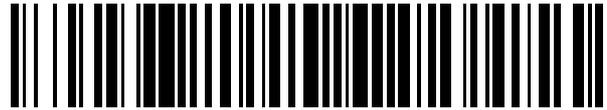


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 915**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/64** (2006.01)

**C07K 14/745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06806746 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1924689**

54 Título: **Purificación de los polipéptidos del Factor VII mediante cromatografía de interacción hidrofóbica**

30 Prioridad:

**01.09.2005 EP 05107990**

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

**30.10.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KRARUP, JANUS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 515 915 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Purificación de los polipéptidos del Factor VII mediante cromatografía de interacción hidrofóbica

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para el proceso de purificación de polipéptidos del Factor VII mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

10 Antecedentes de la invención

[0002] Las proteínas implicadas en la cascada de coagulación, incluyendo, por ejemplo, el Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, y la proteína C, demuestran ser útiles agentes terapéuticos para tratar varias enfermedades patológicas. Por consiguiente, hay una creciente necesidad de formulaciones que contienen estas proteínas, que son farmacéuticamente aceptables y muestran una eficacia clínica uniforme y predeterminada. El proceso total a escala industrial de purificación de sustancias medicamentosas de un polipéptido del Factor VII puede sufrir en ciertos casos el inconveniente de que la sustancia medicamentosa contenga una cantidad considerable de impurezas relacionadas con el producto (relacionadas con el Factor VII), como por ejemplo impurezas contenidas en los picos de elución tardía (incluyendo glico-variantes con diferentes niveles de glicosilación N-enlazada ("formas des-N-glicanadas"), formas oxidadas, formas proteolíticamente degradadas (formas de cadena pesada divididas), o agregados con un peso molecular superior al del polipéptido de interés del Factor VII. Esto es, por supuesto, indeseable y en algunos casos también inaceptable.

[0003] El artículo "Secuencia de aminoácidos y modificaciones postransaccionales del Factor VIIa humano de plasma y transfección de células renales de hámsters recién nacido", Biochemistry, 4 de octubre de 1988, 27(20):7785-93, expone que algunos productos de degradación de cadena pesada co-purifican con el Factor VII intacto activado.

[0004] El artículo "Derivados de FVIIa obtenidos por degradación autolítica y controlada mediada por catepsina G" FEBS Lett. 15 de febrero de 1993, 317(3):245-9, afirma que las formas de cadena pesada del Factor VII divididas no se pueden aislar del Factor VII bajo condiciones no desnaturalizantes.

[0005] US 6,777,390 (Baxter) trata sobre la purificación del Factor VII de criosobrenadante por ALEX y sobre la posterior cromatografía hidrofóbica de la sefarosa de fenilo. Los preparados farmacéuticos del Factor VII descritos contienen menos del 5% de Factor VII activado (Factor VIIa).

[0006] Soenderkaer et al. describe los efectos de la sacarosa en la agregación de rFVIIa y la oxidación de metionina; se describen ensayos para analizar la presencia de agregados y formas oxidadas.

[0007] Bolt et al. expone que la N-glicosilación postraducciona l tiene lugar durante el procesamiento normal del factor de coagulación VII humano.

[0008] Bjoern et al. se refiere a la caracterización de la O-glicosilación de plasma y FVIIa recombinante en los residuos 52 y 60 de serina y los efectos de la mutagénesis de sitio dirigido de serina-52 a alanina.

[0009] Según saben los inventores, el problema de la eliminación de impurezas relacionadas con el producto en una sustancia medicamentosa de un polipéptido del FVII en procesos a escala industrial no ha sido tratado en el estado de la técnica.

50 Breve descripción de la invención

[0010] La presente invención proporciona un proceso para reducir la presencia de formas del Factor VII carentes de uno o varios glicano(s) N-enlazados en una sustancia medicamentosa de un polipéptido del FVII activado creado por recombinación; dicho proceso incluye las etapas de:

55 (a) contactar la sustancia medicamentosa con un material de cromatografía de interacción hidrofóbica bajo condiciones que facilitan la unión de una parte de dicha sustancia medicamentosa a dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica, constando dicha sustancia medicamentosa de una sal seleccionada de la lista de: acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, cloruro sódico, acetato sódico, sulfato sódico, acetato potásico, cloruro potásico, y sulfato potásico, y/o un ión híbrido seleccionado de la lista de: glicina, alanina, beta-alanina, leucina, e isoleucina, en una concentración dentro del rango 0.0-0.1 M o dentro del rango 0.5 M a 85% de la concentración de saturación para la respectiva sal a la temperatura en la que se lleva a cabo el paso (a);

## ES 2 515 915 T3

(b) lavar opcionalmente dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de lavado; y

(c) eluir dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de elución, y recolectar una sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII activado como un eluato;

5

donde la presencia de las formas del polipéptido del Factor VII carentes de uno o varios glicano(s) N-enlazados en la sustancia medicamentosa purificada recogida en el paso (c), como viene determinado por los métodos definidos aquí, se reduce en al menos el 50% (p/p) en comparación con la presencia contenida en la sustancia medicamentosa aplicada en el paso (a).

10

Breve descripción de las figuras

[0011]

15

La figura 1 es un cromatograma de la separación del factor de coagulación VII humano en la TSKgel Phenyl-5PW, cf. ejemplo 1.

La figura 2 es un cromatograma de la separación análoga en el fenilo 5PW de la TSKgel Phenyl-5PW, cf. ejemplo 3.

20

La figura 3 ilustra la elución de impurezas a lo largo del valor máximo de producto, cf. ejemplo 3.

La figura 4 ilustra un SDS-PAGE de carga de la cromatografía de interacción hidrofóbica que muestra compuestos de alto peso molecular a 185, 140 y 90 kDa.

25

La figura 5 ilustra un SDS-PAGE de una agrupación de cromatografía de interacción hidrofóbica que muestra que los compuestos de alto peso molecular a 185, 140 y 90 kDa han sido casi eliminados.

La figura 6 es un cromatograma de la separación del factor de coagulación VII humano en la TSKgel Phenyl-5PW, cf. ejemplo 6.

30

La figura 7 es un gel SDS-PAGE que ilustra la eliminación parcial de GD-Factor VII. Calle 1: peso molecular (PM) estándar, calle 2: muestra de carga, calle 3: borde delantero, calle 4: valor máximo principal, calle 5: borde de salida, cf. ejemplo 6.

35

La figura 8 ilustra un cromatograma HPLC del FVII y sus impurezas relacionadas con el producto.

Descripción detallada de la invención

40

[0012] Los presentes inventores han descubierto ahora que siguiendo un procedimiento de cromatografía de interacción hidrofóbica particular en el que se usan una sal particular y/o un ión híbrido, es posible reducir, o prácticamente eliminar, la presencia de impurezas tales como los "picos de elución tardía" compuestos por N-glicovariantes sin N-glicanos en las posiciones Asn145 y/o Asn322 (de FVII humano).

45

[0013] La presente invención proporciona un proceso para reducir la presencia de formas de Factor VII carentes de uno o varios glicanos N-enlazados en una sustancia medicamentosa de un polipéptido del Factor VII activado creado por recombinación, usando cromatografía de interacción hidrofóbica, cf. reivindicación 1.

50

[0014] El proceso es, por consiguiente, particularmente relevante para sustancias medicamentosas de polipéptidos del Factor VII que inicialmente tienen un contenido considerable de picos de elución tardía, es decir una agrupación de picos de elución tardía de al menos 2% (p/p) de la cantidad total de polipéptidos del Factor VII. Se debe entender que, en algunos casos, las sustancias medicamentosas a escala industrial de polipéptidos del Factor VII pueden incluir incluso cantidades más altas de picos de elución tardía, por ejemplo al menos 3%, así como al menos 4%, o al menos 5%, algunas veces hasta aproximadamente 10-12% de picos de elución tardía, y que el proceso de la presente invención es incluso más relevante para este tipo de sustancias medicamentosas. Tales sustancias medicamentosas se pueden obtener directamente de procesos de fermentación, pero se obtienen más normalmente como resultado de la purificación de producto bruto inicial.

55

[0015] El proceso es además relevante para sustancias medicamentosas de polipéptidos del Factor VII que inicialmente tienen un contenido considerable de formas oxidadas, formas proteolíticamente degradadas, y/o agregados con un peso molecular mayor que el polipéptido del Factor VII de interés, es decir una agrupación de formas proteolíticamente

60

## ES 2 515 915 T3

degradadas de al menos 2% (p/p) de la cantidad total de polipéptidos del Factor VII y/o formas oxidadas de al menos 1% (p/p) de la cantidad total de polipéptidos del Factor VII.

5 [0016] Cuando se usa conjuntamente con polipéptidos del Factor VII, el porcentaje (%) de impurezas relacionadas con el producto (por ejemplo, picos de elución tardía) se declara como un tanto por ciento en peso del contenido total de proteínas (producto + impurezas relacionadas con el producto). Así, una reducción doble de impurezas relacionadas con el producto (como por ejemplo, los picos de elución tardía), por ejemplo de 2% a 1%, constituye una reducción relativa del 50%; una reducción de, por ejemplo, 8% a 2% designa así una reducción cuádruple, es decir una reducción relativa del 75%; y una reducción de 12% a 6% constituye una reducción doble de la presencia de impurezas relacionadas con el producto (es decir una reducción del 50%) y no una reducción del 6%.

10 [0017] El término "impurezas relacionadas con el producto" incluye, sin limitación, glicovariantes con diferentes niveles de glicosilación N-enlazada (incluyendo polipéptidos del Factor VII carentes de uno o varios glicanos N-enlazados por ejemplo, en las posiciones Asn145 y/o Asn322 de FVII humano), formas oxidadas, formas proteolíticamente degradadas (degradación auto-catalizada de la cadena pesada de la molécula) y agregados con un peso molecular mayor que el polipéptido del Factor VII de interés (incluyendo dímeros, oligómeros, polímeros).

15 [0018] Aunque la constitución de la sustancia química exacta de las impurezas de los picos de elución tardía permanece parcialmente desconocida, con la expresión "picos de elución tardía" se hace referencia a las estructuras relacionadas con el polipéptido del Factor VII con un tiempo de retención relativo mayor que el polipéptido del Factor VII de interés, posiblemente glicofomas indeseables tales como formas donde el polipéptido del Factor VII carece de uno o varios (por ejemplo uno o ambos) glicanos N-enlazados.

20 [0019] La "retención relativa" de los "picos de elución tardía" (relativa al polipéptido del FVII de interés, por ejemplo rFVIIa) se determina usando un ensayo RP-HPLC como se describe más adelante en el apartado Métodos generales.

25 [0020] Por motivos de cuantificación, el tiempo de retención relativo (RR) para estos "picos de elución tardía" es normalmente de 1.040 a 1.300 (siendo 1.000 el pico principal del FVIIa recombinante) como se determina mediante el método analítico RP-HPLC.

30 [0021] La presencia de los picos de elución tardía en una sustancia medicamentosa de un polipéptido del Factor VII se puede determinar como se describe más adelante en el apartado Métodos generales.

