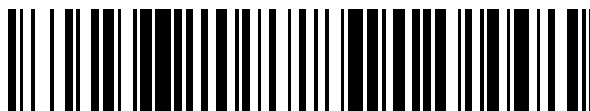


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 091**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2004 E 04804635 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1711513**

54 Título: **Nanofiltración de soluciones del factor VII para eliminar virus**

30 Prioridad:

**01.12.2003 DK 200301775**

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

**14.10.2014**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)  
Thurgauerstrasse 36/38  
8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**CHRISTENSEN, JESPER;  
HALKJAER, ERIK;  
PREUSS, TURID;  
HANSEN, THOMAS BUDDE;  
TOMODA, LENE VAEDELE MADSEN y  
JOHANSEN, NINA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 507 091 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**

Nanofiltración de soluciones del factor VII para eliminar virus

La presente invención se refiere a un método novedoso para mejorar la seguridad viral de composiciones líquidas del factor VII que comprenden polipéptidos del factor VII activos (un polipéptido del factor VIIa).

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Se han identificado una serie de factores que participan en el proceso de coagulación sanguínea, incluido el factor VII (FVII), una glucoproteína plasmática. La hemostasia se inicia por la formación de un complejo entre el factor tisular (TF, por sus siglas en inglés), cuando este se expone a la sangre circulante tras una herida en la pared del vaso, y el factor VIIa que está presente en la circulación en una cantidad correspondiente a aproximadamente un 1% de la masa proteica del factor VII total. El factor VII existe en el plasma principalmente como un zimógeno monocatenario al que FXa escinde en su forma activada bicatenaria, el factor VIIa. El factor VIIa activado recombinante (rFVIIa) se ha desarrollado como un agente prohemostático. La administración de rFVIIa ofrece una respuesta prohemostática rápida y sumamente eficaz en los sujetos hemofílicos con hemorragias a los que no se puede tratar con otros productos de factores de la coagulación debido a la formación de anticuerpos. Asimismo, la hemorragia en sujetos con una deficiencia en el factor VII o sujetos que tienen un sistema de coagulación normal pero que experimentan una hemorragia excesiva se pueden tratar con éxito con el factor VIIa.

La purificación y manipulación del factor VII debe ser cuidadosa, debido a la posibilidad de degradación de la molécula. El factor VII y el factor VIIa, que son moléculas grandes (peso molecular de aproximadamente 50 kD), pueden sufrir degradación mecánica debido a las fuerzas de cizalladura durante la purificación y filtración. Además, el factor VIIa es una enzima proteolítica activa que degrada otras proteínas, incluido el factor VIIa. La degradación del factor VIIa conlleva principalmente una escisión en la cadena pesada del factor VIIa, particularmente en los aminoácidos n.º 290 y 315 de la molécula. Finalmente, se pueden oxidar los residuos de metionina del factor VII y el factor VIIa.

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método para retirar o inactivar virus de las composiciones líquidas de factor VII, método por el cual se preserva sustancialmente la integridad de los componentes del factor VII.

El documento WO 96/00237 describe un método de filtración de virus de una solución que contiene un componente macromolecular, p. ej., una proteína tal como el factor IX proteico plasmático.

El documento WO 98/37086 describe la retirada de virus de soluciones proteicas derivadas de plasma por nanofiltración utilizando una membrana que tiene un tamaño de poro promedio de 15 nm.

Tomokiyo *et al.*, Vox Sanguinis, 2003, 84, 54-64, describen la producción a gran escala de un concentrado del factor VII activado derivado del plasma. El método de producción conlleva el paso de filtración de virus de una solución que comprende el factor VII inactivo.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a métodos para retirar virus de la composición del factor VII. El término "virus" tal como se emplea en la presente se refiere a cualquier agente infeccioso ultramicroscópico que se replica a sí mismo únicamente dentro de células de hospedadores vivos o partículas no infecciosas derivadas de este. En una realización, el virus es infeccioso. En una realización, el virus es una partícula vírica no infecciosa.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para retirar virus de una composición líquida del factor VII recombinante, donde dicha composición comprende uno o más polipéptidos del factor VII, donde la concentración de los polipéptidos del factor VII está comprendida en el intervalo de 0.01 a 5 mg/mL, y donde la forma activada de los polipéptidos del factor VII representa un 50-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII en la composición, donde dicho método comprende someter dicha solución a nanofiltración utilizando un nanofiltro con un tamaño de poro de 80 nm como máximo.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método del primer aspecto, donde dicha composición líquida está sustancialmente exenta de suero.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método tal como se ha descrito anteriormente, donde dicho nanofiltro tiene una membrana producida a partir de uno o más materiales seleccionados entre celulosa regenerada de cupramonio, fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) hidrófilo, PVDF compuesto, PVDF modificado superficialmente y poliéter sulfona.

