciones
 en las posiciones P10, K32, L305, M306, D309, L305, L305, F374, V158, M298, V158, E296, K337, M298, M298, S336,
 S314, K316, K316, F374, S52, S60, R152, S344, T106, K143, N145, V253, R290, A292, G291, R315, V317 y
 sustituciones, adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240 o de R304 a C329; o de I153 a
 30 R223, o combinaciones de los mismos, en particular variantes tales como P10Q, K32E, L305V, M306D, D309S, L305I,
 L305T, F374P, V158T, M298Q, V158D, E296V, K337A, M298Q, M298K, S336G, S314E, K316H, K316Q, F374Y, S52A,
 S60A, R152E, S344A, T106N, K143N, N145T, V253N, R290N, A292T, G291N, R315N, V317T y sustituciones,
 adiciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240, o de R304 a C329, o de I153 a R223, o
 combinaciones de los mismos.

35 [0030] La expresión "polipéptidos" en conexión con los términos "polipéptidos del Factor X" y "polipéptidos del Factor IX"
 se propone que incluya cualquier proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos del Factor X y el Factor IX
 humanos de tipo natural, respectivamente, así como también los "análogos", "variantes", "polipéptidos relacionados",
 "derivados" y "conjugados" respectivos de los mismos, donde las expresiones "variantes", "polipéptidos relacionados",
 40 "derivados" y "conjugados" se definen como el Factor VII, *mutatis mutandis*.

Composiciones

45 [0031] Cuando se utiliza en este documento la expresión "composición" se propone para referirse a una composición
 líquida, tal como una composición líquida acuosa, es decir una composición que comprende menos de 5% de solventes
 no acuosos.

[0032] El término "primera composición" se refiere a una composición que comprende una proteína dependiente de la
 vitamina K de interés antes de un tratamiento, tal como un paso de purificación, de acuerdo con la presente invención.
 50 El término se utiliza para distinguir la "primera composición" de "una segunda composición", la cual se refiere a la misma
 composición, pero después de este tratamiento, tal como un paso de purificación.

[0033] La proteína dependiente de la vitamina K de interés es mucho más típicamente una proteína recombinante que
 es producida bajo condiciones de cultivos de células, es decir la proteína dependiente de la vitamina K de interés se
 55 obtiene ya sea directamente como un constituyente de un sobrenadante del cultivo de células o se obtiene a partir de un
 sobrenadante del cultivo de células después de uno o más pasos de proceso precedentes. En la práctica de la presente
 invención, las células son células eucarióticas, tal como una línea de células eucarióticas establecida que incluye, sin
 limitación, líneas de células CHO (por ejemplo, ATCC CCL 61), COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), de hígado de
 hámster bebé (BHK, por sus siglas en inglés) y HEK293 (por ejemplo, ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol.
 60 36:59-72, 1977). Una línea de células BHK preferida es la línea de células tk^{ts}13 BHK (Waechter y Baserga, Proc. Natl.
 Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982), posteriormente referidas como las células BHK 570. La línea de células BHK 570
 está disponible en the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, bajo el acceso de
 ATCC número CRL 10314. Una línea de células tk^{ts} 13BHK también está disponible en ATCC bajo el número de

acceso CRL 1632. Una línea de células CHO preferida es la línea de células CHO K1 disponible en ATCC bajo el número acceso CC161.

[0034] Otras líneas de células adecuadas incluyen, sin limitación, Rat Hep I (Hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (Hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); células DUKX (línea de células CHO) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980) (las células DUKX también son referidas como las células DXB11) y DG44 (línea de células CHO) (Cell, 33: 405, 1983 y Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986). También son útiles las células 3T3, células Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células. En algunas formas de realización, las células pueden ser células mutantes o recombinantes, tal como, por ejemplo, las células que expresan un espectro cualitativa y cuantitativamente diferente de enzimas que catalizan la modificación posterior a la traducción de las proteínas (por ejemplo, enzimas de glicosilación tales como las glicosil transferasas y/o glicosidasas, o enzimas de procesamiento tales como propéptidos) que el tipo de células del cual se derivan. Las líneas de células de insectos adecuadas también incluyen, sin limitación, líneas de células Lepidoptera, tales como las células Spodoptera frugiperda o las células Trichoplusia ni (véase, por ejemplo, la patente norteamericana No. US 5 077 214).

[0035] Típicamente, el contenido total de contaminantes proteínicos en la primera composición (tal como una composición no purificada) es al menos 200 ppm, tal como al menos 300 ppm, por ejemplo al menos 400 ppm o al menos 500 ppm.

[0036] También típicamente, el contenido total de contaminantes de Proteína S en la primera composición (tal como una composición no purificada) es al menos 200 ppm, tal como al menos 300 ppm, por ejemplo al menos 400 ppm o al menos 500 ppm.

Contaminantes proteínicos típicos

[0037] Cuando se utilizan en este documento los términos “contaminante proteínico” y “contaminantes proteínicos” y similares se proponen para referirse a constituyentes de proteínas o polipéptidos que constituyen impurezas con relación a la proteína dependiente de la vitamina K de interés. De esta manera, la proteína dependiente de la vitamina K de interés no será contada obviamente como un contaminante proteínico aunque las definiciones de la “proteína dependiente de la vitamina K” como tal y “contaminantes proteínicos”, respectivamente, son solapadas parcialmente. En una forma de realización, el contaminante proteínico es una proteína dependiente de la vitamina K (pero no la proteína dependiente de la vitamina K de interés).

[0038] Como las proteínas dependientes de la vitamina K son producidas típicamente en cultivos de células, un grupo particular de contaminantes proteínicos son las proteínas de células huésped. Las “proteínas de células huésped” son proteínas producidas por la célula huésped que expresa la proteína dependiente de la vitamina K de interés y se consideran típicamente como impurezas. Las proteínas de células huésped pueden ser proteínas humanas si se utiliza una línea de células humanas para la producción de proteínas dependientes de la vitamina K de interés o proteínas no humanas, si se utiliza una línea de células no humanas para la producción de la proteína de interés. De esta manera, en un aspecto de la invención, el contaminante proteínico es una proteína de célula huésped, tal como una proteína dependiente de la vitamina K.

[0039] Una clase particularmente relevante de proteínas de células huésped son las proteínas que contienen el dominio Gla tales como GAS-6, Proteína S, Factor II (Protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Proteína C, Factor VII/VIIIa, Proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína Gla de Matriz y Osteocalcina. El número de residuos Gla en estas proteínas está en el rango de 2 a 12. Puesto que la síntesis de los residuos Gla requiere la vitamina K, las proteínas que contienen residuos Gla también son referidas como proteínas dependientes de la vitamina K.

[0040] En el presente contexto, una proteína de célula huésped particular de relevancia es la Proteína S. En una forma de realización particular, la Proteína S es una Proteína S de hámster. De esta manera, los métodos de la presente invención se enfocan particularmente a la reducción del contenido de Proteína S.

Reducción del contenido de contaminantes proteínicos

[0041] Un aspecto fundamental de la presente invención es el(los) método(s) capaz(capaces) de retirar un contaminante proteínico (en particular la Proteína S) de composiciones que comprenden una proteína dependiente de la vitamina K de interés (en particular un polipéptido del Factor VII).

[0042] De esta manera, la presente invención se refiere a un método para reducir el contenido de Proteína S en una composición que comprende una proteína dependiente de la vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo celular, comprendiendo dicho método el sometimiento de dicha composición a una combinación de los pasos A y B:

(A) poner en contacto dicha composición que comprende una proteína dependiente de la vitamina K

recombinante de interés producida bajo condiciones de cultivo celular con un material en fase sólida que porta anticuerpos monoclonales contra la proteína dependiente de la vitamina K de interés, el cual puede vincularse a la proteína dependiente de la vitamina K de interés, y recolectar una composición resultante que comprende la proteína dependiente de la vitamina K de interés, y

(B) poner en contacto una composición que ha sido sometida al paso (A) con un material en fase sólida que porta anticuerpos monoclonales contra Proteína S, el cual es capaz de vincularse a la Proteína S mientras la proteína dependiente de la vitamina K de interés no se vincula a dicha fase sólida y fluye a través de la columna cromatográfica; y recolectar una composición resultante que comprende la proteína dependiente de la vitamina K de interés;

donde la composición que comprende una proteína dependiente de la vitamina K recombinante de interés producida bajo condiciones de cultivo celular es un sobrenadante de cultivo celular y donde dicho sobrenadante de cultivo celular es aplicado al material en fase sólida del paso (A) sin ningún paso de purificación anterior,

donde el nivel de Proteína S expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la vitamina K de interés ha sido reducido de dicho sobrenadante de cultivo de células para dicha composición resultante del paso (B) por al menos un factor de 2.

[0043] Así, lo que se describe aquí es un método para reducir el contenido de uno o más contaminantes proteínicos en una composición que comprende una proteína dependiente de la vitamina K de interés, comprendiendo dicho método al menos los pasos de (i) poner en contacto la composición con un material en fase sólida que puede vincularse a uno o más contaminantes proteínicos y/o a la proteína dependiente de la vitamina K de interés, y (ii) recolectar una composición resultante que comprende la proteína dependiente de la vitamina K de interés, donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado en partes por millón relativo a la proteína dependiente de la vitamina K de interés se ha reducido por al menos un factor de 5.

[0044] En las formas de realización más importantes, el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante (tal como una composición purificada) que comprende la proteína dependiente de la vitamina K de interés se hace descender hasta a lo sumo 100 ppm.

[0045] Como se mencionara anteriormente, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es típicamente un factor de coagulación dependiente de la vitamina K seleccionado de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y la Proteína C activada. En una forma de realización más particular, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX. En otra forma de realización más particular, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII. En otra forma de realización particular, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor X.

[0046] La cantidad predominante de contaminantes proteínicos pueden ser los polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S; y la proteína dependiente de la vitamina K de interés puede ser un polipéptido del Factor VII. En una forma de realización, el contaminante proteínico es la proteína S de hámster. En otra forma de realización, el contaminante proteínico es la proteína S y la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX. En una forma de realización, el contaminante proteínico es la proteína S de hámster.

[0047] Métodos para la separación de una proteína dependiente de la vitamina K de interés que contiene 2-16 residuos de Gla de otros contaminantes proteínicos dependientes de la vitamina K que contienen de 2 a 16 residuos de Gla.

[0048] Un método para la separación de proteínas con efecto anticoagulante tal como la proteína S y la proteína C de proteínas con efecto coagulante se describe aquí. En un aspecto, la proteína dependiente de la vitamina K de interés es un factor de coagulación y el contaminante proteínico con efecto anti-coagulante es la Proteína S.

[0049] Un método para la separación de contaminantes proteínicos no humanos a partir de una proteína dependiente de la vitamina K humana es descrito aquí. Los contaminantes proteínicos no humanos también pueden ser proteínas dependientes de la vitamina K. Los contaminantes proteínicos no humanos pueden ser proteínas de hámster.

[0050] Dicho esto, el método de la invención hace posible producir un nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la vitamina K de interés la cual ha sido reducida por al menos un factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000.