35 [0022] La presencia de las formas oxidadas, de las formas proteolíticamente degradadas, y de las formas de alto peso molecular (dímeros, oligómeros, agregados) de un polipéptido del Factor VII en una sustancia medicamentosa de dicho polipéptido se puede determinar como se describe más adelante en el apartado Métodos generales.

40 [0023] Aunque no se limita a ello, el proceso de la presente invención es particularmente viable para sustancias medicamentosas de un polipéptido del Factor VII "a escala industrial" (o "a gran escala"). Mediante el término "escala industrial" se hace referencia normalmente a métodos donde el volumen de los compuestos de polipéptido del Factor VII líquidos es al menos 10 L, o al menos 50 L, o por ejemplo al menos 500 L, o al menos 5000 L, o donde el peso del producto es al menos 1 g (sustancia seca), o al menos 10 g, por ejemplo al menos 50 g, por ejemplo 1-1000 g.

45 [0024] La expresión "sustancia medicamentosa" que aquí se usa, se pretende referir a una masa sólida al igual que una masa líquida, por ejemplo una solución o suspensión que contiene el polipéptido del Factor VII. La expresión "sustancia medicamentosa" hace referencia en particular a un "gran" volumen o masa, es decir en referencia a volúmenes y masas conocidos por procesos a gran escala y a escala industrial.

50 [0025] El término "polipéptido del Factor VII" es definido más adelante.

55 [0026] La expresión "sal" que aquí se usa, pretende referirse a una o varias sales capaces de fabricar el polipéptido del Factor VII tan hidrofóbicamente relativamente que enlazará con el material de cromatografía de interacción hidrofóbica. Los ejemplos preferidos de sales son aquellas seleccionadas de combinaciones de cationes particulares y aniones particulares. El grupo de cationes comprende amonio, sodio y potasio, y el grupo de aniones comprende sulfato, acetato y cloruro. Los ejemplos de sales son acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, cloruro sódico, acetato sódico, sulfato sódico, acetato potásico, cloruro potásico y sulfato potásico. Las sales preferidas son acetato amónico, sulfato amónico, acetato sódico, y cloruro sódico. Otro grupo de sales preferidas contiene acetato amónico, sulfato amónico, y acetato sódico.

60 [0027] En la siguiente tabla se expone la solubilidad (saturación) a 20°C y la concentración molar que corresponde con el 85% de saturación para una serie de sales útiles.

## ES 2 515 915 T3

Sal	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (g/100 g agua)	Solubilidad mol/L	Solubilidad 85%
Acetato amónico	77.1	148.0	19.2	16.3
Cloruro amónico	53.5	39.5	7.4	6.3
Sulfato amónico	132.1	76.4	5.8	4.9
Acetato cálcico	158.2	43.6	2.8	2.3
Cloruro cálcico	110.9	81.3	7.3	6.2
Acetato de litio	66.0	45.0	6.8	5.8
Cloruro de litio	42.4	84.5	19.9	16.9
Cloruro de magnesio	95.2	56.0	5.9	5.0
Cloruro de manganeso (II)	125.8	77.3	6.1	5.2
Acetato potásico	98.1	269.0	27.4	23.3
Cloruro potásico	74.6	35.5	4.8	4.0
Fosfato potásico	212.3	106.0	5.0	4.2
Acetato sódico	82.0	50.4	6.1	5.2
Cloruro sódico	58.4	36.0	6.2	5.2
Citrato sódico	294.1	72.0	2.4	2.1
Sulfato sódico	142.0	28.1	2.0	1.7
Glicina	75.0	22.5	3.0	2.6
Datos anteriores a 20°C				

5 [0028] La expresión "iones híbridos" está destinada a designar un ión que lleva tanto una carga electrónica negativa como positiva, pero que forma una molécula neutra. Algunos ejemplos de iones híbridos útiles son los aminoácidos neutros, por ejemplo glicina, alanina, beta-alanina, leucina, isoleucina, etc., en particular glicina y beta-alanina.

Paso (a) - Contactar la sustancia medicamentosa con un material de cromatografía de interacción hidrofóbica

10 [0029] En una primera fase del proceso, la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII se contacta con un material de cromatografía de interacción hidrofóbica bajo condiciones que facilitan la unión de una parte de dicha sustancia medicamentosa a dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica. La sustancia medicamentosa debería estar compuesta de una sal y/o un ión híbrido en una concentración en el rango entre 0.0-0.1 M o en el rango entre 0.5 M a 85% de la concentración de saturación para la sal respectiva (a la temperatura de la solución de carga). El objetivo es facilitar la unión de una parte de dicha sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII a dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica. En una forma de realización particularmente preferida, la sustancia medicamentosa consta de una sal en una concentración en el rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación, por ejemplo entre 0.7-2.2 M.

20 [0030] Se entiende que la concentración de saturación de una sal en particular (y así la concentración que constituye el 85% de la concentración de saturación) variará dependiendo de la temperatura real usada, por ejemplo la concentración de saturación normalmente será menor de 5°C en comparación con aquella de 20°C. La solubilidad (saturación) a 20°C de sales particulares útiles ha sido descrita anteriormente. La solubilidad a 20°C para otras sales al igual que la solubilidad a otras temperaturas (por ejemplo 5°C) se puede encontrar en manuales generales de química, como por ejemplo el CRC Handbook of Chemistry and Physics (CRC Press). Alternativamente, las curvas de solubilidad en la disolución de un sólido particular (sal) en el agua se puede obtener fácilmente disolviendo un peso conocido de una sal en diferentes volúmenes de agua conocidos, y en cada concentración dejando que la solución se enfríe para determinar la temperatura en la que la sal empieza a cristalizarse fuera de solución. Es decir, para un peso determinado de sal, la cantidad de agua va aumentando progresivamente, y así se determina para cada aumento la temperatura necesaria para

## ES 2 515 915 T3

- 5 alcanzar el punto de saturación. El peso de sal y el peso de agua para cada temperatura de saturación representan la concentración de una solución saturada para esta temperatura, y se expresa en términos de g sal por 100 g agua. Luego se dibuja una curva de solubilidad trazando g sal por 100 g agua en el eje y frente a la temperatura de saturación en el eje x. Como tal, la solubilidad de un sólido se puede expresar como el número de moles de sólido disueltos en un litro de líquido, o como la fracción molar del sólido, o, como en este experimento, como el número de gramos de sólido disuelto en 100 ml de líquido.
- 10 [0031] Debe entenderse que la expresión "el rango de 0.5 M a 85% de concentración de saturación para la sal respectiva" se destina a designar un rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación de una sal particular a la temperatura real en la que se realiza o realizan el paso o pasos del método pertinentes (carga (a), lavado (b), elución (c)).
- 15 [0032] Mediante el término "fracción" en relación con el paso (a) se entiende al menos un 30% (es decir entre 30-100%) de la masa del polipéptido del Factor VII presente en la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII. Se debe entender que en la mayoría de casos es deseable enlazar mucho más que el 30% de la masa de los polipéptidos del Factor VII, por ejemplo al menos el 50%, o al menos el 70%, o una parte predominante. Mediante el término "parte predominante" se entiende al menos el 90% de la masa del polipéptido del Factor VII presente en la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII. Preferiblemente se liga una parte incluso más alta al material de cromatografía de interacción hidrofóbica, por ejemplo al menos el 95% de la masa, o al menos el 98% de la masa, o al menos el 99% de la masa, o incluso esencialmente toda la masa del polipéptido del Factor VII presente en la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII.
- 20 [0033] La sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII origina normalmente de un proceso de producción a escala industrial, por ejemplo un cultivo celular, un proceso microbiano, un animal o insecto clonado (por ejemplo vacas, cerdos, ovejas, cabras, y peces), o similares, en particular de un cultivo celular.
- 25 [0034] El material de cromatografía de interacción hidrofóbica es una matriz sustituida con ligandos hidrofóbicos tales como etilo, butilo, fenilo o hexilo (que parecen ser responsables de la unión de la proteína). Los materiales preferidos son aquellos sustituidos con ligandos de butilo y/o de fenilo. El material es presentado muy a menudo en forma de cuentas, por ejemplo un material en partículas con un diámetro medio que oscila entre 0.1-1000  $\mu\text{m}$ , o en forma de bastones, membranas, gránulos, monolitos, etc.
- 30 [0035] La disposición más común del material de cromatografía de interacción hidrofóbica es en formato de columna. Por supuesto también es posible disponerlo en un contenedor de lote.
- 35 [0036] La sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII normalmente se obtiene directamente de un paso de purificación precedente, o de un paso de purificación precedente con un ajuste posterior de pH, fuerza iónica, quelación de iones metálicos bivalentes, etc., si es deseable o ventajoso.
- 40 [0037] El contacto de la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII se lleva a cabo normalmente según protocolos convencionales, es decir la concentración, temperatura, fuerza iónica, etc. de la sustancia medicamentosa puede ser la habitual, y el material de cromatografía de interacción hidrofóbica se puede lavar y equilibrar antes de su aplicación de forma habitual.
- 45 [0038] La carga de polipéptido del Factor VII es normalmente al menos 250 mg por litro de matriz (material de cromatografía de interacción hidrofóbica), como en el rango entre 0.5-10.0 g, por ejemplo entre 2.0-5.0 g, el polipéptido del Factor VII por litro de matriz (material de cromatografía de interacción hidrofóbica en la forma mojada), y la sustancia de medicamento se cargan normalmente a un flujo de 1-50 volúmenes de columna por hora.
- 50 [0039] El pH de la sustancia medicamentosa antes y durante su aplicación al material de cromatografía de interacción hidrofóbica parece jugar un papel relevante en la formación de picos de elución tardía. Así, es preferible que la sustancia medicamentosa esté en forma líquida y tenga un pH que oscile entre 3.0-10.0, como en el rango entre 3.0-7.0, o entre 6.5-10.0, durante su aplicación al material de cromatografía de interacción hidrofóbica. En algunas formas de realización interesantes, la sustancia medicamentosa tiene un pH dentro del rango 4.0-7.0, o dentro del rango 7.0-9.0, o dentro del rango 4.5-8.5. Un margen de pH preferido sería entre 5.0-6.5.
- 55 [0040] La presencia de iones de calcio puede jugar un papel en relación con la estabilidad del polipéptido del Factor VII. En algunas formas de realización preferidas, la sustancia medicamentosa en el paso (a) tiene una concentración de iones de calcio de al menos 5 mM, como por ejemplo en el rango entre 5-100 mM. En tales casos, un margen de pH preferido sería entre 5.0-9.5.
- 60

## ES 2 515 915 T3

[0041] Normalmente, la conductividad es al menos 40 mS/cm, o al menos 50 mS/cm, o al menos 100 mS/cm o al menos 200 mS/cm.

5 [0042] La temperatura de la sustancia medicamentosa oscila normalmente entre los 0-25°C, así como alrededor de los 2-10°C o los 2-8°C.