En un aspecto adicional de la invención, el método comprende además un método para inactivar virus en una composición líquida del factor VII, donde dicho método comprende el paso de combinar dicha composición con un detergente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para una eliminación de alto nivel de la presencia de virus activos en una composición líquida de factor VII, donde el método comprende los pasos de (i) inactivar virus y (ii) retirar virus.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

5 La Figura 1 es una ilustración esquemática de un sistema adecuado para los métodos de la invención. El sistema incluye un depósito a presión (1) con un suministro de aire comprimido, un prefiltro (2) para retirar partículas que de otra manera podrían obstruir el filtro de virus, un manómetro (P), un filtro de virus (3) y un depósito de recogida (4).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

10 La presente invención proporciona métodos para retirar virus, incluidos los virus sin envoltura, de una composición líquida del factor VII que comprende una proporción significativa de polipéptidos activados, y de este modo activos proteolíticamente, del factor VII, donde dicha composición comprende uno o más polipéptidos del factor VII, donde la concentración de los polipéptidos del factor VII está comprendida en el intervalo de 0.01 a 5 mg/mL y donde la forma activada de los polipéptidos del factor VII representa un 50-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII en la composición. El método incluye el paso de someter la composición líquida del factor VII a nanofiltración utilizando un nanofiltro que tiene un tamaño de poro de 80 nm como máximo.

El método es particularmente útil para retirar virus con envoltura así como de virus sin envoltura tales como el virus de la leucemia murina (con envoltura) que se puede retirar con filtros con un tamaño de poro de aproximadamente 50 nm y el parvovirus porcino (sin envoltura) que se puede retirar con filtros con un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm.

20 Las composiciones líquidas de factor VII, p. ej., aquellas que comprenden una proporción significativa de polipéptidos activados del factor VII, puede prepararse, en principio, a partir de los componentes del factor VII secos, pero más normalmente se obtienen a partir de procesos de producción a gran escala, p. ej., procesos que conllevan técnicas recombinantes. En este tipo de procesos, normalmente se recolecta el sobrenadante del cultivo celular y se somete posteriormente a uno o más pasos de procesamiento para obtener la proteína deseada, incluidas, sin carácter limitante, la centrifugación o filtración para retirar células que no se han inmovilizado sobre los portadores; cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión por tamaño; procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo (IEF, por sus siglas en inglés), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato amónico) o extracción y similares. Remítase a, en general, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, Nueva York, 1982; y *Protein Purification*, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989. La purificación de los polipéptidos del factor VII también puede conllevar, p. ej., cromatografía de afinidad sobre una columna con un anticuerpo contra el factor VII (remítase a, p. ej., Wakabayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261:11097, 1986; y Thim *et al.*, *Biochem.* 27:7785, 1988) y la activación por escisión proteolítica, utilizando el factor XIIa y otras proteasas que tienen una especificidad similar a la tripsina tales como, p. ej., el factor IXa, kalikreína, factor Xa y trombina. Remítase a, p. ej., Osterud *et al.*, *Biochem.* 11:2853 (1972); Thomas, patente de EE. UU. N.º 4.456.591; y Hedner *et al.*, *J. Clin. Invest.* 71:1836 (1983). Como alternativa, el polipéptido del factor VII se puede activar haciéndolo pasar a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico tal como Mono Q® (Farmacia) o similares.

40 Los métodos de la presente invención son particularmente útiles para los procesos de producción a gran escala. Con la expresión "a gran escala" se quiere dar a entender normalmente métodos donde el volumen de las composiciones líquidas de polipéptido del factor VII es de al menos 100 L, tal como de al menos 500 L, p. ej., de al menos 1000 L o de al menos 5000 L. Esto no debe ser limitante de ningún modo ya que la presente invención también sirve para composiciones líquidas del polipéptido del factor VII de menos de 100 L.

En la actualidad se ha comprendido que la nanofiltración se puede aplicar incluso después de que la mayor parte del polipéptido del factor VII se haya activado parcial o completamente.

45 Por lo tanto, los métodos de la invención son aplicables como uno de los pasos del proceso de purificación global del polipéptido del factor VII, normalmente uno de los pasos finales del proceso de purificación.

Más específicamente, un proceso de purificación típico que se inicia a partir del material recolectado a partir del caldo de fermentación, se puede resumir tal como sigue:

Paso de purificación	Etapas posibles para la filtración de virus
Recolección	
↓	1

Paso de purificación	Etapas posibles para la filtración de virus
Captura	
↓	2
Purificación del intermedio	
↓	3
Depuración	
↓	4
Sustancia farmacológica	

El contenido del polipéptido del factor VII en la forma activada es inicialmente (es decir, a partir del paso de recolección) normalmente de aproximadamente un 2% y aumenta a lo largo del proceso de purificación hasta un 90% o más antes de obtener el polipéptido como una sustancia farmacológica.