[0051] En particular, el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante (tal como una composición purificada), tal como un sobrenadante de cultivo de células tratado, es a lo sumo 100 ppm, tal como a lo sumo 90 ppm, o a lo sumo 80 ppm, o a lo sumo 70 ppm, o a lo sumo 60 ppm, o a lo sumo 50 ppm, o a lo sumo 40 ppm, o a lo sumo 30 ppm, o a lo sumo 20 ppm, o a lo sumo 10 ppm o a lo sumo 5 ppm; o el contenido total de contaminantes de Proteína S en la segunda composición resultante (tal como una composición purificada), tal como un sobrenadante de cultivo de células tratado, es a lo sumo 100 ppm, tal como a lo sumo 90 ppm, o a lo sumo 80 ppm, o a lo sumo 70

ppm, o a lo sumo 60 ppm, o a lo sumo 50 ppm, o a lo sumo 40 ppm, o a lo sumo 30 ppm, o a lo sumo 20 ppm, o a lo sumo 10 ppm o a lo sumo 5 ppm o a lo sumo 1 ppm.

[0052] Los sobrenadantes de cultivos de células típicos pueden tener una cantidad significativa de contaminantes proteínicos (en particular la Proteína S), de esta manera, el contenido total de contaminantes proteínicos en el sobrenadante de cultivo de células (tal como un sobrenadante no purificado) es típicamente al menos 500 ppm, tal como al menos 750 ppm, o al menos 1000 ppm, o al menos 2000 ppm; o el contenido total de contaminantes de Proteína S en el sobrenadante de cultivo de células (tal como un sobrenadante no purificado) es al menos 500 ppm, tal como al menos 750 ppm, o al menos 1000 ppm, o al menos 2000 ppm.

[0053] De esta manera, un método para reducir el contenido de uno o más contaminantes de Proteína S en una composición que comprende un polipéptido del Factor VII, puede comprender al menos los pasos que consisten en (i) poner en contacto la composición con un material en fase sólida el cual es capaz de enlazar el(los) contaminante(s) de Proteína S y/o el polipéptido del Factor VII y (ii) recolectar una composición resultante que comprende el polipéptido del Factor VII, donde el nivel de contaminante(s) de Proteína S expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII ha sido reducido por al menos un factor de 2, tal como al menos un factor de 5.

[0054] Los materiales en fase sólida que son útiles en este documento son aquellos utilizados típicamente en métodos y procesos de captura cromatográfica y de afinidad y variantes particulares de los mismos, como será evidente.

[0055] En una variante principal de lo anterior, el material en fase sólida enlaza una cantidad relativamente más alta del contaminante proteínico en comparación con la proteína dependiente de la vitamina K de interés. En un aspecto, la proteína dependiente de la vitamina K de interés no se enlaza a la fase sólida y fluye a través de la columna cromatográfica mientras que el contaminante proteínico se enlaza a la fase sólida, dando por resultado la separación de la proteína dependiente de la vitamina K de interés del contaminante proteínico. En particular, el material en fase sólida se enlaza específicamente a al menos uno de los contaminantes, por ejemplo por medio de una afinidad fuerte o por medio de un enlace covalente de dicho(s) contaminante(s), tal como por medio de la formación de enlaces de disulfuro a las porciones de tiol de dicho(s) contaminante(s).

[0056] Un material en fase sólida puede ser una resina de intercambio iónico, tal como una resina de intercambio aniónico. Las resinas de intercambio aniónico comúnmente utilizadas comprenden la resina Q, una amina cuaternaria y resina DEAE, DiEtilAminoEtano. Las resinas de intercambio aniónico están comercialmente disponibles, por ejemplo Mono Q (Amersham Biosciences), Source 15Q o 30Q (Amersham Biosciences), Poros 20HQ o 50HQ (Perseptive Biosystems), Toyopearl Q650S (Toso Haas) y otras.

[0057] La elución de una resina de intercambio aniónico se puede realizar al incrementar la conductividad del tampón de elución tal como incrementando la concentración de las sales en el tampón de elución o al disminuir el pH del tampón de elución. Elución se puede realizar al incrementar la concentración de CaCl_2 . La elución se puede realizar al incrementar la concentración de MgCl_2 . La elución se puede llevar a cabo gradualmente o utilizando una elución de gradiente.

[0058] La resina de intercambio catiónico utilizada más ampliamente contiene un grupo carboximetilo (CM) o sulfopropilo (SP). Los ejemplos de estos intercambiadores de cationes incluyen sin limitación Toyopearl CM-650 o Toyopearl SP-650 (Toso Haas), Source 15 S o 30 S, CM o SP Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) Obelix (Amersham Biosciences).

[0059] Un material en fase sólida puede ser una matriz sustituida con ligandos hidrófobos tales como los grupos etilo, butilo, fenilo o hexilo. Este tipo de cromatografía es referido como la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) y toma ventaja de las propiedades hidrófobas de las proteínas. La adsorción es promovida por las interacciones hidrófobas entre regiones no polares sobre la proteína y ligandos hidrófobos inmovilizados sobre un soporte sólido. La adsorción se logra a concentraciones altas de sal en la fase móvil acuosa y la elución es facilitada al disminuir la concentración de sal. En una forma de realización particular, el material es una matriz sustituida por un ligando de butilo o fenilo.

[0060] En un método de la invención, se utiliza un material en fase sólida que lleva ligandos de afinidad. El material en fase sólida puede llevar anticuerpos monoclonales producidos contra al menos un(unos) contaminante(s) proteínico(s), en particular contra la Proteína S. Esto se ilustra en la sección "Experimentales".

[0061] Los materiales en fase sólida pueden llevar ligandos de triazina inmovilizados, tal como un ligando de triazina como descrito en el documento WO 97/10887 (tal como un ligando de triazina como descrito en la página 5 línea 21 a la página 13 línea 6) o en el documento US 6 117 996 (tal como el párrafo 4-21).

[0062] La Proteína S circula en el plasma ya sea libre o en un complejo con C4bp. La cadena B contiene el sitio de interacción para la Proteína S. De esta manera, es importante utilizar la especie C4bp que contiene la cadena B. La molécula completa de C4bp se puede utilizar para la inmovilización a la matriz sólida. La cadena B o una secuencia de la cadena B la cual es capaz de enlazarse a la Proteína S se utiliza para la inmovilización a la matriz sólida.

- [0063] Un material en fase sólida puede llevar la Proteína C inmovilizada. El material en fase sólida puede llevar un ligando de triazina inmovilizado. Un material en fase sólida puede llevar la proteína de enlace C4. La Proteína S se enlaza a la Proteína C y C4bp con mucha más afinidad que otras proteínas dependientes de la Vitamina K. Por lo tanto, es posible reducir el contenido de la Proteína S al enlazar la Proteína S a la Proteína C inmovilizada o C4bp. Alternativamente, las secuencias seleccionadas de la Proteína C y C4bp responsables de enlazarse a la Proteína S se pueden utilizar para la inmovilización a la fase sólida.
- [0064] La proteína de enlace C4b (C4bp) está implicada en la regulación del sistema complementario. Es una proteína multimérica que comprende 7 cadenas alfa idénticas y una cadena beta individual. Las cadenas alfa y beta tienen pesos moleculares de 70 kD y 45 kD, respectivamente. Ambas subunidades pertenecen a una superfamilia de proteínas compuestas predominantemente de repeticiones consensuales cortas (SCR, por sus siglas en inglés) ordenadas en tándem de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos de longitud.
- [0065] Un material en fase sólida puede enlazarse a al menos uno de los contaminantes por medio de la captura covalente. La Proteína S tiene una porción de cisteína libre, mientras que el Factor VII no tiene ninguna. La porción de cisteína libre entonces puede unirse selectivamente a una sustancia tiolada activada o una matriz por intercambio de tiol-disulfuro, con la formación de un disulfuro mezclado. Por esto, debe ser posible reducir la Proteína S por ejemplo por medio de la cromatografía covalente, cromatografía de exclusión de tamaño o procesos de membrana. Una variante de este enfoque es aquel donde no está implicado un material en fase sólida, es decir donde la formación de disulfuro (por ejemplo por medio de la formación de dímeros) hace posible separar el contaminante proteínico a partir de la proteína dependiente de la Vitamina K de interés por otros medios, por ejemplo por medio de la cromatografía de exclusión de tamaño o procesos de membrana.
- [0066] En una forma de realización particular, la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un constituyente de un sobrenadante de cultivo de células, véase la sección "Experimentales".
- [0067] En otra forma de realización del método definido aún más anteriormente, el material en fase sólida enlaza una cantidad relativamente más alta de la proteína dependiente de la Vitamina K de interés en comparación con el(los) contaminante(s) proteínico(s). Más particularmente, el material en fase sólida se enlaza específicamente a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés.
- [0068] En una variante, el material en fase sólida porta anticuerpos monoclonales producidos contra la proteína dependiente de la Vitamina K de interés o un análogo de la misma.
- [0069] Un material en fase sólida puede portar un inhibidor para la proteína dependiente de la Vitamina K de interés, por ejemplo un inhibidor tipo benzamidina o guanidina tales como aquellos que comprenden una configuración $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, en donde Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace individual, donde R^H se selecciona a partir del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-4} -alquilo, arilo y arilmetilo y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-6} -alquilo sustituido opcionalmente, C_{2-6} alquenoilo sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o Z^2 y R^2 son como se definiera anteriormente y $-C(=N-Z^1-R^1)$ forma parte de un anillo heterocíclico, o Z^1 y R^1 son como se definiera anteriormente y $-C(=N-Z^2-R^2)$ forma parte de un anillo heterocíclico, o $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico en donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un bi-radical.
- [0070] Un material en fase sólida puede portar un metal el cual tiene la capacidad de quelación con la proteína dependiente de la Vitamina K de interés (donde la elución posterior se puede realizar por medio del cambio de pH o con un tampón como imidazol), o puede portar el factor de tejido inmovilizado (tromboplastina) (en este ejemplo se descubre que los polipéptidos del Factor VII se enlazan al factor de tejido con una afinidad mucho mayor que los contaminantes proteínicos como la Proteína S, razón por la cual será posible reducir el contenido de, por ejemplo, la Proteína S por medio del enlace de, por ejemplo, un polipéptido del Factor VII al factor de tejido inmovilizado (véase también el documento US 6,573,056)) o puede portar heparina inmovilizada (véase la sección "Experimentales") o puede portar fosfatidilserina (la fosfatidilserina se enlaza al dominio Gla de las proteínas que comprenden el dominio Gla como las proteínas dependientes de la Vitamina K solo en ausencia de calcio; en presencia de calcio, la fosfatidilserina se enlaza al dominio EGF (el Factor VII tiene 2 bucles de EGF y la Proteína S tiene 4 bucles de EGF), de esta manera, será posible separar el Factor VII y los contaminantes proteínicos como la Proteína S debido a la diferente afinidad por la fosfatidilserina, especialmente en presencia de calcio).
- [0071] Un material en fase sólida puede ser hidroxiapatita.
- [0072] Un material en fase sólida puede ser un material cromatográfico. Los ejemplos de materiales en fase sólida adecuados son, por ejemplo, aquellos seleccionados de materiales de intercambio aniónico, materiales de intercambio catiónico, hidroxiapatita, materiales en fase sólida hidrófobos, etc., véase la sección de "Experimentales".
- [0073] Varios aspectos particulares de la invención serán descritos en lo siguiente.

Inmunoafinidad utilizando anticuerpo monoclonal para contaminante proteínico

[0074] Como se describe aquí, al menos uno de los contaminantes proteínicos es enlazado por un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales. De esta manera, la composición puede ponerse en contacto simplemente con dicho material en fase sólida y puede separarse posteriormente del material en fase sólida para obtener al menos una composición menos contaminada.