[0043] La temperatura del material de cromatografía de interacción hidrofóbica con el polipéptido ligado del Factor VII está normalmente entre 0-25°C, como alrededor de los 2-10°C o 2-8°C, por ejemplo mantenido dentro de un rango específico usando una cubierta de refrigeración y soluciones de temperatura controlada.

10 Paso (b) - Paso de lavado (opcional)

[0044] Después de unir la sustancia medicamentosa del polipéptido del Factor VII a los materiales de cromatografía de interacción hidrofóbica, se suele llevar a cabo el paso de lavado (b) con el fin de eliminar una fracción considerable de los picos de elución tardía del material de cromatografía de interacción hidrofóbica. En este paso, la fracción del polipéptido del Factor VII restante (ligado) en el material de cromatografía de interacción hidrofóbica tendrá una cantidad muy inferior de picos de elución tardía.

15 [0045] La presencia de una sal y/o iones híbridos en el tampón de lavado también ha resultado ser ventajosa. Por consiguiente, preferiblemente, el tampón de lavado en el paso (b) está compuesto por una sal y/o unos iones híbridos en una concentración que oscila entre 0.0-0.1 M o en el rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación para la sal respectiva. De la forma más preferible, la concentración de la sal y/o iones híbridos en el tampón de lavado se encuentra dentro de  $\pm 0.1$  M de la concentración de la sal en la sustancia medicamentosa en el paso (a). En una forma de realización particularmente preferida, el tampón de lavado está compuesto por una sal en una concentración en el rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación, por ejemplo entre 0.7-2.2 M.

20 [0046] Este paso de lavado (b) se lleva a cabo preferiblemente con un tampón de lavado con un pH que oscila entre 2.0-6.9. En algunas formas de realización interesantes, el tampón de lavado tiene un pH que oscila entre 3.0-10.0, como por ejemplo en el rango entre 3.0-7.0, o entre 6.5-10.0, durante la aplicación al material de cromatografía de interacción hidrofóbica. En algunas formas de realización interesantes, el tampón de lavado tiene un pH que oscila entre 4.0-7.0, o entre 7.0-9.0, o entre 4.5-8.5.

25 [0047] Como anteriormente en el paso (a), la presencia de iones de calcio parece jugar cierto papel. Por consiguiente, el tampón de lavado en el paso (b) tiene normalmente una concentración de iones de calcio de al menos 5 mM, tal como en el rango de 5-100 mM.

30 [0048] El paso de lavado (b) se lleva a cabo normalmente en un flujo de 1-50 volúmenes de columna por hora.

35 [0049] El tampón de lavado es normalmente una solución acuosa compuesta por un agente tamponador, normalmente un agente tamponador compuesto al menos por uno de los componentes de los grupos consistentes en ácidos y sales de MES, PIPES, ACES BES, TES, HEPES, TRIS, histidina, imidazol, glicina, glicilglicina, glicinamida, ácido fosfórico, ácido acético (por ejemplo acetato sódico), ácido láctico, ácido glutárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido maleico, y ácido succínico. Se debe entender que el agente tamponador puede estar compuesto por una mezcla de dos o más componentes, donde la mezcla es capaz de proporcionar un valor de pH en el rango especificado. Como ejemplos se pueden mencionar ácido acético y acetato sódico, etc.

40 [0050] Se debe entender que el paso de lavado (b) se puede llevar a cabo usando uno, dos o varios tampones de lavado, o usando un tampón de lavado de gradiente.

45 [0051] Se debería también mencionar que el paso de lavado y el paso de elución no tienen por qué ser pasos distintos, sino que se pueden combinar, en particular si se utiliza un tampón de elución de gradiente en el paso de elución.

Paso (c) - Paso de elución

50 [0052] Tras la(s) fase(s) de lavado (c), el material de cromatografía de interacción hidrofóbica se eluye con un tampón de elución, y se recoge una sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII como eluato.

55 [0053] Es posible una gran cantidad de variabilidad para el paso de elución (c). En cuanto a los pasos mencionados, el tampón de elución contiene preferiblemente también una sal y/o un ión híbrido.

60

## ES 2 515 915 T3

- 5 [0054] El tipo de elución no es especialmente decisivo, por consiguiente, es posible eluir, por ejemplo, con un tampón de elución que contiene un gradiente decreciente gradualmente de la sal y/o ión híbrido, eluir con un gradiente decreciente lineal de la sal (o un perfil gradiente-mantenimiento-gradiente, u otras variantes), o a usar un gradiente de pH, o un gradiente de temperatura, o una combinación los mencionados anteriormente. Alternativamente, se puede utilizar un gradiente de un compuesto quelante de calcio (por ejemplo EDTA, citrato, malonato, etc.) o un solvente menos polar que el agua (por ejemplo soluciones acuosas que contienen etanol, PEG, 2-propanol, o similar), como tampón de elución.
- 10 [0055] En una forma de realización, el tampón de elución contiene una sal en una concentración inicial en el rango entre 0.7-2.2 M.
- 15 [0056] En una forma de realización, el tampón de elución no contiene un compuesto quelante de calcio. En otra forma de realización, el tampón de elución no contiene EDTA y/o citrato. En una forma de realización, el tampón de elución contiene una sal cálcica; en otra forma de realización no contiene una sal cálcica. En una forma de realización, el método según la invención se realiza en presencia de una sal cálcica; en otra forma de realización, el método según la invención se realiza en ausencia de una sal cálcica.
- 20 [0057] Por lo tanto, en una forma de realización actualmente más preferida, el tampón de elución en el paso (c) es un tampón de gradiente con respecto a la una sal amónica, donde la concentración inicial de la sal amónica del tampón de gradiente está en el rango entre 1.7-2.2 M, y la concentración final de la sal amónica del tampón de gradiente está en el rango entre 0.0-1.6 M.
- 25 [0058] La conductividad del tampón de elución final es preferiblemente inferior a la conductividad de la composición que contiene la sustancia de medicamento en el paso (a).
- [0059] En más casos, el tampón de elución en el paso (c) normalmente tiene el mismo pH que en el paso (a) y (b).
- [0060] También se prefieren las formas de realización donde el tampón de elución en el paso (c) tiene una concentración de iones de calcio de al menos 5 mM, tal como en el rango entre 5-100 mM.
- 30 [0061] El paso de elución (c) es normalmente llevo a cabo en un flujo de entre 1-50 volúmenes de columna por hora.
- 35 [0062] El término "sustancia medicamentosa purificada" significa que la sustancia medicamentosa resultante, es decir la sustancia medicamentosa recogida en el paso (c), tiene un contenido inferior de impurezas relacionadas con el producto, tales como picos de elución tardía, que la sustancia medicamentosa aplicada en el paso (a). El término "purificación" se refiere al proceso donde se puede obtener una sustancia medicamentosa purificada, es decir el proceso de la presente invención.
- 40 [0063] Normalmente, el proceso de la presente invención es capaz de reducir la presencia de impurezas relacionadas con el producto, incluyendo los picos de elución tardía, en al menos un 50% en comparación con (o con respecto a) el contenido inicial de dichas impurezas en la sustancia medicamentosa, no obstante de forma más preferible, y también de manera realista, la reducción relativa es al menos del 60%, o al menos del 70% o incluso al menos del 80% o al menos del 85%.
- 45 [0064] En una forma de realización, las impurezas relacionadas con el producto son picos de elución tardía. En otra forma de realización, las impurezas relacionadas con el producto son polipéptidos del Factor VII carentes de uno o varios glicano(s) N-enlazados. En otras formas de realización, las impurezas relacionadas con el producto son formas oxidadas, formas proteolíticamente degradadas (degradación auto-catalizada de la cadena pesada de la molécula) o agregados con un peso molecular mayor que el polipéptido del Factor VII de interés (incluyendo dímeros, oligómeros, polímeros). En otra forma de realización las impurezas relacionadas con el producto contienen una mezcla de una o más de las formas mencionadas arriba, picos y formas carentes de glicano.
- 50 [0065] Además, se ha descubierto que el proceso de la invención hace posible muy eficazmente eliminar impurezas relacionadas con el producto, tales como picos de elución tardía de las sustancias medicamentosas de polipéptidos del Factor VII, y también hace posible suprimir la formación de tales picos de elución tardía.
- 55 [0066] Por consiguiente, en las formas de realización preferidas, la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII recogida en el paso (c) contiene menos del 50% de picos de elución tardía en comparación con la sustancia medicamentosa en el paso (a), por ejemplo menos del 40%, o menos del 30%.
- 60 [0067] En una forma de realización, la presencia de las formas oxidadas en la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII recogido en el paso (c) se reduce en al menos un 35%, así como por ejemplo al menos en un

## ES 2 515 915 T3

- 40% o 45%, en comparación con la presencia de la sustancia medicamentosa en el paso (a). En otra forma de realización, la presencia de formas proteolíticamente degradadas en la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII recogido en el paso (c) se reduce en al menos un 30%, como por ejemplo al menos en un 32% o 38%, en comparación con la presencia en la sustancia medicamentosa en el paso (a). En otra forma de realización, la presencia de polipéptidos del Factor VII carentes de uno o varios glicanos N-enlazados (formas des-N-glicanadas) en la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII recogido en el paso (c) se reduce en al menos un 40%, como por ejemplo al menos en un 50%, 60%, 70% o 75%, en comparación con la presencia en la sustancia medicamentosa en el paso (a).
- 5 [0068] Más particularmente, la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII contiene a lo sumo un 5%, como a lo sumo un 2.0%, o a lo sumo un 1.5%, preferiblemente, a lo sumo un 1.0% o a lo sumo un 5%, de picos de elución tardía.
- 10 [0069] Normalmente, el material de cromatografía de interacción hidrofóbica se regenera con motivo de su uso posterior mediante una serie de pasos.
- 15 [0070] Debe observarse que el paso de lavado y el paso de elución no tienen por qué ser pasos diferentes, sino que pueden combinarse, en particular si se utiliza un tampón de elución de gradiente en el paso de elución.
- 20 Formas de realización preferidas
- [0071] El presente proceso es particularmente útil para obtener una sustancia medicamentosa purificada de un polipéptido del Factor VII, y si las condiciones para los pasos (a)-(c) respecto al pH son seleccionadas debidamente, es incluso posible reducir la formación de picos de elución tardía y así aumentar el rendimiento total del proceso.
- 25 [0072] Por consiguiente, una forma de realización preferida proporciona un proceso para la purificación de una sustancia medicamentosa de un polipéptido del Factor VII, dicha sustancia medicamentosa contiene al menos un 3% de picos de elución tardía; dicho proceso consta de las etapas de:
- 30 (a) contacto de la sustancia medicamentosa con un material de cromatografía de interacción hidrofóbica bajo condiciones que facilitan la unión de una parte de dicha sustancia medicamentosa con dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica, dicha sustancia medicamentosa contiene una sal amónica en una concentración en el rango entre 1.5-2.5 M;
- 35 (b) lavado de dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de lavado que contiene la sal amónica en una concentración en el rango entre 1.5-2.5 M, normalmente esencialmente la misma concentración que en el paso (a); y
- (c) elución de dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de elución que contiene una sal amónica, siendo dicho tampón de elución un tampón de gradiente con respecto a la sal amónica, y recolectando una sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII como un eluato,
- 40 donde los pasos (b) y (c) se pueden combinar.
- [0073] Preferiblemente, el tampón de elución en el paso (c) es un tampón de gradiente con respecto a la sal amónica, donde la concentración inicial de la sal amónica del tampón de gradiente está en el rango entre 1.8-2.2 M, y la concentración final de la sal amónica del tampón de gradiente está en el rango entre 0.0-0.2 M. La sal amónica es preferiblemente acetato amónico o sulfato amónico (cuando el calcio está ausente).
- 45 Polipéptido del Factor VII
- [0074] Tal y como se utiliza en este caso, el término "polipéptido del Factor VII" abarca el Factor VII de tipo salvaje (es decir un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en la U.S. Patent No. 4,784,950), y variantes del mismo al igual que polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII. Esto incluye variantes del FVII, polipéptidos relacionados con el Factor VII, derivados del Factor VII y conjugados del Factor VII que muestran esencialmente la misma o mejor actividad biológica con respecto al Factor VIIa humano de tipo salvaje.
- 55 [0075] El término "Factor VII" se emplea para abarcar polipéptidos del Factor VII en su forma no dividida (zimógeno), al igual que aquellos que han sido proteolíticamente procesados para producir sus formas bioactivas respectivas, que pueden ser llamadas Factor VIIa. Normalmente, el Factor VII es dividido entre los residuos 152 y 153 para producir Factor VIIa. Tales variantes del Factor VII pueden mostrar propiedades diferentes con respecto al Factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión fosfolipídica, actividad específica alterada, y similares. "Factor VII" o "Factor VIIa" en la definición anterior también incluyen variaciones alélicas naturales que pueden existir y ocurrir entre un individual y otro.
- 60