- 5 La composición líquida del factor VII sometida a nanofiltración comprende uno o más polipéptidos del factor VII en un disolvente adecuado. El disolvente es normalmente agua o una solución/mezcla acuosa tal como agua pura, un tampón acuoso, una mezcla agua/etanol, una mezcla agua/DMSO o una solución salina acuosa, p. ej., solución salina, una solución de urea o una solución de guanidina. Un líquido acuoso adecuado también puede comprender un detergente (surfactante).
- 10 En realizaciones interesantes, la composición líquida del factor VII se obtiene, u origina, a partir de un sobrenadante de un cultivo celular, p. ej., un sobrenadante de un cultivo celular obtenido tal como se describe en el documento WO 02/29084. En una realización, la composición líquida del factor VII está exenta de suero, es decir, exenta de componentes derivados de animales. Por lo tanto, los cultivos celulares se pueden cultivar en un medio que carezca de componentes derivados de animales.
- 15 Una variante atractiva de la presente es aquella en la que el polipéptido o los polipéptidos del factor VII está/están producidos por cultivos celulares en células CHO, p. ej., en células CHO en un medio exento de cualesquiera componentes de origen animal, o en un medio que carece de componentes derivados de animales y que carece de proteínas ("exento de proteínas").
- 20 El medio para las células CHO puede ser cualquier medio CHO exento de proteínas comercializado que carece de componentes derivados de animales o un medio producido internamente para las células CHO.
- 25 En algunas realizaciones, las células utilizadas al llevar a la práctica la presente invención se adaptan al crecimiento de la suspensión en un medio que carece de componentes derivados de animales tales como, p. ej., medio que carece de suero. Este tipo de procedimientos de adaptación se describen, p. ej., en Scharfenberg *et al.*, *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers, págs. 619-623, 1995 (células BHK y CHO); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11:117-120, 1997 (células de insecto); Keen, *Cytotechnol.* 17:203-211, 1995 (células de mieloma); Berg *et al.*, *Biotechniques* 14:972-978, 1993 (células de riñón humano 293). En una realización particular, las células hospedadoras son células BHK 21 o CHO que se pueden haber manipulado para expresar el factor VII humano o un polipéptido del factor VII y que se han adaptado para crecer en ausencia de suero o de componentes derivados de animales.
- 30 En una realización alternativa, el polipéptido o los polipéptidos del factor VII está/están producido/producidos por cultivos celulares en presencia de suero bovino fetal o bovino.
- El polipéptido del factor VIIa representa un 50-100%, tal como un 70-100%, p. ej., un 80-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII.
- 35 En la mayoría de las realizaciones, la solución comprende un polipéptido del factor VII en forma inactivada así como también un polipéptido del factor VIIa bioactivo, es decir, el polipéptido del factor VIIa representa menos de un 100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII. En la realización más típica, la composición comprende un polipéptido del factor VIIa (activado) que se corresponde con un polipéptido del factor VII (inactivo), es decir, el polipéptido del factor VIIa es el polipéptido del factor VII en la forma activada. En otra realización, el polipéptido del factor VIIa es diferente en cierto modo de la forma activada del polipéptido del factor VII inactivado.

Por supuesto, debería sobreentenderse que la composición en las realizaciones particulares puede comprender más de un polipéptido del factor VII y más de un polipéptido del factor VIIa.

La expresión "uno o más polipéptidos del factor VII" engloba el factor VII natural (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la patente de EE. UU. N.º 4.784.950), así como también variantes del factor VII que muestran una actividad biológica sustancialmente idéntica o mejorada respecto al factor VII natural. La expresión "factor VII" se pretende que englobe polipéptidos del factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como aquellos que han sido procesados proteolíticamente para generar sus formas bioactivas respectivas, que se pueden denominar factor VIIa. Normalmente, el factor VII sufre la escisión entre los residuos 152 y 153 para generar el factor VIIa. La expresión "factor VIIa" se refiere específicamente a un polipéptido del factor VII activado (es decir, bioactivo, escindido). Por lo tanto, el "factor VIIa" es un subgrupo respecto al "factor VII". La expresión "factor VII inactivo" se refiere específicamente al factor VII que no es un factor VIIa.

La expresión "polipéptido del factor VII" también engloba polipéptidos, incluidas variantes, en los cuales la actividad biológica del factor VIIa se ha modificado sustancialmente o reducido en cierto modo respecto a la actividad del factor VIIa natural, así como también derivados del factor VII y conjugados del factor VII. Estos polipéptidos incluyen, sin carácter limitante, el factor VII o factor VIIa en el que se han introducido alteraciones específicas en la secuencia de aminoácidos que modifican o perturban la bioactividad del polipéptido. La expresión "derivado del factor VII", tal como se emplea en la presente, se pretende que designe el factor VII natural, variantes del factor VII que exhiben una actividad biológica sustancialmente idéntica o mejorada respecto al factor VII natural y polipéptidos relacionados con el factor VII, en los cuales se han modificado química y/o enzimáticamente uno o más de los aminoácidos del péptido original, p. ej., por alquilación, glucosilación, acilación, formación de ésteres o formación de aminas o similares. Esto incluye, sin carácter limitante, los conjugados de FVII tal como se describen en el documento WO 01/04287, solicitud de patente de EE. UU. 20030165996, documentos WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) y WO 02/02764, solicitud de patente de EE. UU. 20030211094 (Universidad de Minnesota).

La actividad biológica del factor VIIa en la coagulación sanguínea se deriva de su capacidad para (i) unirse al factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del factor IX o factor X para producir el factor IX o X activado (factor IXa o Xa, respectivamente).