[0075] De acuerdo con la presente invención, una composición se pone en contacto con un material en fase sólida que porta anticuerpos monoclonales contra Proteína S, el cual puede enlazarse a Proteína S mientras que la proteína dependiente de la vitamina K de interés no se enlaza con la fase sólida.

[0076] El acoplamiento de anticuerpos monoclonales a un material en fase sólida se puede realizar por vía de grupos reactivos colocados sobre el material en fase sólida. Las matrices utilizadas mucho más típicas son soportes activados por bromuro de cianógeno (CNBr) o N-hidroxi-succinimida (NHS) (Wilchek M. et al., Reactive & Functional Polymers. 1999, 41,263-268). Respecto a los soportes activados por CNBr y NHS, el acoplamiento ocurre por vía de grupos amino primarios en el anticuerpo lo que conduce a un enlace de isourea con el grupo CNBr y un enlace de amida con el grupo NHS.

[0077] La solución de anticuerpo se disuelve o se dializa en un tampón de acoplamiento adecuado, por ejemplo NaHCO_3 0.2 M. NaCl 0.5 M pH 8.3, los tampones con grupos amino primarios no pueden utilizarse. El pH de acoplamiento depende del anticuerpo y el soporte activado pero normalmente se puede utilizar pH 6-9. A fin de conservar la estabilidad del soporte activado antes de utilizarlo se lava con 10-15 volúmenes de medios de HCl 1 mM helado. Inmediatamente después, el soporte de lavado es transferido a la solución de anticuerpo y se mezcla suavemente y se ajusta al nivel de pH deseado. La mezcla de acoplamiento se deja con rotación suave ya sea algunas horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Después de que se completa el acoplamiento, cualquier grupo sin reaccionar sobre el soporte es bloqueado por medio del reposo por ejemplo en un tampón de Tris, etanolamina o glicina pH 8-9 durante algunas horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo, el soporte es lavado utilizando un método que alterna un pH alto y un pH bajo con por ejemplo el tampón de bloqueo y un tampón de acetato pH 3-4.

[0078] A continuación se describe un método para reducir el contenido de uno o más contaminantes proteínicos en una primera composición (tal como un sobrenadante de cultivo de células) que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición (tal como una composición no purificada) con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra al menos uno de los contaminantes proteínicos y (ii) separar la segunda composición resultante de esta manera del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 5.

[0079] De esta manera, se descubre que es muy beneficioso utilizar directamente un sobrenadante de cultivo de células, es decir sin ningún paso de purificación anterior. Esto puede ser debido al hecho que el(los) contaminante(s) proteínico(s) puede(n) ser escindido(s) al menos parcialmente por la proteína dependiente de la Vitamina K de interés si el sobrenadante de cultivo de células es procesado antes de la aplicación del presente método por medio del cual surge una mezcla más compleja de contaminantes proteínicos. De esta manera, puede ser aún más difícil reducir el contenido de contaminantes proteínicos cuando existe esta mezcla compleja.

[0080] El(los) contaminante(s) proteínico(s) es(son) típicamente proteínas de células huésped. El anticuerpo monoclonal es producido típicamente contra un contaminante proteínico seleccionado de proteínas de células huésped, tales como contaminantes proteínicos que contienen el dominio Gla, en particular un contaminante proteínico seleccionado a partir de GAS-6, Proteína S, Factor II (Protrombina), Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Proteína C, Factor VIIa, Proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína Gla de Matriz y Osteocalcina, más particularmente la Proteína S. Los métodos de la invención utilizan anticuerpos monoclonales contra Proteína S.

[0081] Como se mencionara anteriormente, la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es típicamente un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada. En una forma de realización más particular, la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX. En otra forma de realización más particular, la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

[0082] En una forma de realización, una cantidad predominante de contaminantes proteínicos son los polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S y la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

[0083] Dicho esto, el método hace posible producir un nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés en la cual ha sido reducido por al menos un

factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000.

5 [0084] En particular, el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición (purificada) es a lo sumo 100 ppm, tal como a lo sumo 90 ppm, o a lo sumo 80 ppm, o a lo sumo 70 ppm, o a lo sumo 60 ppm, o a lo sumo 50 ppm, o a lo sumo 40 ppm, o a lo sumo 30 ppm, o a lo sumo 20 ppm, o a lo sumo 10 ppm o a lo sumo 5 ppm; o el contenido total de contaminantes de Proteína S en la segunda composición (purificada) es a lo sumo 100 ppm, tal como a lo sumo 90 ppm, o a lo sumo 80 ppm, o a lo sumo 70 ppm, o a lo sumo 60 ppm, o a lo sumo 50 ppm, o a lo sumo 40 ppm, o a lo sumo 30 ppm, o a lo sumo 20 ppm, o a lo sumo 10 ppm o a lo sumo 5 ppm.

15 [0085] Los sobrenadantes de cultivo de células típicos pueden tener una cantidad significativa de contaminantes proteínicos (en particular la Proteína S), de esta manera, el contenido total de contaminantes proteínicos en un sobrenadante de cultivo de células (tal como un sobrenadante de cultivo de células no purificado) es típicamente al menos 500 ppm, tal como al menos 750 ppm, o al menos 1000 ppm, o al menos 2000 ppm; o el contenido total de contaminantes de Proteína S en el sobrenadante de cultivo de células no purificado es al menos 500 ppm, tal como al menos 750 ppm, o al menos 1000 ppm, o al menos 2000 ppm.

20 [0086] A continuación se describe un método para reducir el contenido de contaminantes de Proteína S en un sobrenadante de cultivo de células que comprende un polipéptido del Factor VII, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición, tal como un sobrenadante de cultivo de células con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra el(los) contaminante(s) de la Proteína S y (ii) separar la segunda composición resultante de esta manera de dicho material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) de la Proteína S expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII de interés ha sido reducido por al menos un factor de 50.

Proteína C Inmovilizada

30 [0087] Al menos uno de (los) contaminante(s) proteínico(s) es enlazado por un material en fase sólida que lleva la Proteína C inmovilizada. De esta manera, la composición puede ponerse en contacto simplemente con el material en fase sólida y puede separarse posteriormente del material en fase sólida para obtener al menos una composición menos contaminada.

35 [0088] Más particularmente, un método para reducir el contenido de contaminantes proteínicos en una composición que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés puede comprender el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida que lleva la Proteína C inmovilizada y (ii) separar la segunda composición resultante de esta manera del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 5, tal como un método para reducir el contenido de Proteína S en una composición que comprende un polipéptido del Factor VII, dicho método comprendiendo el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida que lleva la Proteína C inmovilizada y (ii) separar la segunda composición resultante de esta manera del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10.

45 [0089] Se debe entender que los métodos anteriores para la reducción del contenido de contaminante(s) proteínico(s) se pueden utilizar solos o en combinación, tal como en combinación. Los pasos de cromatografía individuales se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado. En base a estudios preliminares, se cree que las siguientes combinaciones proporcionan una reducción total excelente del contenido de contaminante(s) proteínico(s):

- 50 • cromatografía de intercambio catiónico → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio aniónico
- 55 • cromatografía de intercambio catiónico → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio aniónico
- cromatografía de intercambio catiónico → cromatografía de interacción hidrófoba → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio aniónico
- 60 • cromatografía de intercambio aniónico → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contaminantes → cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba
- 65 • cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio catiónico

• cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra contaminantes proteínicos → cromatografía de intercambio catiónico

• cromatografía de intercambio aniónico → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés → cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba

• cromatografía de intercambio catiónico → hidroxiapatita → cromatografía de intercambio aniónico

• cromatografía de intercambio catiónico → hidroxiapatita → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio aniónico → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés → cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio aniónico

• hidroxiapatita → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio catiónico → cromatografía de intercambio aniónico

• hidroxiapatita → inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio catiónico → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de interacción hidrófoba → filtración en gel → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra un contaminante proteínico → cromatografía de intercambio catiónico → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio aniónico

• inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés → cromatografía de intercambio aniónico → cromatografía de interacción hidrófoba → cromatografía de intercambio catiónico

[0090] En los métodos de la invención, la inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés se utiliza como el primer paso del proceso de purificación. De esta manera, se descubre que es muy beneficioso utilizar directamente un sobrenadante de cultivo de células, es decir sin ningún paso de purificación anterior. Se debe entender que la reducción del(los) contaminante(s) proteínico(s) es típicamente por al menos un factor de 2, tal como por al menos un factor de 5, en cada uno de los pasos de los métodos de múltiples pasos descritos anteriormente.

Composiciones novedosas que comprenden una proteína dependiente de la Vitamina K de interés

[0091] Los métodos de la presente invención dan origen a composiciones de proteínas dependientes de la Vitamina K, en particular polipéptidos del Factor VII.

[0092] Por lo tanto, a continuación se describe una composición que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo de células, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos es a lo sumo 100 ppm en base al contenido de la proteína dependiente de la Vitamina K de interés. El contenido de los contaminantes proteínicos está en el rango de 0.01-100 ppm, tal como 0.01-50 ppm, por ejemplo 0.05-25 ppm, o 0.05-20 ppm, o 0.05-15 ppm, o 0.05-10 ppm, o 0.05-5 ppm.

[0093] Una composición alternativa comprende un polipéptido del Factor VII obtenido a partir de un cultivo de células no humanas libre de suero, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S es a lo sumo 100 ppm en base al contenido del polipéptido del Factor VII. El contenido de los contaminantes proteínicos está en el rango de 0.01-100 ppm, tal como 0.01-50 ppm, por ejemplo 0.05-25 ppm, o 0.05-20 ppm, o 0.05-15 ppm, o 0.05-10 ppm, o 0.05-5 ppm.

[0094] La proteína dependiente de la Vitamina K de interés es típicamente un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado de los polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada. La proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX. La proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII. También se describe aquí una composición que comprende un polipéptido del Factor VII producido bajo condiciones de cultivo de células, en donde el contenido total de contaminantes de la Proteína S es a lo sumo 100 ppm en base al contenido del polipéptido del Factor VII.

[0095] A continuación se detallan los siguientes métodos y composiciones:

1. Un método para reducir el contenido de uno o más contaminantes proteínicos en una composición que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, comprendiendo el método al menos los pasos que consisten en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida el cual tiene la capacidad de enlazar uno o más de estos contaminantes proteínicos y/o la proteína dependiente de la Vitamina K de interés y (ii) recolectar una segunda composición resultante que comprende la proteína dependiente de la Vitamina K de interés, donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido de la primera composición a la segunda composición resultante por al menos un factor de 2, tal como al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 20, tal como al menos 50, tal como al menos 100.

2. Método de acuerdo con el punto 1, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante que comprende la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es a lo sumo 100 ppm.

3. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-2, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado a partir de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada.

4. Método de acuerdo con los puntos 1-3, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX.

5. Método de acuerdo con los puntos 1-3, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII, tal como el Factor VIIa humano de tipo natural.

6. Método de acuerdo con el punto 5, en donde el polipéptido del Factor VII comprende una sustitución de aminoácido seleccionada de P10Q y K32E.

7. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-6, en donde la cantidad predominante de contaminantes proteínicos son los polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S, y en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

8. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-7, en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000, o al menos un factor de 5000.

9. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-8, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante que comprende la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es a lo sumo 100 ppm, tal como a lo sumo 50 ppm, tal como a lo sumo 10 ppm, tal como a lo sumo 5 ppm, tal como a lo sumo 2 ppm, tal como a lo sumo 1 ppm.

10. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-9, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la primera composición es al menos 500 ppm.

11. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-10, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la primera composición es al menos 500 ppm.

12. Método para reducir el contenido de uno o más contaminantes de Proteína S en una composición que comprende un polipéptido del Factor VII, comprendiendo dicho método al menos los pasos que consisten en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida el cual es capaz de enlazar el(los) contaminante(s) de Proteína S y/o del polipéptido del Factor VII y (ii) recolectar una segunda composición resultante que comprende el polipéptido del Factor VII, donde el nivel de contaminante(s) de Proteína S expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII ha sido reducido por al menos un factor de 2, tal como 5.

13. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11 y 12, en donde el material en fase sólida enlaza una cantidad relativamente más alta del contaminante proteínico en comparación con la proteína dependiente de la Vitamina K de interés.

14. Método de acuerdo con el punto 13, en donde el material en fase sólida se enlaza específicamente a al menos uno de los contaminantes, por ejemplo por medio de una afinidad fuerte o por medio del enlace covalente del(los) contaminante(s), tal como por medio de la formación de enlaces de disulfuro para las porciones de tiol del(los) contaminante(s).

15. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 13 y 14, en donde el material en fase sólida porta anticuerpos monoclonales producidos contra al menos uno de los contaminantes proteínicos.

16. Método de acuerdo con el punto 15, en donde la composición que comprende la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un constituyente de un sobrenadante de cultivo de células.

17. Método de acuerdo con el punto 14, en donde el material en fase sólida porta la Proteína C inmovilizada.

18. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11 y 12, en donde el material en fase sólida enlaza una cantidad relativamente más alta de la proteína dependiente de la Vitamina K de interés en comparación con el(los) contaminante(s) proteínico(s).

19. Método de acuerdo con el punto 18, en donde el material en fase sólida enlaza específicamente la proteína dependiente de la Vitamina K de interés.

20. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 18 y 19, en donde el material en fase sólida porta anticuerpos monoclonales producidos contra la proteína dependiente de la Vitamina K de interés o un análogo de la misma.

21. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 18 y 19, en donde el material en fase sólida es un ligando de triazina con afinidad por la proteína dependiente de la Vitamina K de interés o un análogo de la misma.

22. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 18 y 19, en donde el material en fase sólida porta un inhibidor para la proteína dependiente de la Vitamina K de interés, o porta un metal el cual tiene la capacidad de quelación con la proteína dependiente de la Vitamina K de interés, o porta un factor de tejido inmovilizado (tromboplastina), o porta heparina inmovilizada.

23. Método de acuerdo con el punto 22, en donde el inhibidor para la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un inhibidor tipo benzamidina o guanidina tales como aquellos que comprenden una configuración $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$, en donde Z^1 y Z^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-O-$, $-S-$, $-NR^H-$ y un enlace individual, donde R^H se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-4} alquilo, arilo y arilmetilo y R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-6} alquilo sustituido opcionalmente, C_{2-6} alqueno sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclilo sustituido opcionalmente, o Z^2 y R^2 son como se definiera anteriormente y $-C(=N-Z^1-R^1)$ forma parte de un anillo heterocíclico, o Z^1 y R^1 son como se definiera anteriormente y $-C-NH-Z^2-R^2$ forma parte de un anillo heterocíclico, o $-C(=N-Z^1-R^1)-NH-Z^2-R^2$ forma un anillo heterocíclico en donde $-Z^1-R^1-R^2-Z^2-$ es un bi-radical.

24. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11 y 12, en donde el material en fase sólida es un material cromatográfico.

25. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11 y 12, en donde el material en fase sólida se enlaza a una membrana.

26. Método de acuerdo con los puntos 22-23, en donde el material en fase sólida es un material de intercambio aniónico.

27. Método de acuerdo con el punto 26, en donde la elución del intercambio aniónico se realiza al incrementar la concentración de una sal de calcio tal como $CaCl_2$.

28. Método de acuerdo con el punto 26, en donde la elución del intercambio aniónico se realiza al incrementar la concentración de una sal de magnesio tal como $MgCl_2$.

29. Método de acuerdo con el punto 24, en donde el material en fase sólida es un material de intercambio catiónico.

30. Método de acuerdo con el punto 24, en donde el material en fase sólida es hidroxiapatita.

31. Método de acuerdo con el punto 24, en donde el material en fase sólida es un material en fase sólida hidrófobo.

32. Método para reducir el contenido de uno o más contaminantes proteínicos en una composición (en particular un sobrenadante de cultivo de células) que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición

con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra al menos uno de los contaminantes proteínicos y (ii) separar la segunda composición resultante del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 5.

33. Método de acuerdo con el punto 32, en donde el anticuerpo monoclonal es producido contra un contaminante proteínico seleccionado a partir de proteínas de células huésped, tales como los contaminantes proteínicos que contienen el dominio Gla, en particular un contaminante proteínico seleccionado a partir de GAS-6, Proteína S, Factor II (Protrombina), trombina, Factor X/Xa, Factor IX/IXa, Proteína C, Factor VII/VIIa, Proteína Z, proteína 1 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 2 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 3 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína 4 de ácido gamma-carboxiglutámico transmembrana, proteína Gla de Matriz y Osteocalcina, más particularmente Proteína S.

34. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 27-28, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado a partir de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada.

35. Método de acuerdo con el punto 29, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX.

36. Método de acuerdo con el punto 29, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

37. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-36, en donde la cantidad predominante de contaminantes proteínicos son los polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S, y en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

38. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-37, en donde la cantidad predominante de contaminantes proteínicos es la Proteína S de hámster.

39. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-38, en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000.

40. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-39, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante es a lo sumo 100 ppm.

41. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-40, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la segunda composición resultante es a lo sumo 100 ppm.

42. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-41, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la primera composición es al menos 500 ppm.

43. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 32-42, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la primera composición es al menos 500 ppm.

44. Método para reducir el contenido de contaminantes de Proteína S en una composición, tal como en un sobrenadante de cultivo de células, que comprende un polipéptido del Factor VII, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición, tal como un sobrenadante de cultivo de células con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra el(los) contaminante(s) de Proteína S y (ii) separar una segunda composición resultante del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) de Proteína S expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII de interés ha sido reducido por al menos un factor de 50.

45. Método para reducir el contenido de contaminantes proteínicos en una composición que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida que lleva la Proteína C inmovilizada y (ii) separar una segunda composición resultante del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 5.

46. Método de acuerdo con el punto 45, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un

factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado a partir de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada.

- 5 47. Método de acuerdo con el punto 46, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX.
48. Método de acuerdo con el punto 46, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.
- 10 49. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-48, en donde la cantidad predominante de contaminantes proteínicos son polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S y en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.
- 15 50. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-49, en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000.
- 20 51. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-50, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la segunda composición resultante es a lo sumo 100 ppm.
- 25 52. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-51, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la segunda composición resultante es a lo sumo 100 ppm.
53. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-52, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la primera composición es al menos 500 ppm.
- 30 54. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 45-53, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la primera composición es al menos 500 ppm.
- 35 55. Un método para reducir el contenido de Proteína S en una composición que comprende un polipéptido del Factor VII, comprendiendo el método el paso que consiste en (i) poner en contacto una primera composición con un material en fase sólida que lleva la Proteína C inmovilizada y (ii) separar la segunda composición resultante del material en fase sólida para obtener una composición en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10.
- 40 56. Un método para reducir el contenido de uno o más contaminantes proteínicos en un sobrenadante de cultivo de células que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto el sobrenadante de cultivo de células con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra la proteína dependiente de la Vitamina K de interés o un análogo de la misma, (ii) lavar opcionalmente el material en fase sólida y (iii) eluir la proteína dependiente de la Vitamina K de interés del material en fase sólida para obtener una composición
- 45 resultante en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 5.
- 50 57. Método de acuerdo con el punto 56, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada.
58. Método de acuerdo con el punto 57, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX.
- 55 59. Método de acuerdo con el punto 57, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.
- 60 60. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-59, en donde la cantidad predominante de contaminantes proteínicos son polipéptidos que contienen el dominio Gla, en particular la Proteína S, y en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.
- 65 61. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-60, en donde el nivel de contaminante(s) proteínico(s) expresado como partes por millón con relación a la proteína dependiente de la Vitamina K de interés ha sido reducido por al menos un factor de 10, o al menos un factor de 25, o al menos un factor de 50, tal como por al menos un factor de 100, o al menos un factor de 250, o al menos un factor de 500, o al menos un factor de 750, o al menos un factor de 1000, o al menos un factor de 2000.

62. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-61, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en la composición resultante es a lo sumo 100 ppm.

63. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-62, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en la composición resultante es a lo sumo 100 ppm.

64. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-63, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos en el sobrenadante de cultivo de células es al menos 500 ppm.

65. Método de acuerdo con cualquiera de los puntos 56-64, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S en el sobrenadante de cultivo de células es al menos 500 ppm.

66. Un método para reducir el contenido de contaminantes proteínicos en un sobrenadante de cultivo de células que comprende un polipéptido del Factor VII, comprendiendo dicho método el paso que consiste en (i) poner en contacto el sobrenadante de cultivo de células con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra el polipéptido del Factor VII o un análogo del mismo, (ii) lavar opcionalmente dicho material en fase sólida y (iii) eluir el polipéptido del Factor VII del material en fase sólida para obtener una composición resultante en donde el nivel de contaminantes proteínicos expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII ha sido reducido por al menos un factor de 100.

67. Un método para reducir el contenido de la Proteína S en un sobrenadante de cultivo de células que comprende un polipéptido del Factor VII, dicho método comprendiendo el paso que consiste en (i) poner en contacto el sobrenadante de cultivo de células con un material en fase sólida que lleva anticuerpos monoclonales producidos contra el polipéptido del Factor VII o un análogo del mismo, (ii) lavar opcionalmente el material en fase sólida y (iii) eluir el polipéptido del Factor VII del material en fase sólida para obtener una composición resultante en donde el nivel de Proteína S expresado como partes por millón con relación al polipéptido del Factor VII ha sido reducido por al menos un factor de 100.

68. Una composición que comprende una proteína dependiente de la Vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo de células, en donde el contenido total de contaminantes proteínicos es a lo sumo 100 ppm en base al contenido de la proteína dependiente de la Vitamina K de interés.

69. Composición de acuerdo con el punto 68, en donde el contenido de contaminantes proteínicos está en el rango de 0.01-100 ppm, tal como 0.01-50 ppm, por ejemplo 0.05-25 ppm, o 0.05-20 ppm, o 0.05-15 ppm, o 0.05-10 ppm, o 0.05-5 ppm.

70. Una composición que comprende un polipéptido del Factor VII obtenida a partir de un cultivo de células no humanas libre de suero, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S es a lo sumo 100 ppm en base al contenido del polipéptido del Factor VII.

71. Una composición que comprende un polipéptido del Factor IX, obtenida a partir de un cultivo de células no humanas libre de suero, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S es a lo sumo 100 ppm en base al contenido del polipéptido del Factor IX.

72. Composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 67-71, en donde el contenido de los contaminantes de Proteína S está en el rango de 0.01-100 ppm, tal como 0.01-50 ppm, por ejemplo 0.05-25 ppm, o 0.05-20 ppm, o 0.05-15 ppm, o 0.05-10 ppm, o 0.05-5 ppm.

73. Composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 67-72, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un factor de coagulación dependiente de la Vitamina K seleccionado a partir de polipéptidos del Factor VII, polipéptidos del Factor IX, polipéptidos del Factor X y Proteína C activada.