## ES 2 515 915 T3

Además, el grado y ubicación de la glicosilación u otras modificaciones postraduccionales pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped.

5 [0076] El término "polipéptido del Factor VII" también abarca polipéptidos, incluyendo variantes, donde la actividad biológica del Factor VIIa ha sido sustancialmente modificada o algo reducida de forma relativa a la actividad del Factor VIIa de tipo salvaje. Estos polipéptidos incluyen, sin limitación, Factor VII o Factor VIIa en el cual se han introducido alteraciones de secuencia de aminoácidos específica que modifican o afectan a la bioactividad del polipéptido.

10 [0077] La actividad biológica del Factor VIIa en la coagulación de la sangre deriva de su capacidad para (i) enlazar con un factor tisular (TF) y (ii) catalizar la escisión proteolítica del Factor IX o Factor X para producir Factor IX o X activado (Factor IXa o Xa, respectivamente).

15 [0078] Para los fines de la invención, la actividad biológica de los polipéptidos del Factor VII ("actividad biológica del Factor VII") se puede cuantificar por medición de la capacidad de una preparación para promover la coagulación sanguínea, cf. Ensayo 4 descrito aquí. En este ensayo, la actividad biológica se expresa como la reducción en el tiempo de coagulación con respecto a una muestra de control y se convierte en "unidades del Factor VII" por comparación con un estándar de suero humano agrupado que contiene 1 unidad/ml de actividad del Factor VII. Alternativamente, la actividad biológica del Factor VIIa se puede cuantificar (i) midiendo la capacidad del Factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el Factor VII para producir Factor X activado (Factor Xa) en un sistema que comprende TF introducido 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", ver Ensayo 2 más abajo); (iii) midiendo la unión física del Factor VIIa o de un polipéptido relacionado con el Factor VII con el TF utilizando un instrumento basado en la resonancia de plasmón de superficie (Persson, FEBS Letts. 413:359-363, 1997); (iv) midiendo la hidrólisis de un sustrato sintético por el Factor VIIa y/o un polipéptido relacionado con el Factor VII ("Ensayo hidrolítico in vitro", ver Ensayo 1 más abajo); o (v) midiendo la generación de trombina en un sistema in vitro independiente del TF (ver Ensayo 3 más abajo).

20 [0079] Las variantes del Factor VII con esencialmente la misma o mejor actividad biológica con respecto al Factor VIIa de tipo salvaje abarcan aquellas que muestran al menos aproximadamente un 25%, preferiblemente al menos aproximadamente un 50%, de forma más preferible al menos aproximadamente un 75% y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% de la actividad específica del Factor VIIa que ha sido producido en el mismo tipo de célula, cuando se evalúan en uno o varios ensayos de coagulación (Ensayo 4), ensayos de proteólisis (Ensayo 2), o ensayo de enlace TF como se ha descrito anteriormente. Las variantes del Factor VII con actividad biológica esencialmente reducida con respecto al Factor VIIa de tipo salvaje son aquellas que muestran menos de aproximadamente el 25%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, de forma más preferible menos de aproximadamente el 5% y de la forma más preferible menos de aproximadamente el 1% de la actividad específica del Factor VIIa de tipo salvaje que ha sido producido en el mismo tipo de célula cuando se evalúa en uno o varios ensayos de coagulación (Ensayo 4), ensayos de proteólisis (Ensayo 2), o ensayos de enlace TF como se ha descrito anteriormente. Las variantes del Factor VII con una actividad biológica esencialmente modificada con respecto al Factor VII de tipo salvaje incluyen, sin limitación, variantes del Factor VII que muestran actividad proteolítica del Factor X independiente del TF y aquellas que enlazan TF pero no dividen el Factor X.

30 [0080] Las variantes del Factor VII, bien si muestran esencialmente la misma o mejor bioactividad que el Factor VII de tipo salvaje, o bien, alternativamente, muestran bioactividad esencialmente modificada o reducida con respecto al Factor VII de tipo salvaje, incluyen, sin limitación, polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del Factor VII de tipo salvaje por inserción, eliminación, o sustitución de uno o varios aminoácidos.

35 [0081] Los ejemplos no limitativos de las variantes del Factor VII con esencialmente la misma actividad biológica que el Factor VII de tipo salvaje incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que muestran estabilidad proteolítica aumentada como vienen descritas en U.S. Patent No. 5,580,560; Factor VIIa que ha sido proteolíticamente dividido 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 FVII como vienen descritas en PCT/DK02/00189; y variantes del FVII que muestran estabilidad proteolítica aumentada como vienen descritas en WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes del FVII con un dominio Gla modificado y que muestran una unión de membrana mejorada como viene descrita en WO 99/20767 (University of Minnesota); y variantes del FVII como vienen descritas en WO 01/58935 (Maxygen ApS).

45 [0082] Los ejemplos no limitativos de las variantes del Factor VII con actividad biológica aumentada en comparación con FVIIa de tipo salvaje incluyen variantes del FVII como vienen descritas en WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes del FVIIa con actividad mejorada como viene descrita en JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

60



ES 2 515 915 T3

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,  
 5 K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/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,  
 10 K316H/L305V/V158T/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,  
 15 K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,  
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII,  
 F374i/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII,  
 20 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/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII,  
 25 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, 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,  
 30 F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/K337A/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,  
 35 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/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,  
 40 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,  
 45 F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, 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/M298Q/V158T/S314E-FVII,  
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,  
 50 F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,  
 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 FVII con sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de  
 55 233Tr a 240Asn, FVII con sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos de 304Arg a 329Cis, y  
 FVII con sustituciones, deleciones, o adiciones en la secuencia de aminoácidos Ile153-Arg223.

[0088] Así, las variantes de sustitución en un polipéptido del Factor VII incluyen, sin límite en las sustituciones en  
 60 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 deleciones en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240 o de R304 a C329; o de I153 a R223, o

## ES 2 515 915 T3

5 combinaciones de los mismos, en particular variantes tal 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 delecciones en la secuencia de aminoácidos de T233 a N240, o de R304 a C329, o de I153 a R223, o combinaciones de los mismos.

[0089] En algunas formas de realización, el polipéptido del Factor VII está hecho recombinantemente del Factor VIIa humano (rhVIIa).

10 [0090] En otras formas de realización, el polipéptido del Factor VII es una variante de secuencia del Factor VII.

[0091] En algunas formas de realización, el polipéptido del Factor VII tiene una glicosilación diferente a la del Factor VII humano de tipo salvaje.

15 [0092] En varias formas de realización, por ejemplo aquellas donde el polipéptido del Factor VII es un polipéptido relacionado con el Factor VII o una variante de secuencia del Factor VII, la proporción entre la actividad del polipéptido del Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa de tipo salvaje) es al menos aproximadamente 1.25, preferiblemente al menos aproximadamente 2.0, o 4.0, más preferentemente al menos aproximadamente 8.0, cuando se evalúa en el "Ensayo proteolítico in vitro" (Ensayo 2) como se describe en la presente especificación.

20 [0093] En algunas formas de realización, los polipéptidos del Factor VII son polipéptidos relacionados con el Factor VII, en particular variantes, donde la proporción entre la actividad de dicho polipéptido del Factor VII y la actividad del Factor VIIa humano nativo (FVIIa de tipo salvaje) es como mínimo aproximadamente 1.25 cuando se evalúa en el "Ensayo proteolítico in vitro" (ver Ensayo 1 posteriormente); en otras formas de realización, la proporción es como mínimo aproximadamente 2.0; en otras formas de realización, la proporción es como mínimo aproximadamente 4.0.

25 Uso de la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII

30 [0094] Tras la recogida de las fracciones correspondientes a la sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII, se puede formular en una solución, que se puede dispensar en viales y liofilizados o como depósito. Como un ejemplo ilustrativo de un producto final que corresponde a la composición de polipéptido del FVII hecho recombinantemente disponible comercialmente NovoSeven® (Novo Nordisk A/S, Dinamarca), se puede mencionar un frasco (1.2 mg) que contiene 1.2 mg de Factor VIIa humano recombinante, 5.84 mg NaCl, 2.94 mg CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 2.64 mg GlyGly, 0.14 mg polisorbato 80, y 60.0 mg manitol. Este producto se reconstituye a pH 5.5 por 2.0 ml agua para inyección (WFI) antes de su uso. Cuando está ya reconstituido, la solución de proteína es estable para su uso durante 24 horas.

35 [0095] La producción total de Factor VII recombinante activado (rFVIIa) es descrita por Jurlander, et al. en "Seminars in Thrombosis and Hemostasis", Vol. 27, No. 4, 2001.

### 40 ESTUDIOS EXPERIMENTALES

#### Métodos generales

45 Ensayos apropiados para determinar la actividad biológica de los polipéptidos del Factor VII

[0096] Los polipéptidos del Factor VII útiles conforme a la presente invención se pueden seleccionar mediante ensayos apropiados que se pueden realizar como simples pruebas in vitro preliminares. Así, la presente especificación divulga una prueba simple (titulada "Ensayo hidrolítico in vitro") para la actividad de polipéptidos del Factor VII.