A efectos de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos del factor VII ("actividad biológica del factor VII") se puede cuantificar midiendo la capacidad de una preparación para promover la coagulación sanguínea utilizando plasma deficiente en factor VII y tromboplastina, tal como se describe, p. ej., en la patente de EE. UU. N.º 5.997.864 o el documento WO 92/15686. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación respecto a una muestra de control y se convierte a "unidades del factor VII" por comparación con una mezcla de sueros humanos estándar que contiene 1 unidad/mL de actividad del factor VII. Como alternativa, la actividad biológica del factor VIIa se puede cuantificar (i) midiendo la capacidad del factor VIIa (o el polipéptido del factor VII) para producir factor X activado (factor Xa) en un sistema que comprende TF incluido en una membrana lipídica y factor X. (Persson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:19919-19924, 1997); (ii) midiendo la hidrólisis del factor X en un sistema acuoso ("ensayo proteolítico *in vitro*", véase posteriormente); (iii) midiendo la unión física del factor VIIa (o del polipéptido del factor VII) al TF utilizando un instrumento basado en resonancia de plasmones superficiales (Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997); (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético por parte del factor VIIa (o un polipéptido del factor VII) (ensayo de hidrólisis *in vitro*, véase posteriormente); o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema *in vitro* independiente del TF.

Las variantes del factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente idéntica o mejorada respecto al factor VIIa natural engloban aquellas que exhiben al menos aproximadamente un 25%, tal como al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos aproximadamente un 75%, tal como al menos aproximadamente un 90% de la actividad específica del factor VIIa que ha sido producido en el mismo tipo celular, cuando se estudia en uno o más de los siguientes ensayos: ensayo de coagulación, ensayo proteolítico o ensayo de unión al TF tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, la actividad biológica es más de un 80% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante. En otra realización, la actividad biológica es más de un 90% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante. En una realización adicional, la actividad biológica es más de un 100% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante. En una realización adicional, la actividad biológica es más de un 120% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante. En una realización adicional, la actividad biológica es más de un 200% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante. En una realización adicional, la actividad biológica es más de un 400% de la actividad biológica del factor VIIa humano natural recombinante.

Las variantes del factor VII, tanto si exhiben una bioactividad sustancialmente idéntica o mejor que el factor VII natural como si, de manera alternativa, exhiben una bioactividad sustancialmente modificada respecto al factor VII natural incluyen, sin carácter limitante, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del factor VII natural por inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos.

Los ejemplos no limitantes de variantes del factor VII que tienen una actividad biológica sustancialmente idéntica al factor VII natural incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 352: 182-192, 1998); variantes del factor VIIa que exhiben un aumento de la estabilidad proteolítica tal como se describe en la patente de

EE. UU. N.º 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 tal como se describen en el documento PCT/DK02/00189 (WO 02/077218); y variantes del factor VII que exhiben un aumento de la estabilidad proteolítica tal 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 una unión a la membrana más intensa tal como se describe en los documentos WO 99/20767, patentes de EE. UU. US 6017882 y US 6747003, solicitud de patente de EE. UU. 20030100506 (Universidad de Minnesota) y documento WO 00/66753, aplicaciones de patente de EE. UU. US 20010018414, US 2004220106 y US 200131005, patentes de EE. UU. US 6762286 y US 6693075 (Universidad de Minnesota); y variantes del Factor VII tal como se describen en el documento WO 01/58935, patente de EE. UU. US 6806063, solicitud de patente de EE. UU. 20030096338 (Maxygen ApS), documento WO 03/93465 (Maxygen ApS) y documento WO 04/029091 (Maxygen ApS).

Los ejemplos no limitantes de variantes del factor VII que tienen una mayor actividad biológica en comparación con el factor VIIa natural incluyen variantes del factor VII tal como las descritas en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes del factor VIIa con una actividad potenciada tal como se describen en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Los ejemplos explícitos de polipéptidos del factor VII incluyen, sin carácter limitante, el factor VII natural, 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/M298K-FVII y 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/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/V158D/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/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/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/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-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/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-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/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-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/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII,

5 F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII,  
 F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII,  
 F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII,  
 F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII,  
 F374Y/V158D/M298Q/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,  
 10 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A -FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,  
 15 F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-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,  
 20 F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII,  
 F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 25 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,  
 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, factor VIIa que carece del dominio Gla; y  
 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-  
 FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y Factor VII que tiene sustituciones, adiciones o eliminaciones en la  
 30 secuencia de aminoácidos desde 233Thr hasta 240Asn, Factor VII que tiene sustituciones, adiciones o eliminaciones  
 en la secuencia de aminoácidos desde 304Arg hasta 329Cys.

En algunas realizaciones, el polipéptido del factor VIIa es el factor VIIa humano (hFVIIa) tal como el factor VIIa humano generado recombinantemente (rhFVIIa). En otras realizaciones, el polipéptido o los polipéptidos del factor VII comprenden una variante de la secuencia del factor VII. En algunas realizaciones, el polipéptido o los polipéptidos del factor VII tienen una glucosilación diferente de la del factor VII natural.

**Nanofiltración**

La composición líquida del factor VII se somete a nanofiltración utilizando un nanofiltro que tiene un tamaño de poro de 80 nm como máximo. El tamaño de poro del nanofiltro es, más concretamente, de 50 nm como máximo, p. ej., de 30 nm como máximo, tal como comprendido en el intervalo de 10-30 nm.

40 La expresión "tamaño de poro" se refiere normalmente al tamaño de los virus más pequeños que son retenidos por el filtro.

Algunos ejemplos de nanofiltros comercializados adecuados son Asahi Planove 15 N, Asahi Planove 20 N, Asahi Planova 35 N y Asahi Planova 75 N, todos de Asahi Chemical, Tokio, Japón; Millipore NFR, Millipore NFP, Millipore Viresolve 70 y Millipore Viresolve 180, todos de Millipore; y Pall DV20, Pall DV 50, Pall Omega VR 100 K; y membrana microporosa de Bemberg15 nm (BMM-15).