74. Composición de acuerdo con el punto 73, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor IX.

75. Composición de acuerdo con el punto 73, en donde la proteína dependiente de la Vitamina K de interés es un polipéptido del Factor VII.

76. Una composición que comprende un polipéptido del Factor VII producido bajo condiciones de cultivo de células, en donde el contenido total de contaminantes de Proteína S es a lo sumo 100 ppm, tal como en el rango de 0.01-100 ppm, en base al contenido del polipéptido del Factor VII.

EXPERIMENTALES

Anticuerpos monoclonales anti Proteína S de hámster

5 [0096] Estos anticuerpos han sido desarrollados utilizando ratones RBF inmunizados con una acumulación de Proteína S de hámster aislada de la producción de SF-Factor VIIa y al utilizar una técnica de fusión que involucra mielomas FoxNy como compañero de fusión para los esplenocitos de RBF. Los anticuerpos monoclonales reconocen cualquier epítipo fuera del sitio de escisión de trombina así como también fuera del área de enlace de C4BP. Además, los anticuerpos monoclonales pueden ser independientes de Ca^{2+} así como también dependientes de Ca^{2+} . El anticuerpo monoclonal puede ser de cualquier clase de Ig.

10 [0097] Los anticuerpos monoclonales anti Proteína S de hámster independientes de Ca^{2+} están propuestos para utilizarse para la detección de la contaminación de Proteína S de hámster en cualquier fármaco producido a partir de células de CHO. Además, la intención es utilizar los anticuerpos monoclonales anti Proteína S de hámster dependientes de Ca^{2+} para el aislamiento y la purificación de la Proteína S de hámster a partir de la producción de fármacos generados por medio de células de CHO y en particular para reducir (tal como eliminar) el contenido de Proteína S en composiciones de proteína dependiente de la Vitamina K.

[0098] Los ratones RBF se inmunizaron con Proteína S de hámster aislada de la producción de SF-Factor VIIa (acumulación del lote HW3-029, contiene <1% del Factor VIIa). Después de 6 semanas, se realizaron dos fusiones utilizando los mielomas FoxNy. Se aislaron varios hibridomas y se sometieron a prueba por su capacidad de enlace a la Proteína S bajo concentraciones variantes de Ca^{2+} que variaban desde la ausencia de Ca^{2+} a una concentración de Ca^{2+} de Ca^{2+} 35 mM. Cuatro anticuerpos monoclonales (ProS-1 F18, ProS-1 F22, ProS-2 F32 y ProS-2 F46) se seleccionaron por su independencia a Ca^{2+} y se trataron para ser del isotipo ya sea IgG1 o IgG2a. Un ensayo ELISA de Sandwich se desarrolló utilizando dos (ProS-1 F18 y ProS-2 F32) de los cuatro anticuerpos independientes a Ca^{2+} para la determinación de la contaminación de Proteína S de hámster en la dependencia a Ca^{2+} ya que estos dos anticuerpos mostraron buena cooperación. La afinidad relativa de los cuatro anticuerpos monoclonales independientes a Ca^{2+} fue muy baja. Además, se ha mostrado que no existe una reactividad cruzada hacia el Factor VIIa. Un anticuerpo monoclonal, ProS-1 F22, se utilizó en un ensayo ELISA para la detección de la Proteína S humana. F22 no reconoció en absoluto la Proteína S humana. Más probablemente este también es el caso para los anticuerpos monoclonales. Además se han desarrollado tres anticuerpos dependientes a Ca^{2+} , ProS-2 F15, ProS-2 F35 y ProS-2 F44, ninguno de los cuales se enlaza a ninguna Proteína S en presencia de Citrato 20 mM, es decir cuando no está presente Ca^{2+} . La capacidad de enlace de los tres anticuerpos a la Proteína S varía con la concentración de Ca^{2+} (variando de Ca^{2+} 2.5 mM a 35 mM), pero todos son significativamente diferentes de cuando no está presente Ca^{2+} . Los tres anticuerpos han sido congelados hasta nuevo aviso.

Determinación del contenido de Proteína S de hámster, ELISA utilizando anticuerpos monoclonales

[0099] El contenido relativo de Proteína S de hámster se determina con un ensayo ELISA de sandwich utilizando dos anticuerpos monoclonales diferentes. Los anticuerpos se desarrollaron en ratones utilizando Proteína S purificada de células de CHO.

[100] Una placa de microtítulo Nunc maxisorb de 96 pocillos se reviste con el anticuerpo ProS-2-F32, la función del anticuerpo es capturar el antígeno.

45 [101] El procedimiento de revestimiento es como sigue: 100 μl de una solución que contiene aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ProS-2-F32 (una solución madre con 1.93 mg/ml se diluye 1:386 en Na_2HCO_3 0.1 M pH 9.8) se aplica a cada pocillo en la placa de microtítulo Nunc de 96 pocillos, se agrega un sellador de placa en la parte superior de la placa y la placa se incuba durante toda la noche entre 1 y 9°C.

50 [102] Día 2, después de la incubación primaria, la solución se desecha y cada uno de los pocillos se bloquea como sigue: Agregar 350 μl de tampón de bloqueo (Tampón de fosfato con solución salina (PBS), fosfato 0.010 M y NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0,1%, pH 7.2) a cada pocillo y un sellador de placa a la placa y se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, donde la temperatura ambiente se define que está entre 18 y 25°C. Después de que se completa el tiempo de incubación de bloqueo, se desecha la solución y se lava cada pocillo tres veces independientes utilizando 350 μl de un tampón de lavado (fosfato 0.010 M y NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0,05%, pH 7.2).

60 [103] Los calibradores y las muestras se diluyen apropiadamente en un tampón de Tris que contenía citrato (Tris 0.010 M; NaCl 0.15 M, citrato 0.050 M, Tween 20 al 0,1% v/v, pH 8.6), los controles se diluyen en el tampón de Tris con una proteína portadora (Tris 0.010 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0,1% v/v, BSA al 1%, pH 8.0). 100 μl de cada uno de los calibradores, controles y muestras se aplican a la placa Nunc, se agrega un sellador de placa y la placa se incuba durante toda la noche entre 1 y 9°C.

[104] Día 3. Los pocillos se vacían y la placa se lava 3 veces, como antes utilizando el tampón de lavado de PBS y el anticuerpo etiquetado con biotina ProS-1-F18 se agrega para la detección del complejo de antígeno-anticuerpo. La solución de anticuerpo ProS-1-F18 etiquetada con biotina se diluye 1:1000 en TBS, (Tris 0.010 M; NaCl 0.15 M, Tween

20 al 0.1%, pH 8.6) y se agregan 100 µl a cada pocillo, se aplica el sellador de placa y la placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución se desecha y se lava la placa 3 veces, como antes utilizando 350 µl del tampón de lavado de PBS.

[105] Aplicar 100 µl de una solución de Peroxidasa de Rábano Picante-avidina D, diluida 1:10000 en TBS (Tris 0.010 M; NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.1%, pH 8.6), aplicar el sellador de placas e incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Lavar la placa 3 veces con PBS, tampón de lavado y finalmente agregar 100 µl de sustrato de TMB. Incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, agregar 100 µl de ácido fosfórico 2 M para detener la reacción y medir la absorbancia a 450 nm utilizando 620 nm como referencia.

Determinación del contenido de Proteína S de hámster, ELISA utilizando anticuerpos policlonales:

[106] El contenido de Proteína S de hámster se determinó en un ensayo ELISA de sandwich basado en anticuerpos policlonales.

[107] Revestimiento con anticuerpos primarios: Una microplaca Nunc maxisorb de 96 pocillos se revistió con el anticuerpo policlonal Rb-α-Hu Proteína S (código de DakoCytomation número A0384). La solución de anticuerpo, la cual tenía una concentración de proteína de 4.1 mg/ml, se diluyó en tampón de revestimiento (Tampón de bicarbonato, pH 9.6; 3.03 g de Na₂CO₃; 5.98 g de NaHCO₃; Agua para 1 l) a 5.0 µg/ml (que correspondía a una dilución 1:820). Se agregaron 100 µl a cada pocillo, excepto los pocillos A1 y A2, los cuales se utilizaron como modelos. La placa se incubó durante toda la noche a 4°C.

[108] A la mañana siguiente, la solución se desechó y la placa se lavó 3 veces (350 µl) con tampón de lavado (Tween/PBS). La placa (excepto los pocillos A1 y A2) se bloqueó posteriormente utilizando el tampón de dilución (BSA/Tween/PBS). La placa se dejó bloquear a temperatura ambiente durante 1 hora con un sellador de placa, antes de que se lavara 3 veces (350 µl) con tampón de lavado (Tampón de lavado (PBS/Tween, pH 7.4); 16.0 g de NaCl; 0.40 g de KH₂PO₄; 2.30 g de Na₂HPO₄; 0.40 g de KCl; 1 ml de tween 20; Agua para 2 l).

[109] Muestras, Controles y estándares: Un estándar de proteína S con una concentración de 1120 µg/ml se diluyó en tampón de dilución (Tampón de dilución (BSA/Tween/PBS): 0.5 g de albúmina de suero bovino (Sigma, A-7030); Tampón de lavado para 100 ml) a una concentración de 25 ng/ml (1: 44800). Este estándar se diluyó adicionalmente en tampón de dilución por pasos de 2 veces al estándar más bajo de 0.78 ng/ml. El control positivo consiste en Proteína S humana (American Diagnostica, código 443) la cual se diluyó en tampón de dilución a una concentración de 2.5 ng/ml. Un control de conjugado se agregó al adicionar solo tampón de dilución a un par de pocillos. Las muestras se diluyeron en tampón de dilución, teniendo como objetivo una concentración entre 1 y 10 ng/ml, lo cual corresponde a la sección lineal de la curva estándar. Todos los estándares, controles y muestras se colocaron sobre la placa como duplicados y se incubaron durante toda la noche con un sellador de placa a 4°C.

[110] Incubación con anticuerpos secundarios conjugados con HRP: Los pocillos se vaciaron y la placa se lavó 3 veces, como antes utilizando el tampón de lavado de Tween/PBS. La Rb-α-Proteína S humana, HRP (código de DakoCytomation número P0419) se diluyó 1000 veces en tampón de dilución y se agregaron 100 µl a cada pocillo excepto A1+A2. La placa se dejó incubar sobre un agitador durante una hora a temperatura ambiente antes de que se lavara 3 veces (350 µl) con tampón de lavado.

[111] Detección: 100 µl de solución de sustrato se agregaron a todos los pocillos. La solución de sustrato consistía de 4 tabletas de OPD, 2 mg cada una, (código de DakoCytomation S2045) en 12 ml de agua extremadamente pura y 5 µl de H₂O₂ al 30% inmediatamente antes del uso. La reacción se dejó proseguir durante 25 minutos antes de que se detuviera al agregar 50 µl de H₂SO₄ 2.5 M por pocillo. La placa se leyó en un lector de microplacas a 492 nm.

A. Inmunoafinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-Proteína S

Ejemplo 1

[112] La reducción de la Proteína S se realiza en una columna activada con NHS HiTrap de Amersham (volumen de columna de 1 ml (CV, por sus siglas en inglés)) acoplada con anticuerpos monoclonales (MAb) producidos en ratones contra la Proteína S de hámster (0.4 mg de MAb por ml de columna empacada). La columna se equilibra con 10 CV de Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 y la carga es 100 CV de una solución con una conductividad de 14 mS/cm que contenía 1.49 mg/ml del Factor VIIa y un contenido de Proteína S mayor que 300 ppm (el calcio es quelado con citrato) seguido por un lavado de 10 CV de Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5. El paso completo es operado a una velocidad de flujo de 60 CV/hora y una temperatura de 5°C. Las trazas pequeñas de la proteína S y el Factor VIIa son eluidas con Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 2 M pH 7.2 (confirmado por medio de SDS-PAGE/tinción de plata), posteriormente la Proteína S enlazada es eluida con citrato 50 mM pH 3.0 y una pequeña fracción del Factor VIIa (<1% de la cantidad de la carga) es desorbida con glicina 50 mM pH 2.0. La columna es re-equilibrada con 10 CV de Na₂HPO₄, NaCl 150 mM pH 7.5. Un nivel de Proteína S inferior a 30 ppm, es decir una reducción por un factor de al menos 10, se mide por

medio de un ensayo ELISA en el funcionamiento directo.

Ejemplo 2

[113] La reducción de la Proteína S se realiza en una columna activada con NHS HiTrap de Amersham (volumen de columna de 1 ml (CV)) acoplada con anticuerpos monoclonales (MAb) producidos en ratones contra la Proteína S de hámster (0.4 mg de MAb por ml de columna empacada). La columna se equilibra con 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 150 mM pH 7.5 y la carga es 108 CV de una solución con una conductividad de 12 mS/cm que tenía un contenido de Proteína S mayor que 150 ppm (calcio 10 mM presente) seguido por un lavado de 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 150 mM pH 7.5. La carga y el lavado se conducen a una velocidad de flujo de 24 CV/hora, el resto del programa a 60 CV/hora y una temperatura de 5°C. La columna se limpia con 15 CV de citrato 50 mM pH 3.0 luego se re-equilibra con 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 150 mM pH 7.5 y finalmente se limpia con 12 CV de glicina 50 mM pH 2.0 y se re-equilibra con 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 150 mM pH 7.5. Un nivel de Proteína S inferior a 15 ppm, es decir una reducción por un factor de al menos 10, se mide por medio de un ensayo ELISA en el funcionamiento directo.

Ejemplo 3

[114] La reducción de la Proteína S se realizó en medios Sepharose 4 FF activados con CNBr de GE Healthcare inmovilizados con un anticuerpo monoclonal (MAb) producido en ratones contra la Proteína S de hámster (0.8 mg de MAb de Proteína S por ml de medios). La columna (1 ml) se equilibró con 10 CV de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5 y la carga fue 32 CV de una solución con un contenido de Proteína S de 665 ng/ml $\approx$ 485 ng/mg de rFVIIa seguido por un lavado con 20 CV de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5. La columna se regeneró con 10 CV de glicina 50 mM pH 2.0 y se re-equilibró con 8 CV de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5. Un nivel de Proteína S de 2.6 ng/ml $\approx$ 3 ng/mg de rFVIIa, es decir una reducción por un factor de al menos 160, se midió por medio de un ensayo ELISA en la fracción de funcionamiento directo. La carga y el lavado se realizaron a una velocidad de flujo de 7.2 CV/hora, el resto del programa a 40 CV/hora. La temperatura fue 5°C.

Ejemplo 4

[115] Como una alternativa para una columna de lecho empacado, la reducción de la Proteína S se realizó en una unidad de membrana activada con epoxi Sartorius (volumen de membrana = 2.1 ml) inmovilizada con un anticuerpo monoclonal (MAb) producido en ratones contra la Proteína S de hámster (1 mg de MAb de Proteína S por unidad de membrana). La membrana se equilibró con 10 MV (volumen de membrana) de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5 y la carga fue 14 MV de una solución con un contenido de Proteína S de 683 ng/ml $\approx$ 502 ng/mg de rFVIIa seguido por un lavado con 8 MV de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5. La membrana se regeneró con 10 MV de glicina 50 mM pH 2.0 y se re-equilibró con 8 MV de Tris 75 mM, tri-Na-citrato 30 mM pH 7.5. Un nivel de Proteína S de 9.1 ng/ml $\approx$ 8 ng/mg de rFVIIa, es decir una reducción por un factor de al menos 62, se midió por medio de un ensayo ELISA en la fracción de funcionamiento directo. El proceso de la membrana se realizó a una velocidad de flujo de 143 MV/hora y a una temperatura de 5°C.

Ejemplo 5: Purificación de una solución de FIX

[116] La reducción de la Proteína S se realiza en una columna de Sepharose FF activada con NHS de Amersham (volumen de columna de 0.9 ml (CV)) acoplada con anticuerpos monoclonales (MAb) producidos en ratones contra la Proteína S de hámster (0.8 mg de MAb por ml de columna empacada). La columna se equilibra con 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5. BeneFIX (1000 IE; Lote n° LE 07D002AF) se suspendió en 10 mL de agua como se describe por el folleto del paquete. 5 mL de esta solución que contenía aproximadamente 2 mg de FIX se cargaron en la columna. El contenido de proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA monoclonal a 230 ng/mL, aproximadamente 1150 ng de Proteína S en total. La columna se lavó con 10 CV de tampón de equilibrio y se eluyó con Tris 15 mM, NaCl 2 M, pH 7.5. Se encontró FIX en las fracciones de lavado y elución. El contenido de proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA monoclonal a 26 y 52 ng en las fracciones de lavado y elución, respectivamente.

B. Cromatografía de intercambio aniónico

Ejemplo de referencia 6 - Realización de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 8.6

[117] La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una columna (1 cm de diámetro interior x 1.3 cm de longitud = volumen de columna de 1.0 ml (CV)) empacada con Q-Sepharose FF de Amersham, equilibrada con 5 CV de glicilglicina 10 mM, NaCl 175 mM, 8.6. La carga fue 35 ml de una solución que tenía un contenido de Proteína S mayor que 300 ppm. La columna se lavó con 7 CV de glicilglicina 10 mM, NaCl 175 mM y 4 CV de glicilglicina 10 mM, NaCl 50 mM. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 20 CV desde CaCl₂ 0 mM a CaCl₂ 15 mM, tamponado con glicilglicina que contenía NaCl 50 mM. La purificación se realizó a una velocidad de flujo de 40 CV/hora y a una temperatura de 5°C. La acumulación contenía un nivel de Proteína S inferior a 30 ppm, es decir una reducción por un factor de al menos 10.

Ejemplo 7 - Realización de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 8.6 para la purificación de una solución de FIX utilizando la elución de NaCl

[118] La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una columna (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de longitud = volumen de columna de 1.0 ml (CV)) empaquetada con Q-Sepharose FF de Amersham, equilibrada con 10 CV de Tris 10 mM, NaCl 175 mM, 8.6. BeneFIX (1000 IE; Lote nº LE 07D051AD) se suspendió en 10 mL de agua como se describe por el folleto del paquete. 3 mL de esta solución que contenía aproximadamente 1.2 mg de FIX se cargaron en la columna. El contenido de Proteína S se midió por medio de ELISA policlonal a 280 ng/mL, un total de 840 ng en la solución de carga. La columna se lavó con 7 CV de tampón de equilibrio seguido por el lavado con 3 CV de Tris 15 mM, NaCl 50 mM, pH 8.6. La columna se lavó subsecuentemente con este tampón de lavado mientras que se incrementaba la cantidad de CaCl_2 (3-5-7-9 mM) en pasos isocráticos de 5 CV seguido por 10 CV de Tris 15 mM, NaCl 50 mM, CaCl_2 15 mM. La elución de FIX se realizó por medio de Tris 10 mM, NaCl 1 M. La SDS-PAGE mostró una banda débil en la última fracción de lavado con el tampón que contenía CaCl_2 15 mM.

[119] La cantidad de Proteína S en la fracción de elución se midió por medio de ELISA policlonal siendo menor que 1.5 ng/mL o menor que 7.5 ng.

Ejemplo de referencia 8 - Realización de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 8.0 para la purificación de un polipéptido de FVII que comprende las sustituciones de aminoácidos P10Q y K32E

[120] La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una columna (1 cm de diámetro interno x 3.2 cm de longitud = volumen de columna de 2.5 ml (CV)) empaquetada con Q-Sepharose FF de Amersham, equilibrada con 10 CV de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8. A 150 mL de sobrenadante de cultivo que contenía la variante de FVII con las mutaciones P10Q, K32E se agregaron 2.2 mL de una solución de EDTA 0.5 M. La conductividad se ajustó por la adición de 260 mL de agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés). El contenido de Proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA a 284 ng/mL o 97 microgramos en total. La columna se lavó con 10 CV de Tris 10 mM, NaCl 175 mM, pH 8 seguido por el lavado con tampón de equilibrio. La elución se realizó por medio de Tris 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl_2 35 mM, pH 8. El contenido de Proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA policlonal a 18 µg en la acumulación de la elución. La purificación se realizó a una velocidad de flujo de 24 CV/hora y a temperatura ambiente.

Ejemplo 9 - Realización de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 6.0 utilizando una elución de gradiente de MgCl_2

[121] La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una columna (1 cm de diámetro interno x 3.2 cm de longitud = volumen de columna de 2.5 ml (CV)) empaquetada con Q-Sepharose FF de Amersham, equilibrada con 10 CV de histidina 10 mM, NaCl 175 mM, pH 6.8 mL de una solución que contenía 1.6 mg/mL de polipéptido de FVII se cargaron en la columna. El contenido de Proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA a 360 ng/mL o 2900 ng en total. La columna se lavó con 10 CV de tampón de equilibrio seguido por el lavado con 5 CV del tampón de lavado de histidina 10 mM, NaCl 50 mM, pH 6. La elución se realizó por medio de un gradiente del tampón de lavado a histidina 10 mM, MgCl_2 50 mM, pH 6. El contenido de Proteína S se midió por medio de un ensayo ELISA policlonal a 790 ng en la acumulación de la elución. La purificación se realizó a una velocidad de flujo de 24 CV/hora y a 5°C.

Ejemplo 10 -Realización de una cromatografía de intercambio aniónico a pH 9.0

[122] La cromatografía de intercambio aniónico se realizó a pH 9.0 en una columna (0.5 cm de diámetro interno x 5.5 cm de longitud = volumen de columna de 1.0 ml (CV)) empaquetada con Source 30Q de Amersham, equilibrada con 10 CV de Tris 10 mM, CaCl_2 2 mM. La carga fue 8 ml de una solución que contenía 1 mg/ml de FVII y un contenido de Proteína S mayor que 10 ppm. La columna se lavó con 5 CV de Tris 10 mM, CaCl_2 2 mM. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 50 CV desde NaCl 0 mM a NaCl 600 mM, tamponado con Tris que contenía CaCl_2 2 mM. El nivel de Proteína S en las fracciones recolectadas se evaluó utilizando un ensayo ELISA de Proteína S. La Proteína S se eluyó en el borde delantero del pico principal que contenía > 99% de FVII. La purificación se realizó a una velocidad de flujo de 60 CV/hora y a una temperatura de 5°C.