50 Primer ensayo de generación de coágulos

[0097] La actividad de los polipéptidos del Factor VII se puede medir utilizando un ensayo de coagulación monofase esencialmente como se describe en WO 92/15686 o US 5,997,864. Brevemente, la muestra a ser evaluada se diluye en 50 mM Tris (pH 7.5), 0.1% BSA y se incuban 100 µL con 100 µL de plasma deficitario de Factor VII y 200 µL de tromboplastina C que contiene 10 mM Ca<sup>2+</sup>. Se miden los tiempos de coagulación y se comparan con una curva estándar que utiliza un estándar de referencia o una agrupación de plasma de humano normal citrado en la dilución en serie.

60 Ensayo hidrolítico in vitro (Ensayo 1)

## ES 2 515 915 T3

[0098] El Factor VIIa (de tipo salvaje) nativo y el polipéptido del Factor VII (ambos de ahora en adelante referidos como "Factor VIIa" ) se puede analizar por sus actividades específicas. También se pueden evaluar en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-p- nitroanilida (S-2288, Chromogenix, Suecia), cuya concentración final es 1 mM, se añade al Factor VIIa (concentración final 100 nM) en 50 mM HEPES, pH 7.4, que contiene 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml albúmina de suero bovino. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa de SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo vacío que no contiene enzimas, se usa para calcular la proporción entre las actividades de polipéptido del Factor VII y el Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Ratio} = (\text{A405 nm polipéptido del Factor VII}) / (\text{A405 nm Factor VIIa de tipo salvaje})$$

[0099] Basado en eso, se pueden identificar los polipéptidos del Factor VII con una actividad inferior, igual, o superior a la del Factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, los polipéptidos del Factor VII donde la proporción entre la actividad del polipéptido del Factor VII y la actividad del Factor VII nativo (FVII de tipo salvaje) es aproximadamente 1.0 frente a más de 1.0.

[0100] La actividad de los polipéptidos del Factor VII también se puede medir utilizando un sustrato fisiológico tal como el Factor X ("Ensayo proteolítico in vitro"), adecuadamente a una concentración de 100-1000 nM, donde el Factor Xa generado se mide después de añadir un sustrato cromogénico adecuado (por ejemplo. S-2765). Además, el ensayo de actividad se puede llevar a cabo a temperatura fisiológica.

Ensayo proteolítico in vitro (Ensayo 2)

[0101] El Factor VIIa (de tipo salvaje) nativo y el polipéptido del Factor VII (ambos de ahora en adelante referidos como "Factor VIIa" ) se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se realiza en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El Factor VIIa (10 nM) y el Factor X (0.8 μM) en 100 μL 50 mM HEPES, a pH 7.4, que contiene 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, se incuban durante 15 min. La división del Factor X se ve posteriormente detenida por la adición de 50 μL 50 mM HEPES, a pH 7.4, que contiene 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La cantidad de Factor Xa generada se mide por la adición del sustrato cromogénico z-D-Arg-Gly-Arg-P-nitroanilida (S-2765, Chromogenix, Suecia), a una concentración final de 0.5 mM. La absorbancia a 405 nm se mide continuamente en un lector de placa de SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, USA). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, tras la sustracción de la absorbancia en un pocillo vacío que no contiene FVIIa, se usa para calcular la proporción entre las actividades proteolíticas de polipéptido del Factor VII y el Factor VIIa de tipo salvaje:

$$\text{Ratio} = (\text{A405 nm polipéptido del Factor VII}) / (\text{A405 nm Factor VIIa de tipo salvaje})$$

[0102] Basado en esto, se puede identificar un polipéptido del Factor VII con una actividad inferior, igual, o superior a la del Factor VIIa nativo, tal como, por ejemplo, los polipéptidos del Factor VII donde la proporción entre la actividad del polipéptido del Factor VII y la actividad de Factor VII nativo (FVII de tipo salvaje) es aproximadamente 1.0 frente a más de 1.0.

Ensayo de generación de trombina (Ensayo 3)

[0103] La capacidad de unos polipéptidos del Factor VII para generar trombina se pueden medir en un ensayo (Ensayo 3) que contiene todos los factores de coagulación e inhibidores pertinentes a concentraciones fisiológicas (menos el Factor VIII cuando se imitan las condiciones de hemofilia A) y plaquetas activadas (como se describe en p. 543 en Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99,542-547 que está incorporada por la presente como referencia).

Ensayo de coagulación monofase (Ensayo de coagulación) (Ensayo 4)

[0104] Los polipéptidos del Factor VII también se pueden analizar para actividades específicas ("actividad coaguladora") usando un ensayo de coagulación monofase (Ensayo 4). Para este propósito, la muestra a ser analizada se diluye en 50 mM de tampón PIPES (pH 7.2), 1% BSA y se incuban 40 μl con 40 μl de plasma deficitario de Factor VII y 80 μl de factor tisular recombinante humano que contiene 10 mM Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos sintéticos. Se miden los tiempos de coagulación (tiempos de coagulación) y se comparan con una curva estándar que utiliza un estándar de referencia en un ensayo de líneas paralelas.

El ensayo RP-HPLC es apto para determinar el "tiempo de retención relativo" y la presencia de FVII oxidado, FVII degradado de cadena pesada y "picos de elución tardía"

## ES 2 515 915 T3

[0105] Los "picos de elución tardía" son aquellas eluciones con una retención superior con respecto a aquella del polipéptido del Factor VII de interés en un ensayo RP-HPLC, como por ejemplo se describe a continuación:

5 La cromatografía en fase inversa fue llevada a cabo en una columna de sílice unida a butilo producida internamente (4.5x250 mm) con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de los poros de 300 Å; (se pueden obtener resultados comparables con una columna ACE C4, 5 µm, 300 Å, 4.6x250mm).

Temperatura de columna: 70°C. Amortiguador A: 0.1% v/v ácido trifluoroacético. Amortiguador B: 0.09% v/v ácido trifluoroacético, 80% v/v acetonitrilo.

10 La columna fue eluida con un gradiente lineal de X a (X+13)% B en 30 minutos. X fue ajustado de modo que el FVIIa eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 26 minutos.

Velocidad de flujo: 1.0 ml/min. Detección: 214 nm. Carga: 25 µg FVIIa.

[0106] La Figura 8 muestra un cromatograma de HPLC del FVII y sus impurezas relacionadas con el producto.

15 Presencia de agregados

[0107] La presencia de agregados se determina por el HPLC de exclusión por tamaño no desnaturizante (SEHPLC). La cromatografía de exclusión por tamaño no desnaturizante fue realizada en una columna Waters Protein Pak 300 SW, 7.5x300 mm usando 0.2 M sulfato amónico, 5% 2-propanol a pH 7.0 como fase móvil. Velocidad de flujo: 0.5 ml/min. Detección: 215 nm. Carga: 25 µg FVIIa.

Determinación de la presencia de estructuras de polipéptido del Factor VII sin dominio Gla

25 [0108] La presencia de las estructuras de polipéptido del Factor VII sin dominio Gla relativas a las estructuras de polipéptido del Factor VII de longitud total se determina mediante SDS-PAGE. A los 150 µl de muestra se añaden 50 µl de tampón de muestra (no-reductor, NuPage) y se hierven durante 5 min. Se carga una muestra de 10 µl en un 12% BisTris NuPage Gel (Invitrogen). El gel se procesa a 200 voltios, 120 mA durante 55 min. El gel se tinte usando la solución Coomassie Brilliant Blue, se decolora y se seca. Se calcula la presencia del polipéptido del Factor VII desGla en cuanto el área de la banda del polipéptido del Factor VII desGla se divide por las áreas de la banda del polipéptido del Factor VII a aprox. 50 kDa y la banda del polipéptido del Factor VII desGla a aprox. 45 kDa.

30 [0109] Alternativamente, la presencia de las estructuras del polipéptido del Factor VII desGla se puede determinar por HPLC de intercambio de aniones. El método separa polipéptidos del Factor VII sin dominio Gla de polipéptidos del Factor VII intactos. La presencia de los polipéptidos del Factor VII sin dominio Gla se expresa en % del área de valor máximo relacionada con el polipéptido del Factor VII. Como columna analítica se usa un DNAPac PA-100, 250x4 mm (Dionex Corp.). La columna se eluye con un gradiente lineal de 0-0.5 M acetato amónico a pH 9.0 durante más de 30 minutos a un flujo de 1.0 ml/min. Se monitoriza la absorbancia a 280 nm del efluente.

40 Determinación de la presencia de las estructuras de polipéptido del Factor VII carente de uno o varios glicanos N-enlazados

[0110] La presencia de las estructuras de polipéptido del Factor VII carente de uno o ambos glicanos N-enlazados se pueden determinar usando, por ejemplo, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); electroforesis capilar (CE); o espectrometría de masas (MALDI-MS y LC-MS).

45 [0111] Por ejemplo, cuando se usa MALDI-MS, los picos que aparecen con una masa de aproximadamente 50 kDa, 47.5 kDa y 45 kDa designan polipéptidos del Factor VII con ambos glicanos N-enlazados y Factor VII carente de uno o ambos glicanos, respectivamente.

50 [0112] El modelo de oligosacáridos N-enlazados se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin límite: cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC); electroforesis capilar (CE); resonancia magnética nuclear (RMN); espectrometría de masa (MS) usando técnicas de ionización como bombardeo con átomos rápidos, electrospray, o desorción de láser asistida por matriz (MALDI); cromatografía de gases (GC); y tratamiento con exoglicosidasas conjuntamente con intercambio de aniones (AIE)-HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), o MS. Ver, por ejemplo, Weber et al., Anal. Biochem. 225:135 (1995); Klausen et al., J. Chromatog. 718:195 (1995); Morris et al., en Mass Spectrometry of Biological Materials, McEwen et al., eds. Marcel Dekker, (1990), pp 137-167; Conboy et al., Biol. Masa Spectrom. 21:397,1992; Hellerqvist, Meth. Enzymol. 193:554 (1990); Sutton et al., Anal. Biochem. 318:34 (1994); Harvey et al., Organic Mass Spectrometry 29:752 (1994).

60

## ES 2 515 915 T3

[0113] Siguiendo la resolución de glicofomas del Factor VII que utiliza cualquiera de los métodos anteriores, las especies resueltas se asignan a grupos diferentes (i)-(iii). La presencia relativa de cada una (i)-(iii) se calcula como la suma de las glicofomas asignadas a ese grupo de forma relativa a la presencia total de glicofomas en la muestra.

### 5 Ejemplos

[0114] Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos se incluyen para uso ilustrativo sólo y no están destinados de ninguna manera a limitar el ámbito de la invención reivindicada.