La membrana del nanofiltro se puede producir, p. ej., a partir de uno o más materiales seleccionados entre celulosa regenerada de cupramonio, fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilo, PVDF compuesto, PVDF modificado superficialmente, poliéter sulfona y materiales similares. En una realización, el material se selecciona entre materiales a base de fluoruro de polivinilideno y materiales a base de poliéter sulfona.

50 La nanofiltración se puede realizar en un modo de filtración tangencial o en un modo de filtración frontal (*dead-end*) como bien sabrá el experto en la técnica. En una realización, la nanofiltración se realiza en el modo de filtración frontal.

El valor de pH de la composición líquida del factor VII tras la nanofiltración no se considera especialmente crucial. Por lo tanto, el valor de pH se proporciona normalmente en función de las condiciones aplicadas en los pasos del proceso que preceden inmediatamente al paso de nanofiltración. En algunas realizaciones, el valor de pH se ajusta de modo que la composición líquida tenga un pH comprendido en el intervalo de 5.5-10, tal como en el intervalo de 7.0-9.5, p. ej., en el intervalo de 7.6-9.4, tal como en el intervalo de 7.7-9.3, p. ej., en el intervalo de 8.0-9.0 o en el intervalo de 8.3-8.7. En una realización, el pH está comprendido en el intervalo de 5-7. En una realización, el pH es superior a 9.5, tal como comprendido en el intervalo de 9.5-10.

Además, la concentración del polipéptido del factor VII en la composición líquida está comprendida en el intervalo de 0.01-5 mg/mL, tal como en el intervalo de 0.05-2.0 mg/mL.

El proceso de nanofiltración se puede llevar a cabo utilizando un sistema de filtración tal como se ilustra en la Figura 1.

- 5 El proceso se puede llevar a cabo según el siguiente ejemplo ilustrativo: el depósito a presión (1) se llena con agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) y la presión en el depósito se eleva hasta 3.5 bar antes del filtro de virus (3) y se hace pasar líquido por el filtro durante 10 minutos. La presión se reduce hasta 2 bar y se hace pasar líquido por el filtro de virus (3) durante otros 10 minutos. El depósito a presión (1) se vacía de WFI y el proceso se repite opcionalmente con un tampón antes de que la composición líquida del factor VII se introduzca en el depósito a presión (1). La presión se eleva hasta 2 bar y se mantiene sustancialmente constante durante la filtración. El filtro de virus (3) se puede someter a estudio posteriormente para determinar su integridad por procedimientos habituales.

El filtrado se recoge en el depósito de recogida y se puede procesar adicionalmente con el fin de obtener una composición farmacéutica que comprenda un polipéptido del factor VIIa tal como una sustancia farmacológica.

- 15 Habiendo dicho esto, normalmente resulta ventajoso aplicar un paso de prefiltración antes del paso de nanofiltración con el fin de retirar agregados, partículas más grandes, etc. que de otro modo podrían obstruir el nanofiltro. Un prefiltro de este tipo tiene normalmente un tamaño de poro comprendido en el intervalo de 0.05-0.5 µm. En una realización el prefiltro es un filtro NFR Millipore.

Como alternativa a la utilización de aire a presión, una bomba para líquidos colocada después del depósito a presión puede proporcionar la presión necesaria para la filtración.

- 20 Si la composición líquida del factor VII nanofiltrada comprende polipéptidos del factor VII inactivo, la composición se puede someter posteriormente a un paso de activación, p. ej., tal como se describe en Bjørn. S. y Thim, *L. Res. Disclosures* (1986) 269, 564-565, Pedersen, A.H. *et al.*, *Biochemistry* (1989), 28, 9331-9336, y Tomokiyo, K. *et al.*, *Vox Sang.* 84, 54-64 (2003).

- 25 El procesamiento adicional de la composición y la formulación final como un producto farmacéutico se puede llevar a cabo tal como se describe en Jurlander, B. *et al.*, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27, 4, 373-383 (2001).

#### **Nanofiltración de composiciones líquidas de polipéptido del factor VII exentas de suero**

- 30 Un aspecto separado de la invención, que puede incluir algunas, o todas, de las características anteriores, se refiere a un método para retirar virus de una composición líquida del factor VII, donde dicha composición comprende uno o más polipéptidos del factor VII, donde la concentración de los polipéptidos del factor VII está comprendida en el intervalo de 0.01 a 5 mg/mL, y donde la forma activada de los polipéptidos del factor VII representa un 50-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII en la composición, donde dicha composición líquida está sustancialmente exenta de suero, donde dicho método comprende someter dicha solución a nanofiltración utilizando un nanofiltro con un tamaño de poro de 80 nm como máximo.

- 35 Una variante atractiva de la presente es aquella en la que el polipéptido o los polipéptidos del factor VII está/están producido/producidos por cultivos celulares en células CHO, p. ej., en células CHO en un medio exento de cualesquiera componentes de origen animal.

Las condiciones mencionadas anteriormente para el primer aspecto de la invención también son aplicables para este segundo aspecto de la invención, *mutatis mutandis*.