C. Cromatografía de Interacción Hidrófoba**Ejemplo 11 - Realización de la cromatografía de interacción hidrófoba**

[123] La cromatografía de interacción hidrófoba se realizó a pH 6.0 en una columna (2.6 cm de diámetro interno x 8.5 cm de longitud = volumen de columna de 45.1 ml (CV)) empaquetada con Toso Haas TSK-Gel phenyl 5 PW, equilibrada con 10 CV de citrato 10 mM, NH_4 -acetato 1.7 M. La carga fue 215 ml de una solución que contenía aproximadamente 700 µg/ml de FVII y un contenido de Proteína S mayor que 200 ppm. A la solución de carga se agregó NH_4 -acetato 1.7 M. La columna se lavó con 5 CV de citrato 10 mM, NH_4 -acetato 1.7 M. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 20 CV desde NH_4 -acetato 1.7 M a NH_4 -acetato 0 M, tamponado con citrato. La acumulación contenía un nivel de Proteína S inferior a 100 ppm, es decir una reducción por un factor de al menos 2. La purificación se realizó a una velocidad de flujo de 20 CV/hora y a una temperatura de 5°C.

Ejemplo 12 - Realización de la HIC en presencia de Ca^{2+}

[124] La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se realiza en una columna (1 cm de diámetro interno x 7 cm de longitud = 5.5 ml) empaquetada con resina Toyopearl MD-G Butyl. La columna se equilibra con 10 CV de CaCl_2 35 mM, NaCl 1.5 M, histidina 10 mM, pH 6.0. Después del equilibrio, 42 ml de una solución que contenía 0.1 mg/ml de FVIIa se cargan en la columna. Después de la carga, la columna se lava con 10 CV del tampón de equilibrio. El FVII(a) enlazado se eluye utilizando EDTA 20 mM, histidina 50 mM, pH 6.0. Una acumulación que contenía FVII(a) se recolecta con un contenido reducido de Proteína S.

D-1. Inmunoadfinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-FVIIa dependientes de Ca^{2+}

Ejemplo 13 - Realización de la captura por inmunoadfinidad a pH 6

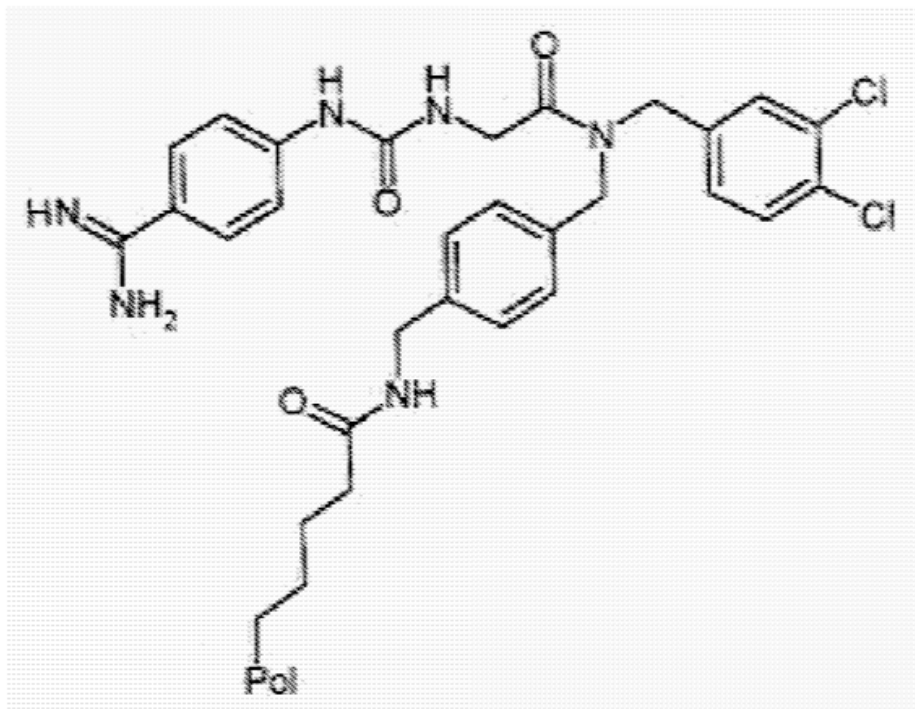
[125] Una porción de 1500 ml de sobrenadante de cultivo de CHO K1 se estabilizó por medio de la adición de calcio a una concentración de Ca^{2+} 10 mM y por medio de la adición de tampón de histidina a una concentración de 10 mM, se ajustó con HCl a pH 6.0 y se filtró a través de un filtro sin salida de 0.45 micrómetros. El sobrenadante de cultivo estabilizado se cargó en una columna (1,6 cm de diámetro interno x 10 cm de longitud = CV de 20 ml) empaquetada con un anticuerpo monoclonal anti-FVIIa dependiente de Ca^{2+} , se inmovilizó en Sepharose 4B de Pharmacia. Antes de la carga, la columna se equilibró con 5 CV de CaCl_2 10 mM, histidina 10 mM, pH 6.0. Después de la carga, la columna se lavó con NaCl 2 M, CaCl_2 10 mM, histidina 10 mM, pH 6.0 para 10 CV. El FVII(a) enlazado se eluyó con 10 CV de EDTA 30 mM, histidina 50 mM, pH 6.0. Una acumulación que contenía FVII(a) se recolectó de aproximadamente 0.1 AU (280 nm) en el borde delantero del pico principal a aproximadamente 0.1 AU (280 nm) en el borde posterior. Se utilizó una velocidad de flujo de 12 CV/hora y una temperatura de 5°C por toda la purificación. Los niveles de Proteína S se determinaron por medio de un ensayo ELISA de Proteína S, basado en anti-huPS policlonal.

D-2. Purificación por afinidad utilizando ligandos inmovilizados

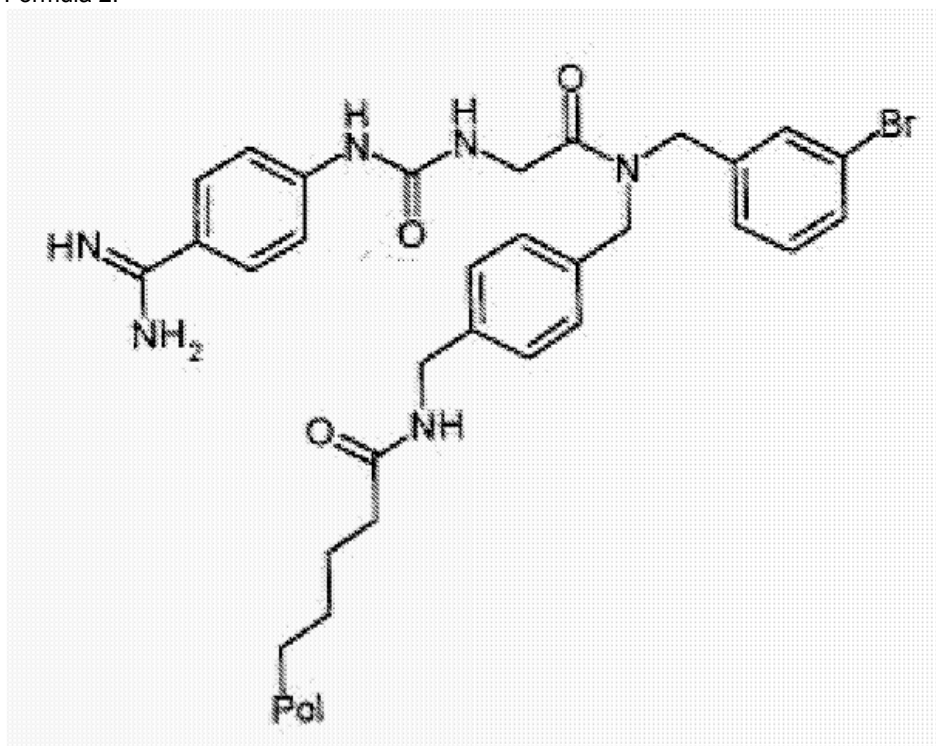
Ejemplo 14 - Purificación por afinidad de un análogo de FVII utilizando análogos de benzamidina inmovilizados

[126] Una columna HTrap (GE Healthcare) activada con NHS con un volumen de columna de 1 ml (CV) se acopló con el análogo de benzamidina (Fórmula 1 o Fórmula 2). La columna se equilibró con 5 CV de HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 7.5. La columna se cargó con 0,5 CV de una solución que contenía un análogo de FVII y 200 mg/L de Proteína S, a pH 7.5. Después de la carga, la columna se lavó con 6 CV de tampón de equilibrio. La elución se realizó con 5 CV de HAc 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 4.4 y 4 CV de Gly-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl_2 5 mM, Tween 80 al 0.01%, pH 3.0. El eluato se ajustó a pH 6, poco después de la elución. La velocidad de flujo fue 30 CV por hora y la conducción se realizó a temperatura ambiente. La mayor parte de la Proteína S no se enlazó a la resina y se observó en el flujo directo y el lavado. Se observó lo opuesto para FVII donde la mayor parte se enlazó a la resina y se eluyó con la disminución en el pH. El contenido de Proteína S en las fracciones de elución se midió por medio de un ensayo ELISA monoclonal siendo de aproximadamente 150 ng y 180 ng utilizando columnas inmovilizadas con un compuesto de la fórmula 1 o la fórmula 2, respectivamente.

Fórmula 1:



5 Fórmula 2:



Ejemplo de referencia 15. Purificación por afinidad de la proteína S utilizando ligandos de triazina inmovilizados (modo de flujo directo)

[127] La purificación se realizó en una columna (1 cm de diámetro interior x 6,2 cm de longitud = volumen de columna de 5 mL (CV)) empaquetada con ACL 5/5 (ProMetic), equilibrada con 10 CV de Tris 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8,5. La carga fue 43 mL de una solución que contenía más de 40000 ppm de Proteína S. La columna se lavó con 2 CV de Tris 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8,5. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de 40 CV de Tris 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8,5 a Tris 20 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM, pH 8,5. Una acumulación que

contenía el FVII se recolectó proporcionando un eluato que contenía un nivel de Proteína S inferior a 7000 ppm de proteína S.

E. Cromatografía de Intercambio Catiónico

5 **Ejemplo de referencia 16 - Intercambiador de cationes Obelix CIE de Amersham número de catálogo 11-0010**

10 [128] Los medios de cultivo se cargaron en la resina de intercambio catiónico. La columna se equilibró con NaAc 30 mM pH 7.0. La velocidad de flujo fue 48 CV/H a temperatura ambiente. Después de la carga, la resina se lavó con tampón de equilibrio seguido por el lavado con NaAc 1M pH 7 para 5-10 volúmenes de columna. El tampón de equilibrio se aplicó nuevamente para 10 volúmenes de columna. El producto se eluyó con NaAc 30 mM, NaCl 2 M, pH 6.3 o tampón de Tris a pH más alto y NaCl. La acumulación se recolectó en una base de UV y se enfrió inmediatamente. La proteína S se eluyó en los pasos de lavado. La columna se limpia con NaOH 1 M después del uso.

15 [129] Alternativamente, se agregó NaAc a la aplicación a 1M a pH 7 y se lavó con el mismo tampón. El tampón de equilibrio fue NaAc 1M pH 7.0. Después de la aplicación, el material no enlazado se deslavó con tampón de equilibrio. Un lavado con NaAc 30 mM pH 6.3 se condujo para 10 cv y el producto se eluyó por medio de NaAc 30 mM, NaCl 2M pH 6.3 o tampón de Tris a pH más alto y NaCl. La acumulación se recolectó en una base de UV. La proteína S se eluye en los pasos de lavado.

20 [130] La resina también se utilizó de la siguiente manera: Se equilibró con NaAc 30 mM pH 6.0 y se aplicó el producto (conductividad inferior a 10 mS/cm). Los materiales no enlazados se deslavan con tampón de equilibrio y la elución se realizó al incrementar el gradiente de NaCl. La velocidad de flujo fue 30 cv/hora a temperatura ambiente. La acumulación se recolectó en una base de UV. La Proteína S se eluyó en el frente del producto.