10 Ejemplo 1 - Reducción del rhFVII de cadena pesada degradado y oxidado mediante purificación HIC del rhFVIIa a pH 6 usando TSKgel Phenyl-5PW

[0115] A 5 mg de rhFVIIa altamente puro se añadió acetato de  $\text{NH}_4$  a una concentración final de 1.8 M y  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 10 mM y metionina a una concentración final de 10 mM. El pH fue ajustado a pH 6.0. Esta muestra se añadió a una columna (0.5 cm en el diámetro interno x 10.0 cm longitud = 2 ml volumen de columna (CV)) envuelta en TSKgel Phenyl-5PW de Toso Haas, equilibrado con 5 CV 1.8 M acetato de  $\text{NH}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM metionina, pH 6.0 (carga 1.6 g/L). La columna se lavó con 3 CV 1.8 M acetato de  $\text{NH}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM metionina, a pH 6.0. La elución fue realizada utilizando un gradiente lineal 18 CV desde 1.8 M acetato de  $\text{NH}_4$  hasta 50 mM acetato de  $\text{NH}_4$  en un tampón que contiene 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM metionina a pH 6.0. Aunque se recogió la agrupación de los picos a aproximadamente 65% de la absorbancia máxima (a 280 nm) en el borde delantero y a aproximadamente 20% de absorbancia máxima en el borde de salida, cromatograma en la figura 1.

[0116] La purificación se llevó a cabo a una velocidad de flujo entre 6 y 12 CV/h y a una temperatura de 5°C. La columna fue regenerada con 50 mM citrato, a pH 7.0 y 0.5 M NaOH.

[0117] El análisis de la agrupación y la muestra aplicada mediante RP-HPLC analítica mostró una reducción del rhFVII de cadena pesada degradado y oxidado como se muestra en tabla 1.

Tabla 1

30

Muestra	Degradación de la cadena pesada	FVII oxidado
Aplicación	9.9%	2.9%
Agrupación	5.9%	1.5%

[0118] El rhFVII de cadena pesada degradado y oxidado fue principalmente reducido debido a su tiempo de retención relativamente inferior al del rhFVII no modificado y fue así reducido cortando en el borde delantero.

35 Ejemplo 2 - Actuación del cromatógrafo de interacción hidrofóbica

[0119] A una muestra de rhFVII se añade  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  hasta llegar a una concentración final de 1 M. El pH se ajusta a pH 8.6 tamponado con 20 mM Tris. Esta muestra se añade a una columna envuelta con butilo de Toyopearl 650S, equilibrado con 5 CV 1 M  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 20 mM Tris, a pH 8.6. La columna se lava con 5 CV 1 M  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 20 mM Tris, a pH 8.6. La elución se lleva a cabo utilizando un gradiente lineal de 20 CV desde 1.0 M  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  hasta 0 M  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , en un tampón que contiene 20 mM Tris, a pH 8.6. Se selecciona una agrupación que contiene FVII a través de la recogida de picos. El rhFVII de cadena pesada degradado y oxidado es reducido debido a su tiempo de retención inferior en comparación con rhFVII nativo. Los picos de elución tardía 1, 2 y 3 son reducidos debido a su tiempo de retención relativamente mayor en comparación con el rhFVII nativo.

45

Ejemplo 3 - Reducción de los picos de elución tardía mediante purificación HIC del FVIIa análogo a pH 6 usando TSKgel Phenyl-5PW

[0120] Una columna de 4.7 ml fue envasada con resina TSKgel Phenyl-5PW (20  $\mu\text{m}$ ) y equilibrada con 20 CV de un búfer que contiene: 2.0 M acetato amónico, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM histidina, a pH 6.0.

[0121] Se cargó una carga consistente en 15 mililitros de 0.25 mg/ml FVIIa análogo en 2.0 M acetato amónico, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM histidina, a pH 6.0 sobre la columna, que corresponde con una carga específica de 0.8 mg/ml resina. La columna se lavó usando 5 CV del tampón de equilibrado. La elución fue llevada a cabo utilizando un gradiente lineal desde el lavado y el tampón de equilibrado a 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM histidina, pH 6.0 sobre 10 CV seguido de un mantenimiento de 5 CV. Se recogieron fracciones de 5 ml a través del pico de elución. El cromatograma viene ilustrado en la figura 3.

55

## ES 2 515 915 T3

[0122] La columna fue regenerada usando 5 CVs de 50 mM de tri citrato sódico, a pH 7.5 seguido de 5 CV's de 1.0 M hidróxido sódico. La velocidad de flujo fue 6 CV/h durante la purificación y se mantuvo una temperatura constante de 5°C.

[0123] Se consiguió separar los picos de elución tardía con una retención relativa (RR) >1000, como viene ilustrado en la figura 2. En total, los picos de elución tardía (RR1045, RR1066, RR1119, RR1148, RR1192 y RR1247) fueron reducidos por un factor 2.5. La retención de los picos se refiere a la retención relativa del pico respectivo relativamente al pico de producto principal en el sistema de análisis RP-HPLC. La recogida de fracciones 12-17 resultó en un rendimiento del 62%.

Ejemplo 4 - La reducción de compuestos de alto peso molecular

[0124] Se envasó una columna de 2.0 L con resina TSKgel Phenyl-5PW (20 µm) y se equilibró con 20 CV de 2.0 M acetato amónico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM histidina, a pH 6.0. Se cargaron 5.3 L de una solución que contiene 0.751 mg/ml FVIIa análogo en 2.0 M acetato amónico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM histidina, a pH 6.0 que corresponden con una carga específica de 2.0 mg/ml resina. La columna fue lavada usando 10 CV del tampón de equilibrado. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal desde el lavado y el tampón de equilibrado a 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM histidina, pH 6.0 sobre 10 CV seguido de un mantenimiento de 6.5 CV. Una fracción de la agrupación fue recogida desde 100 mAu (5 mm en el haz de luz) en el borde delantero a 65 mAu (5 mm en el haz de luz) en el borde de salida. El volumen de agrupación fue 9.0 L

[0125] La columna fue regenerada usando 5 CVs de 50 mM tri citrato sódico, a pH 7.5 seguido de 5 CVs de 1.0 M hidróxido sódico. La velocidad de flujo fue 6 CV/h durante la purificación y se mantuvo una temperatura constante de 5°C.

[0126] Según SDS-PAGE, la carga contenía diferentes componentes con un peso molecular mayor que el del producto. El paso de purificación descrito redujo todos estos a menos de la mitad de la concentración (ver tabla 2 y figuras 4 y 5).

Tabla 2

	<b>PM (kDa)</b>	<b>Carga (%)</b>	<b>Agrupación (%)</b>	<b>Reducción (pliegue)</b>
	185	0.50	< 0.50	<b>&gt;1.0</b>
	148	1.11	< 0.50	<b>&gt;2.2</b>
	91	3.72	1.53	<b>2.4</b>
<b>FVIIa análogo</b>	48	94.67	98.47	

Ejemplo 5 - Reducción de los picos de elución tardía

[0127] Se analizó una muestra de la carga y agrupación mediante RP-HPLC como viene descrito anteriormente en Métodos generales. Se observaron una reducción tanto de las formas oxidadas como de los picos de elución tardía (picos ET) (ver tabla 3).

Tabla 3

	<b>Carga HIC (%)</b>	<b>Agrupación HIC (%)</b>	<b>Pliegue de reducción</b>
<b>Suma de picos ET</b>	7.7	1.5	5.1

Ejemplo 6 - Reducción del GD-FVII mediante purificación HIC del FVIIa análogo a pH 6 usando TSKgel Phenyl-5PW

[0128] A 6 mg de hFVIIa recombinante se añadió acetato de NH<sub>4</sub> a una concentración final de 1.8 M y CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10 mM. El pH fue ajustado a pH 6.0. Esta muestra se añadió a una columna (0.5 cm en el diámetro interno x 10.5 cm longitud = 2 ml volumen de columna (CV)) envasada con TSKgel Phenyl-5PW de Toso Haas, equilibrado con 5 CV 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, a pH 6.0 (carga 1.6 g/L). La columna fue lavada con 3 CV 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, a pH 6.0. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de 18 CV desde 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub> hasta 50 mM acetato de NH<sub>4</sub> en un tampón que contiene 10 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 6.0. Se recogieron tres muestras; el borde delantero, el pico principal, al final del borde de salida. El pico principal fue recogido a través de la

## ES 2 515 915 T3

recogida de picos a aproximadamente 50% de absorbancia máxima (a 280 nm) en el borde delantero y a aproximadamente 20% de absorbancia máxima en el borde de salida. Cromatograma en la figura 6.

5 [0129] La purificación fue realizada a una velocidad de flujo de 6-12 CV/h y a una temperatura de 5°C. La columna fue regenerada usando 5 CV de 50 mM citrato, a pH 7.0 y 5 CV de 0.5 M NaOH.

10 [0130] Se analizó el contenido relativo del GD-Factor VII, con un PM aprox. de 43 kDA, en comparación con el FVII, con un PM aprox. de 48 kDA, en las tres muestras recogidas y en la muestra de aplicación mediante SDS-PAGE no reductor, ver Figura 7, y mediante escaneado del gel, ver Figura. Se observó una cantidad reducida de GD-FVII en el pico principal, ver tabla 5.

Tabla 5

Muestra	Contenido relativo de GD-FVII	Calle en figura 7
Aplicación	19%	2
Borde delantero	18%	3
Pico principal	15%	4
Borde de salida	61%	5

15 Ejemplo 7 - Reducción de los picos de elución tardía y otras impurezas relacionadas con el producto mediante purificación HIC del FVIIa usando TSKgel Phenyl-5PW a 20 °C

20 [0131] A 6 mg de hFVIIa recombinante se añadió acetato de NH<sub>4</sub> hasta llegar a una concentración final de 1.8 M y CaCl<sub>2</sub> hasta llegar a una concentración final de 10 mM. El pH fue ajustado a pH 6.0. Esta muestra se añadió a una columna (0.5 cm en el diámetro interno x 10.0 cm longitud = 2 ml volumen de columna (CV)) envasada con TSKgel Phenyl-5PW de Toso Haas, equilibrado con 5 CV 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, a pH 6.0.

25 [0132] La columna fue lavada con 3 CV 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, a pH 6.0. La elución fue llevada a cabo utilizando un gradiente lineal de 18 CV desde 1.8 M acetato de NH<sub>4</sub> hasta 50 mM acetato de NH<sub>4</sub> en un tampón que contiene 10 mM CaCl<sub>2</sub>, a pH 6.0.

[0133] Aunque la recogida de picos a aproximadamente 65% de absorbancia máxima (a 280 nm) en el borde delantero y a aproximadamente 20% de absorbancia máxima en el borde de salida. Se recogió una agrupación.

30 [0134] La purificación fue realizada a una velocidad de flujo entre 6 y 12 CV/h y a una temperatura de 20°C. La columna fue regenerada con 50 mM citrato, a pH 7.0 y 0.5 M NaOH.

35 [0135] Se redujo el contenido del FVII de cadena pesada degradado y oxidado y de los picos de elución tardía como se muestra en tabla 6.