#### **Nanofiltración de composiciones líquidas del polipéptido del factor VII mediante filtros particulares**

- 40 El nanofiltro puede tener una membrana producida a partir de uno o más materiales seleccionados entre celulosa regenerada de cupramonio, fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilo, PVDF compuesto, PVDF modificado superficialmente y poliéter sulfona.

El material se puede seleccionar entre materiales a base de fluoruro de polivinilideno y materiales a base de poliéter sulfona.

- 45 Las condiciones mencionadas anteriormente para el primer aspecto de la invención también son aplicables para este tercer aspecto de la invención, *mutatis mutandis*.

#### **Inactivación del virus por adición de un detergente**

Un método para inactivar virus en una composición líquida del factor VII puede comprender el paso de combinar dicha composición con un detergente.

- 50 El detergente se puede seleccionar entre detergentes no iónicos tales como aquellos seleccionados entre octilfenoxipolietoxietanol, polisorbatos, poloxámeros, éteres alquil polioxietilénicos, copolímeros en bloque de



polietileno/polipropileno, polietilenglicol (PEG), estearatos de polioxietileno y aceites de ricino polioxietilenados. Algunos ejemplos ilustrativos de estos son los detergentes no iónicos y son Triton X-100, Tween<sup>®</sup>, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, Brij-35 (éter dodecil polioxietilénico), poloxámero 188, poloxámero 407, PEG8000, polioles Pluronic<sup>®</sup>, éter polioxi-23-laurílico, Myrj 49 y Cremophor A.

- 5 Un detergente particularmente útil es un octilfenoxipolietoxietanol de fórmula  $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_2)_2-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$  donde n está comprendida en el intervalo de 5-15, en particular uno donde n es 9-10, tal como el detergente Triton X-100.

10 El detergente se puede combinar con la composición líquida del factor VII para obtener una concentración del detergente en la composición comprendida en el intervalo de un 0.01-0.5% en peso, tal como en el intervalo de un 0.05-0.4% en peso, tal como en el intervalo de un 0.05-0.3% en peso, tal como en el intervalo de un 0.05-0.2% en peso, tal como en el intervalo de un 0.05-0.1% en peso.

El detergente se puede combinar con la composición a una temperatura comprendida en el intervalo de 2-12 °C, tal como comprendida en el intervalo de 2-9 °C.

15 Para la mayoría de los propósitos, se considera indeseable incluir un detergente de tipo trialquilfosfato, por lo tanto, el detergente puede estar sustancialmente exento de disolventes de tipo trialquilfosfato tales como tri(*n*-butil)fosfato.

El método puede comprender los pasos de combinar la composición del polipéptido del factor VII con Triton X-100 a una concentración de 0.05-0.2% en peso a una temperatura comprendida en el intervalo de 2-9 °C, con la condición de que el detergente este sustancialmente exento de disolventes de tipo trialquilfosfato tales como tri(*n*-butil)fosfato.

20 Las condiciones mencionadas anteriormente para el primer aspecto de la invención también son aplicables para este método, *mutatis mutandis*.

#### **Combinación de pasos de inactivación de virus**

25 En un paso adicional más, la presente invención se refiere a un método para la eliminación de alto nivel de la presencia de virus activos en una composición líquida del factor VII, donde el método comprende los pasos de (i) inactivar virus mediante el método definido en "inactivación de virus por adición de un detergente" y (ii) retirar virus mediante cualquiera de los métodos definidos en la presente en "nanofiltración" en cualquier orden.

En una realización, el paso de inactivar virus precede al paso de retirar virus.

30 Incluso aún cuando se crea que los pasos individuales son suficientes a efectos de eliminar la presencia de virus activos, los dos métodos se pueden considerar al menos parcialmente "ortogonales" en el sentido de que ciertos virus pueden resultar más difíciles de eliminar mediante uno de los métodos, mientras que esos mismos ciertos virus se pueden eliminar más fácilmente mediante el otro método y viceversa. Por lo tanto, la combinación de los dos métodos proporcionará un nivel aún más elevado de seguridad para el paciente al cual se destina el polipéptido del factor VII y no menos para el médico que prescribe el medicamento del polipéptido del factor VII y para las autoridades reguladoras que aprueban el medicamento. Por lo tanto, la combinación de los dos métodos puede tener un valor comercial elevado.

35 Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a la retirada o inactivación de partículas víricas. La reducción de la cantidad de partículas víricas en un paso del proceso particular se describe normalmente en unidades log (logaritmo log 10 o  $\log_{10}$ ) donde el factor de reducción se calcula como la cantidad de partículas víricas tras el paso respecto a la cantidad de partículas víricas antes del paso del proceso.

40 P. ej., si se detectan  $10^6$  partículas víricas antes de un paso y se detectan  $10^2$  tras el paso, la reducción es  $10^4$  o  $4 \log_{10}$ .

La reducción total de partículas víricas a partir del proceso completo se describe del mismo modo y se puede calcular por adición del aclaramiento del virus a partir de cada paso del proceso, donde la palabra "aclaramiento" significa tanto la retirada del virus como la inactivación del virus.

45 Para que un paso de aclaramiento vírico específico sea eficaz, se prefiere tener una reducción del virus de al menos  $4 \log_{10}$ .