25 **Ejemplo de referencia 17 - SP-Sepharose HP, Amersham número de catálogo 17-1087**

30 [131] La columna se equilibró con Mes 50 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH 5.75. La aplicación se ajustó a una conductividad menor que 10 mS/cm. El material no enlazado se deslavó con tampón de equilibrio y luego el producto se eluyó al incrementar la concentración de NaCl. La velocidad de flujo fue 48 volúmenes de columna por hora y la purificación se realizó en una habitación fría.

[132] La proteína S se eluye en las fracciones de funcionamiento directo. La columna se limpió con NaOH 1M después del uso.

35 **Ejemplo de referencia 18 - Toyopearl SP 650 M**

40 [133] La reducción de la Proteína S de una mezcla que comprendía aproximadamente 25 mg/l de FVII y 25 mg/l de Proteína S se realizó en una columna Toyopearl SP 650 M (Tosoh Bioscience) de 1 ml (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de altura del lecho). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 y 0.5 ml de la mezcla que comprendía FVII y Proteína S se cargaron en la columna. La columna se lavó/eluyó con 1 CV de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 seguido por un lavado/elución de gradiente de NaCl 0-1 M en solución tampón de histidina 10 mM, pH 6. El paso de purificación completo se operó a una velocidad de flujo de 48 CV/hora a temperatura ambiente. La proteína S se eluyó en el flujo directo y FVII durante la elución de gradiente. La separación de la proteína S y FVII se identificó y se confirmó por medio del análisis de SDS-PAGE nativo, estándar con tinción de plata y por medio de una conducción de purificación paralela que cargaba un estándar de FVII. La columna se equilibró con 3 CV de NaOH 0.1 M, seguido por 10 CV de tampón de NaCl 1.5 M + histidina 25 mM, pH 6.

Ejemplo de referencia 19 - CM Sepharose FF

50 [134] La reducción de la Proteína S de una mezcla que comprendía aproximadamente 25 mg/l de FVII y 25 mg/l de Proteína S se realizó en una columna CM Sepharose FF (GE Health Care) de 1 ml (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de altura del lecho). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de solución tampón de histidina 40 mM, pH 6, y 0.5 ml de la mezcla que comprendía FVII y Proteína S se cargaron en la columna. La columna se lavó/eluyó con 1 CV de solución tampón de histidina 40 mM, pH 6 seguido por un lavado/elución de gradiente de NaCl 0-0.35 en solución tampón de histidina 40 mM, pH 6. El paso de purificación completo se operó a una velocidad de flujo de 48 CV/hora a temperatura ambiente. La Proteína S se eluyó en el flujo directo y el FVII durante la elución de gradiente. La separación de la Proteína S y FVII se identificó y se confirmó por medio del análisis de SDS-PAGE nativo, estándar con tinción de plata. La columna se equilibró con 3 CV de NaOH 0.1 M, seguido por 10 CV de tampón de NaCl 1.5 M + histidina 25 mM, pH 6.

60 **Ejemplo de referencia 20 - CM Sepharose FF**

65 [135] La reducción de la Proteína S de una mezcla que comprendía aproximadamente 25 mg/l de FVII y 25 mg/l de Proteína S se realizó en una columna CM Sepharose FF (GE Health Care) de 1 ml (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de altura del lecho). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 y 0.5 ml de la mezcla que comprendía FVII y Proteína S se cargaron en la columna. La columna se lavó/eluyó

con 1 CV de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 seguido por un lavado/elución de gradiente de NaCl 0-0.35 en solución tampón de histidina 10 mM, pH 6. El paso de purificación completo se operó a una velocidad de flujo de 48 CV/hora a temperatura ambiente. La Proteína S se eluyó en el flujo directo y FVII durante la elución de gradiente. La separación de la Proteína S y FVII se identificó y se confirmó por medio del análisis de SDS-PAGE nativo, estándar con tinción de plata. La columna se equilibró con 3 CV de NaOH 0.1 M, seguido por 10 CV de tampón de NaCl 1.5 M + histidina 25 mM, pH 6.

Ejemplo de referencia 21 — Toyopearl SP 650 M

[136] La reducción de la Proteína S de una mezcla que comprendía aproximadamente 25 mg/l de FVII y 25 mg/l de Proteína S se realizó en una columna Toyopearl SP 650 M (Tosoh Bioscience) de 1 ml (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de altura del lecho). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 y 0.5 ml de la mezcla que comprendía FVII y Proteína S se cargaron en la columna. La columna se lavó/eluyó con 1 CV de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 seguido por un lavado/elución de gradiente de NaCl 0-0.35 M en solución tampón de histidina 10 mM, pH 6. El paso de purificación completo se operó a una velocidad de flujo de 48 CV/hora a temperatura ambiente. La Proteína S se eluyó en el flujo directo y FVII durante la elución de gradiente. La separación de la Proteína S y FVII se identificó y se confirmó por medio del análisis de SDS-PAGE nativo, estándar con tinción de plata. La columna se equilibró con 3 CV de NaOH 0.1 M, seguido por 10 CV de tampón de NaCl 1.5 M + histidina 25 mM, pH 6.

Ejemplo de referencia 22 - Capto MMC

[137] Los medios cromatográficos se empaquetaron en una columna de 1.6 cm de diámetro a una altura del lecho de 10 cm. La purificación se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 20 volúmenes de columna por hora, a aproximadamente 5°C. La columna se equilibró en NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM e histidina 20 mM, pH 6.0. Al sobrenadante de cultivo que comprendía FVII se agregó CaCl₂ e histidina a concentraciones de 5 y 10 mM respectivamente, se ajustó a pH 6.0 y se cargó en la columna. La carga de columna específica fue aproximadamente 1.3 mg de FVII por mL de lecho empaquetado. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio, seguido por NaCl 0.8 M, CaCl₂ 10 mM, histidina 20 mM, pH 6.6, seguido por tampón de equilibrio, seguido por NaCl 0.5 M, histidina 25 mM, pH 5.8. El FVII se eluyó de la columna con NaCl 0.5 M, histidina 25 mM, pH 6.8. La Proteína S se encontró enriquecida en el flujo directo durante la carga y en la fracción de lavado con NaCl 0.8 M, CaCl₂ 10 mM, histidina 20 mM, pH 6.6.

F. Cromatografía utilizando un material de Hidroxiapatita

Ejemplo 23 - Columna de hidroxiapatita, BioRad número de catálogo 157-0085 Tipo I 80 um

[138] La aplicación se ajusta respecto al pH y luego se aplica directamente sobre la resina la cual es equilibrada anteriormente. La velocidad de flujo es 42 volúmenes de columna por hora a 4-20°C. Deslavar con tampón de equilibrio (agua) hasta la línea de referencia y luego eluir el producto con un gradiente creciente de tampón de K₂HPO₄/KH₂PO₄ a 400 mM a pH 6.2. La acumulación se recolecta en una base de UV y se enfría inmediatamente.

[139] La Proteína S se eluye en la parte posterior del producto. La columna se limpia con NaOH 1M después del uso.

G. Cromatografía de Afinidad de Heparina

Ejemplo 24 - Heparina Toyopearl 650 M

[140] La reducción de la Proteína S de una mezcla que comprendía aproximadamente 25 mg/l de FVII y 25 mg/l de Proteína S se realizó en una columna Heparina Toyopearl 650 M (Tosoh Bioscience) de 1 ml (0.5 cm de diámetro interno x 5 cm de altura del lecho). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna (CV) de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 y, 0.5 ml de la mezcla que comprendía FVII y Proteína S se cargaron en la columna. La columna se lavó/eluyó con 1 CV de solución tampón de histidina 10 mM, pH 6 seguido por un lavado/elución de gradiente de NaCl 0-0.35 en solución tampón de histidina 10 mM, pH 6. El paso de purificación completo se operó a una velocidad de flujo de 48 CV/hora a temperatura ambiente. La Proteína S se eluyó antes del FVII durante la elución de gradiente. La separación de la Proteína S y FVII se identificó y se confirmó por medio del análisis de SDS-PAGE nativo, estándar con tinción de plata. La columna se equilibró con 3 CV de NaOH 0.1 M, seguido por 10 CV de NaCl 1.5 M + tampón de histidina 25 mM, pH 6.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir el contenido de proteína S en una composición que comprende una proteína dependiente de vitamina K recombinante de interés producida bajo condiciones de cultivo celular, comprendiendo dicho método someter la composición a una combinación de las etapas A y B:
 - (A) poner en contacto dicha composición que comprende una proteína dependiente de vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo celular con un material en fase sólida que tiene anticuerpos monoclonales contra la proteína dependiente de vitamina K de interés, la cual es capaz de enlazar a la proteína dependiente de vitamina K de interés y recolectar una segunda composición resultante que comprende la proteína de interés dependiente de vitamina K; y
 - (B) poner en contacto una composición que ha sido sometida a la etapa (A) con un material en fase sólida que tiene anticuerpos monoclonales contra la proteína S, que es capaz de enlazar la proteína S mientras la proteína dependiente de vitamina K de interés no se enlaza a la fase sólida y fluye a través de la columna cromatográfica; y recolectar una composición resultante que comprende la proteína de interés dependiente de vitamina K; donde la composición que comprende una proteína dependiente de vitamina K de interés producida bajo condiciones de cultivo celular es un sobrenadante de cultivo celular y donde dicho sobrenadante de cultivo celular se aplica al material en fase sólida del paso (A) sin pasos de purificación previos, donde la concentración de proteína S, expresada como partes por millón en relación a la proteína de interés dependiente de vitamina K ha sido reducida de dicho sobrenadante de cultivo celular para la composición resultante de la etapa (B) en por lo menos un factor de 2.
2. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el nivel de Proteína S expresado en partes por millón con relación a la proteína de interés dependiente de vitamina K se ha reducido de dicho sobrenadante de cultivo celular a la composición resultante de la etapa (B) por al menos un factor de 5.
3. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la proteína dependiente de vitamina K de interés es un polipéptido de Factor IX.
4. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la proteína dependiente de vitamina K de interés es un polipéptido de Factor X.
5. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la proteína de interés dependiente de vitamina K es un polipéptido de Factor VII.
6. Método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la proteína de interés dependiente de vitamina K es un polipéptido de Factor VIIa humano natural.
7. Método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el polipéptido de Factor VII comprende una sustitución de aminoácidos que se selecciona de P10Q y K32E.
8. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicha proteína S es una proteína S de hámster.
9. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la concentración de proteína S, expresada como partes por millón en relación a la proteína de interés dependiente de vitamina K, ha sido reducida por lo menos en un factor de 10, o por lo menos en un factor de 25, o por lo menos en un factor de 50, tal como por lo menos un factor de 100, o por lo menos un factor de 250 o por lo menos un factor de 500 o por lo menos un factor de 750 o por lo menos un factor de 1000 o por lo menos un factor de 2000 o por lo menos un factor de 5000.
10. Método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el contenido de uno o varios contaminantes de proteína S en el sobrenadante de cultivo celular no purificado es de por lo menos 500 ppm.
11. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el contenido total de contaminantes de proteína en la composición purificada resultante que comprende proteína de interés dependiente de vitamina K es como máximo 100 ppm, o como máximo 50 ppm, o como máximo 10 ppm, o como máximo 5 ppm, o como máximo 2 ppm, o como máximo 1 ppm.