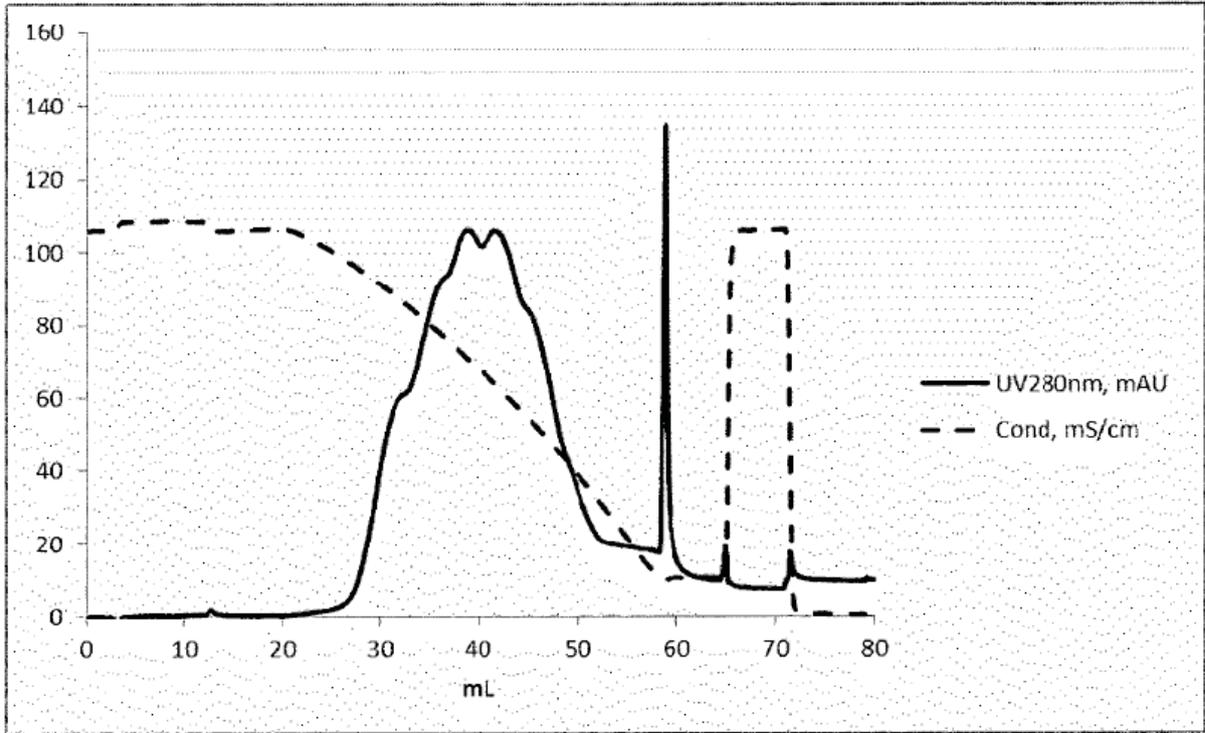
Tabla 6

Muestra	FVII oxidado	FVII de cadena pesada degradado	Picos de elución tardía
Aplicación	3.9%	4.9%	2.7%
Agrupación	2.3%	4.5%	0.5%

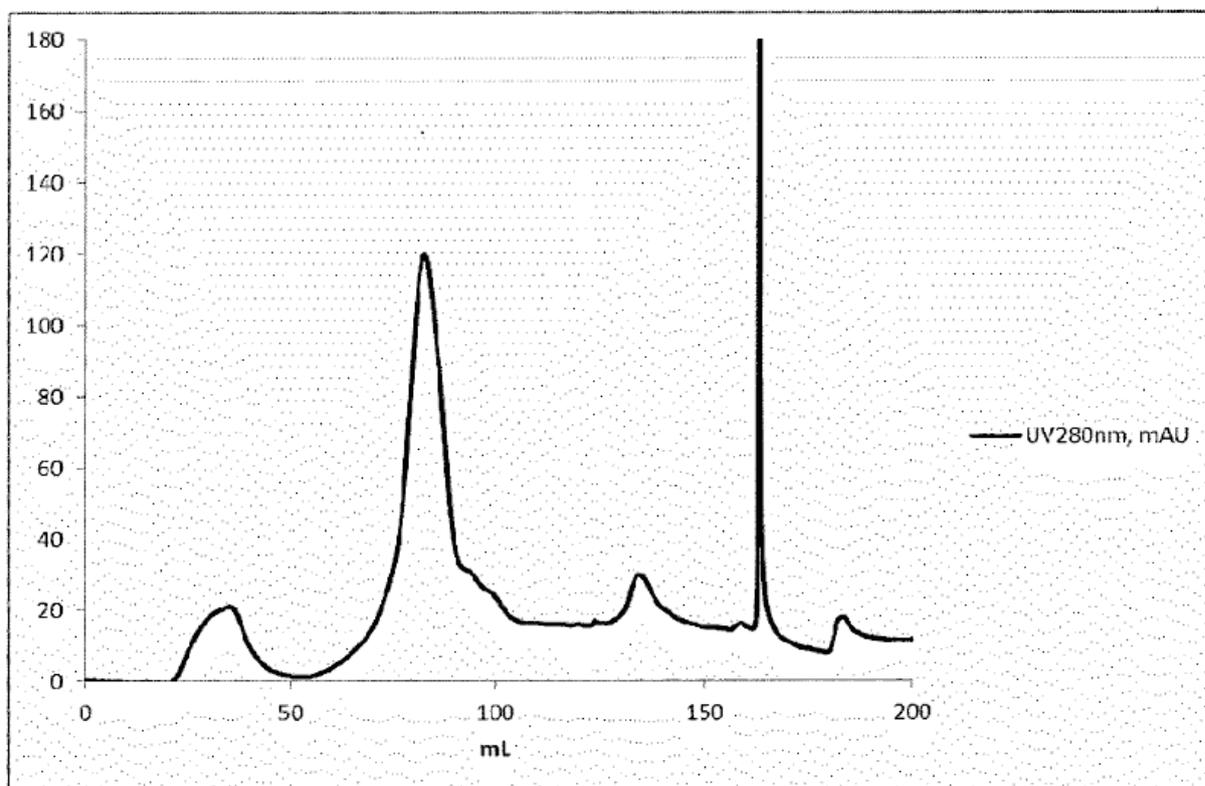
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso para reducir la presencia de las formas del Factor VII carentes de uno o varios glicano(s) N-enlazados en una sustancia medicamentosa de un polipéptido del Factor VII activado creado por recombinación, dicho proceso incluye los pasos:
- 10 (a) contactar la sustancia medicamentosa con un material de cromatografía de interacción hidrofóbica bajo condiciones que facilitan la unión de una parte de dicha sustancia medicamentosa a dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica; dicha sustancia medicamentosa contiene una sal seleccionada de la lista de: acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, cloruro sódico, acetato sódico, sulfato sódico, acetato potásico, cloruro potásico y sulfato potásico, y/o unos iones híbridos seleccionados de la lista de: glicina, alanina, beta-alanina, leucina, e isoleucina, en una concentración en el rango entre 0.0-0.1 M o en el rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación para la sal respectiva a la temperatura en la que dicho paso (a) se lleva a cabo;
- 15 (b) opcionalmente lavar dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de lavado; y  
(c) eluir dicho material de cromatografía de interacción hidrofóbica con un tampón de elución, y recolectar una sustancia medicamentosa purificada del polipéptido del Factor VII activado como eluato;
- 20 donde la presencia de las formas del polipéptido del Factor VII carente de uno o varios glicanos(s) N-enlazados en la sustancia medicamentosa purificada recogida en el paso (c), como viene determinado por los métodos definidos aquí, se reduce con al menos el 50% (p/p) en comparación con la sustancia medicamentosa aplicada en el paso (a).
- 25 2. Proceso según la reivindicación 1, donde el material de cromatografía de interacción hidrofóbica se selecciona del grupo consistente en resinas sustituidas con ligandos de butilo y/o ligandos de fenilo.
- 30 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la carga de la sustancia medicamentosa en el paso (a) se encuentra en el rango de al menos 250 mg de polipéptido del Factor VII por Resina L.
- 35 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la sustancia medicamentosa en el paso (a) está en forma líquida y tiene una fuerza iónica de al menos 50 mS/cm.
- 40 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la sustancia medicamentosa en el paso (a) contiene una sal en una concentración en el rango de 0.5 M a 85% de la concentración de saturación, o entre 0.7-2.2 M.
- 45 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tampón de lavado en el paso (b) contiene una sal seleccionada de la lista de: acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, cloruro sódico, acetato sódico, sulfato sódico, acetato potásico, cloruro potásico y sulfato potásico, y/o unos iones híbridos seleccionados de la lista de: glicina, alanina, beta-alanina, leucina, e isoleucina, en una concentración en el rango entre 0.0-0.1 M o en el rango entre 0.5 M a 85% de la concentración de saturación para la sal respectiva a la temperatura en la que el paso (b) se lleva a cabo.
- 50 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tampón de lavado en el paso (b) contiene una sal en una concentración en el rango entre 0.7-2.2 M.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tampón de elución en el paso (c) contiene una sal en una concentración inicial en el rango entre 0.7-2.2 M.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tampón de elución en el paso (c) es un tampón de gradiente con respecto a la sal.
10. Proceso según la reivindicación 9, donde la concentración inicial de la sal del tampón de gradiente está en el rango entre 1.7-2.2 M, y la concentración final de la sal del tampón de gradiente se encuentra en el rango entre 0.0-1.6 M.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la sal se selecciona del grupo consistente en acetato amónico, sulfato amónico, cloruro sódico, y acetato sódico.