En una realización de la presente invención, un paso de filtración reduce la cantidad de partículas víricas con al menos aproximadamente  $4 \log_{10}$ . En una realización de la presente invención, un paso de filtración reduce la cantidad de partículas víricas con al menos aproximadamente  $5 \log_{10}$ .

50 En una realización de la presente invención, un paso de combinar dicha composición de FVII con un detergente inactiva al menos aproximadamente  $4 \log_{10}$  de virus. En una realización de la presente invención, un paso de combinar dicha composición de FVII con un detergente inactiva al menos aproximadamente  $5 \log_{10}$  de virus.

La determinación de la cantidad de partículas víricas es conocida por el experto en la técnica y se puede medir mediante ensayos de TCID<sub>50</sub> habituales (siglas en inglés de criterio de valoración de dosis que infecta un 50% en cultivo tisular por mL), ensayos de placa o ensayos de PCR. Los ensayos de TCID<sub>50</sub> y de placa se pueden utilizar para medir la concentración de partículas infecciosas, mientras que los ensayos de PCR se pueden utilizar para medir tanto las partículas víricas inactivadas no infecciosas como las infecciosas.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Producción del factor VII exenta de suero**

Se realizó el siguiente experimento para producir el factor VII en un cultivo a escala piloto grande.

Una línea celular CHO K1 transformada con un plásmido que codifica el factor VII se adaptó para el crecimiento en un cultivo en suspensión en un medio exento de componentes derivados de animales. Se congeló un lote de las células adaptadas. Se propagaron células del lote en botellas de centrifugación en cultivos en suspensión en medio exento de componentes derivados de animales. Según se incrementó el número de células, se incrementó gradualmente el volumen añadiendo medio nuevo. Cuando el volumen hubo alcanzado 4 L, y el número de células hubo alcanzado  $\approx 0.8 \times 10^6$ /mL, se transfirieron los contenidos de las botellas de centrifugación a un reactor de cubeta agitada de 50 L (reactor de siembra). Según se incrementó el número de células en el reactor de 50 L, se incrementó gradualmente el volumen añadiendo medio nuevo. Cuando el volumen hubo alcanzado 50 L, y el número de células hubo alcanzado  $= 1 \times 10^6$ /mL, se transfirieron los contenidos del reactor de 50 L a un reactor de cubeta agitada de 500 L (reactor de producción). El reactor de 500 L contenía portadores macroporosos Cytopore 1 (Amersham Biosciences) en los cuales las células quedaron inmovilizadas en las 24 horas posteriores a la inoculación. Se incrementó gradualmente el volumen en el reactor de 500 L añadiendo medio nuevo según se incrementaba el número de células. Cuando el volumen hubo alcanzado 450 L, y el número de células hubo alcanzado  $= 2 \times 10^6$ /mL, se inició la fase de producción y se realizó un cambio de medio cada 24 horas. Se detuvo la agitación para permitir la sedimentación de los portadores que contenían células y a continuación se recolectó un 80% del sobrenadante del cultivo y se reemplazó con medio nuevo. El sobrenadante del cultivo recolectado se filtró para retirar las células que no estaban atrapadas y los desechos celulares y a continuación se transfirió para un procesamiento adicional. El biorreactor de 50 L, así como el de 500 L, estaban dotados de instrumentos medidores para el control de la temperatura, oxígeno disuelto (burbujeando oxígeno mediante un microburbujeador), velocidad de agitación, tasa de aireación del espacio que está por encima del cultivo y pH (control descendente por adición de CO<sub>2</sub> gaseoso en el espacio que está por encima del cultivo). Además, el biorreactor de 500 L estuvo dotado de instrumentos medidores para el control del CO<sub>2</sub> disuelto. La medida en línea de CO<sub>2</sub> se realizó por medio de un instrumento YSI 8500 CO<sub>2</sub>. El nivel de CO<sub>2</sub> se controló burbujeador en el líquido a través de un tubo de acuerdo con la señal de CO<sub>2</sub>. La tasa de burbujeo se fijó en 0 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO<sub>2</sub> estuvo en el punto predeterminado o por debajo y en 0.01-0.05 L/min por L de líquido de cultivo cuando la concentración de CO<sub>2</sub> estuvo por encima del punto predeterminado. El punto predeterminado para el CO<sub>2</sub> disuelto fue de 160 mmHg. Tal como se ha mencionado, no se añadió base al biorreactor para controlar el pH ascendientemente. Durante la fase de producción la densidad celular alcanzó  $1-2 \times 10^7$  células/mL y la concentración del factor VII en la recolección diaria fue de 10-20 mg/L. Se mantuvo la pCO<sub>2</sub> dentro del intervalo de 150-170 mmHg. Se mantuvo el pH por encima de 6.70, aunque no se añadió base.

### **Ejemplo 2: Filtración del eluido del paso de captura**

Solución de proteína que se va a filtrar: 25 L de la solución de FVII del paso de captura, con las siguientes características:

Concentración de FVII/FVIIa: 630 mg/L

1.7% de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): no analizado

Degradación: <2.2 %

La filtración se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en la presente con referencia a la Figura 1:

Filtro: Millipore NFR, 0.08 m<sup>2</sup>

Presión: 2 bar

Propiedades del filtrado:

Concentración de FVII/FVIIa: 610 mg/L, es decir : rendimiento de FVII : 96.8 %

1.5 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): no analizado

Degradación: <2.2 %

**Ejemplo 3: Filtración del eluido del paso de captura**

5 Solución de proteína que se va a filtrar: 185 mL de la solución del FVII del paso de captura, con las siguientes características:

Concentración de FVII/FVIIa: 82 mg/L

3.4 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): 19 %.

Degradación: <3 %

10 La filtración se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en la presente con referencia a la Figura 1:

Filtro: Pall DV50, 0.0017 m<sup>2</sup>

Presión: 2 bar

Propiedades del filtrado:

Concentración de FVII/FVIIa: 77,1 mg/L, es decir : rendimiento de FVII : 94 %

15 4.1 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): 20 %.

Degradación: <3 %

**Ejemplo 4: Filtración del eluido del paso de captura**

20 Solución de proteína que se va a filtrar: 180 mL del eluido del paso 1 con las siguientes características:

Concentración de FVII/FVIIa: 320 mg/L

3.7 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): 3.3%

Degradación: <0.5 %

25 La filtración se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en la presente con referencia a la Figura 1:

Filtro: Asahi Planova 20 N, 0.001 m<sup>2</sup>

Presión: 0.8 bar

Propiedades del filtrado:

Concentración de FVII/FVIIa: 310 mg/L, es decir : rendimiento de FVII : 100%, 3.7 % de formas oxidadas de FVII

30 Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): no analizado

Degradación: <0.5 %

**Ejemplo 5: Filtración del fármaco de FVII.**

Solución de proteína que se va a filtrar: 98 mL del fármaco de FVIIa, con las siguientes características:

35 Concentración de FVII/FVIIa: 1460 mg/L

2.1 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): >90 %.

Degradación: 11.9 %

La filtración se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en la presente con referencia a la Figura 1:

Filtro: Millipore NFP, 0.0017 m<sup>2</sup>

Presión: 2 bar

5 Propiedades del filtrado:

Concentración de FVII/FVIIa: 1320 mg/L, es decir : rendimiento de FVII : 90.4 %, 2.3 % de formas oxidadas de FVII

Grado de activación (es decir, porcentaje de FVIIa): no analizado, ya que el grado de activación en la solución que se va a filtrar es de un 98%

Degradación: 12.3 %

10 **Ejemplo 6: Retirada del virus**

50 mL de una solución del polipéptido del factor VII (remítase al Ejemplo 1) del paso de captura que comprende un virus de leucemia murina, título YY unidades formadoras de placas (pfu).

La filtración se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito en la presente con referencia a la Figura 1:

Filtro: Millipore NFR, YY cm<sup>2</sup>

15 Presión: YY bar

Título del virus en el filtrado: xx pfu

Factor de aclaramiento calculado: xx.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un método para retirar virus de una composición líquida del factor VII recombinante, donde dicha composición comprende uno o más polipéptidos del factor VII, donde la concentración de los polipéptidos del factor VII está comprendida en el intervalo de 0.01 a 5 mg/mL y donde la forma activada de los polipéptidos del factor VII representa un 50-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor FVII en la composición;
- donde dicho método comprende someter dicha solución a nanofiltración utilizando un nanofiltro que tiene un tamaño de poro de 80 nm como máximo.
- 2.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la forma activada del polipéptido del factor VII representa un 70-100% o un 80-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII.
- 10 **3.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición líquida tiene un pH comprendido en el intervalo de 5.5-10, tal como en el intervalo de 7.0-9.5, en el intervalo de 7.6-9.4, en el intervalo de 7.7-9.3, en el intervalo de 8.0-9.0 o en el intervalo de 8.3-8.7.
- 4.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII en la composición líquida está comprendida en el intervalo de 0.05-2.0 mg/mL.
- 15 **5.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tamaño de poro del nanofiltro es de 50 nm como máximo, p. ej., de 30 nm como máximo, tal como comprendido en el intervalo de 10-3 nm.
- 6.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la membrana del nanofiltro está producida a partir de uno o más materiales seleccionados entre celulosa regenerada de cupramonio, fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrófilo, PVDF compuesto, PVDF modificado superficialmente y poliéter sulfona.
- 20 **7.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición líquida del factor VII se obtiene a partir de un sobrenadante de un cultivo celular.
- 8.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición líquida está sustancialmente exenta de suero.
- 25 **9.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el polipéptido o los polipéptidos del factor VII está/están producido/producidos por cultivos celulares en presencia de suero bovino fetal o bovino.
- 10.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido o los polipéptidos del factor VII está/están producido/producidos por cultivos celulares en células CHO.
- 30 **11.** Un método para la eliminación de alto nivel de la presencia de virus activos en una composición líquida del factor VII recombinante que comprende uno o más polipéptidos del factor VII, donde la concentración de los polipéptidos del factor VII está comprendida en el intervalo de 0.01 a 5 mg/mL y donde la forma activada de los polipéptidos del factor VII representa un 50-100% de la masa del polipéptido o de los polipéptidos del factor VII en la composición, donde el método comprende los pasos de (i) inactivar virus mediante un método que comprende el paso de combinar dicha composición con un detergente y (ii) separar virus mediante cualquiera de los métodos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en cualquier orden.
- 35 **12.** El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde el paso de inactivar virus precede al paso de retirar virus.

FIGURA 1