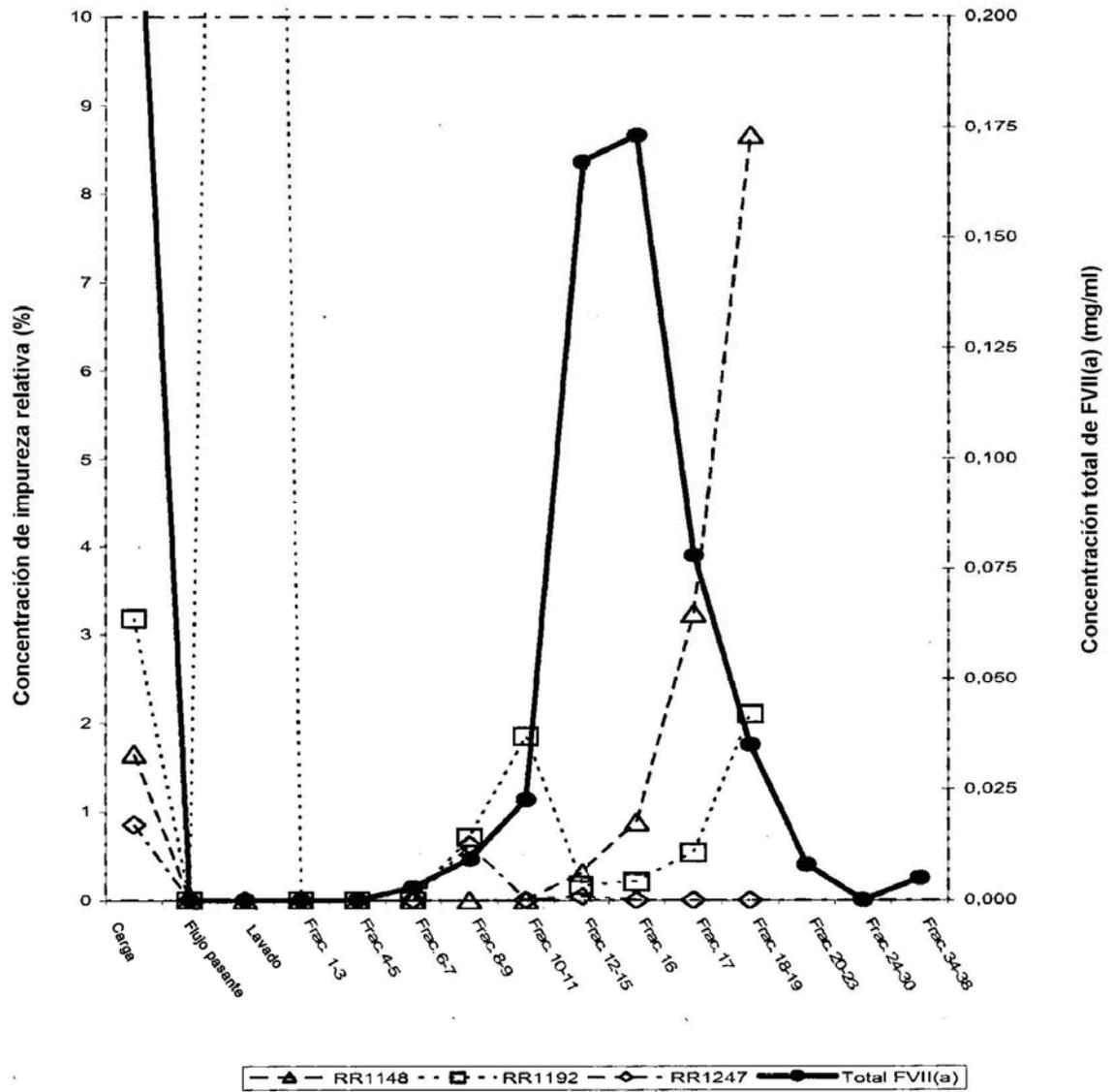
ES 2 515 915 T3

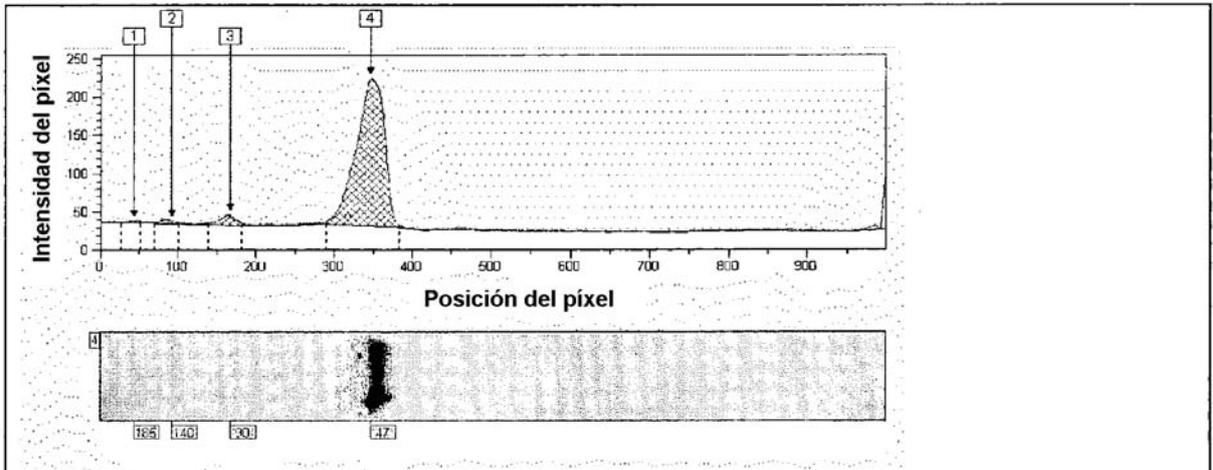


ES 2 515 915 T3

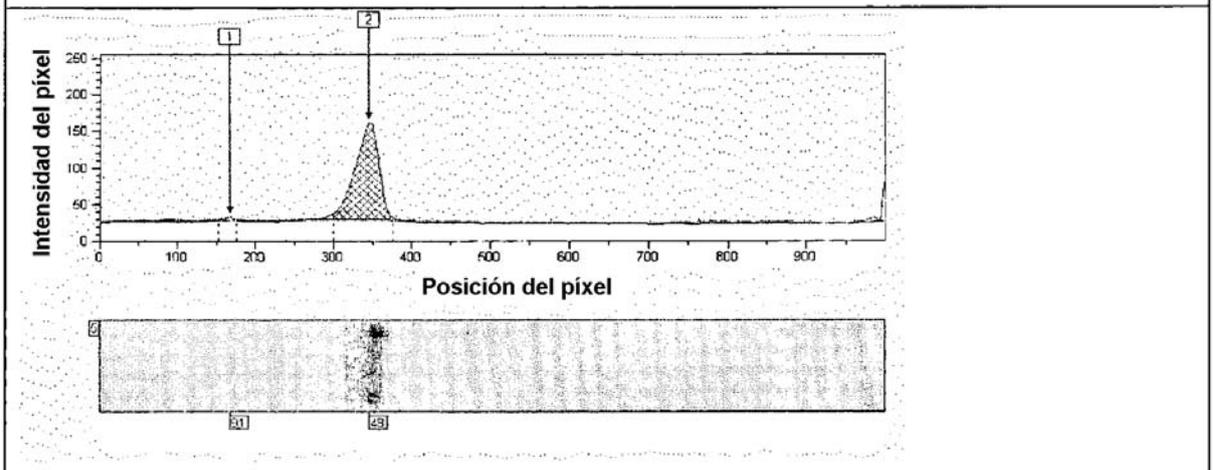


Separación de impurezas de elución tardía usando fenilo 5PW de TSK

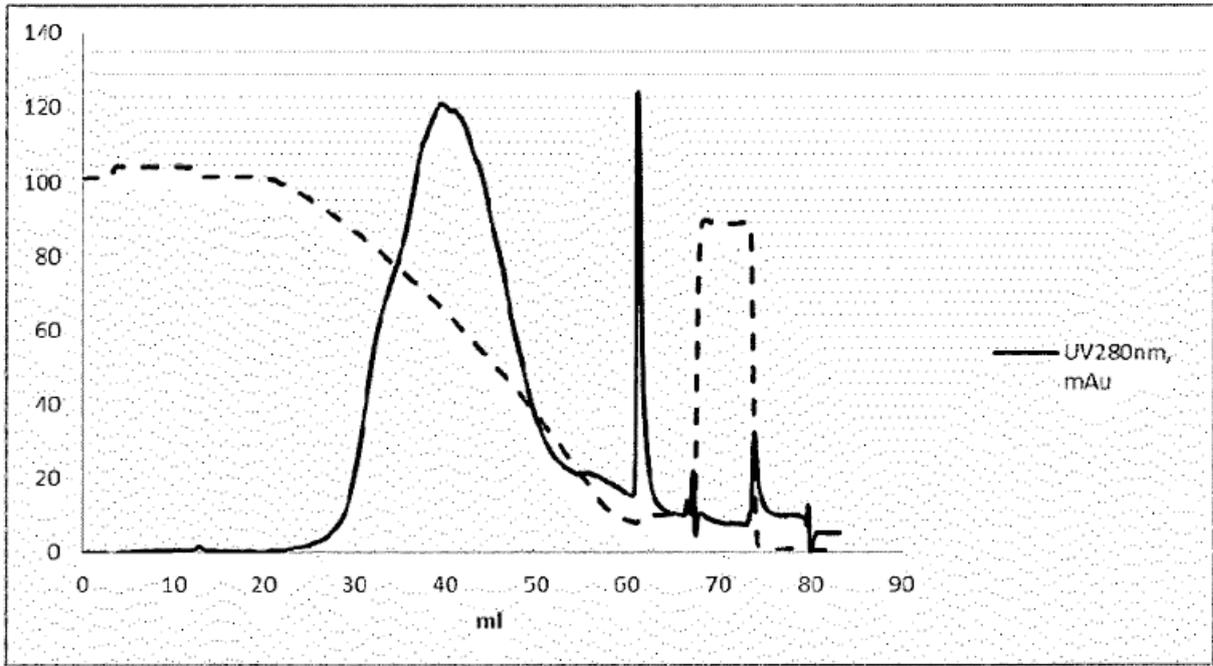




**Fig. 4/8**



**Fig. 5/8**



**Fig. 6/8**

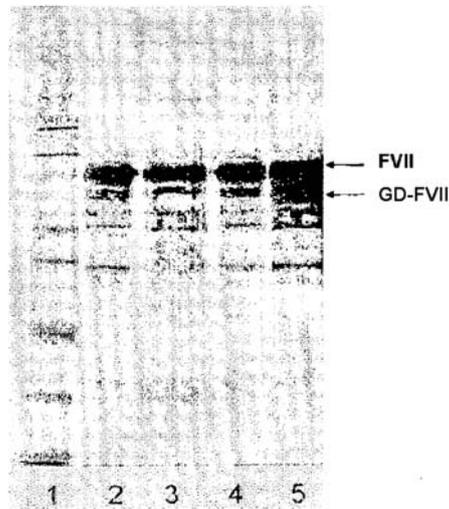


Fig. 7/8

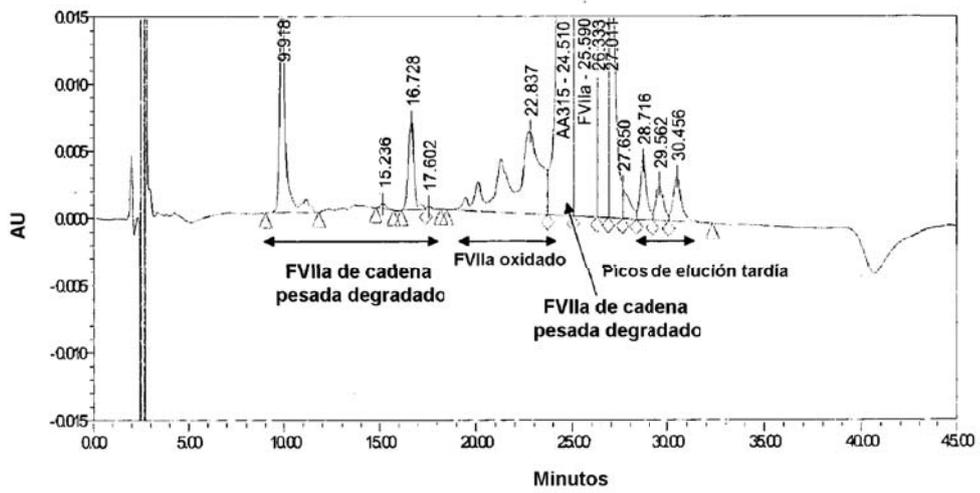


Fig. 8/8