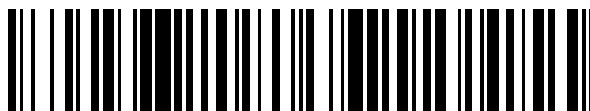


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 706**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 12179389 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2537862**

54 Título: **Procedimiento de purificación del factor de coagulación VIII**

30 Prioridad:

24.06.2008 EP 08158893
24.06.2008 US 129402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2015

73 Titular/es:

OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH

72 Inventor/es:

BORGVALL, CARIN;
ERICSSON, ULRIKA;
GILLJAM, GUSTAV;
JERNBERG, MATS y
WINGE, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 706 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

Procedimiento de purificación del factor de coagulación VIII

La presente invención se refiere a una fracción que contiene Factor FVIII que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención.

5 **Antecedentes de la invención**

La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que afectan negativamente la capacidad de controlar la coagulación de la sangre o coagulación. En su forma más común, la Hemofilia A, existe una deficiencia en el factor de coagulación FVIII, la Hemofilia A se produce en aproximadamente 1 en 5.000-10.000 nacimientos de varones. La proteína FVIII es un cofactor esencial en la coagulación de la sangre con propiedades multifuncionales. Se puede tratar la deficiencia de FVIII con concentrados de FVIII derivados de plasma o con FVIII producido de manera recombinante. El tratamiento con concentrados de FVIII ha conducido a una normalización de la vida de los pacientes con hemofilia. Históricamente, se ha tratado la Hemofilia A con FVIII originado a partir de plasma sanguíneo humano. En el plasma sanguíneo, en condiciones normales, la molécula de FVIII está siempre asociada a su cofactor; el factor de von Willebrandt (vWf), que estabiliza la molécula de FVIII a partir de diferentes formas de degeneración.

Los productos de FVIII derivados de plasma se producen en el mercado con diferentes purezas y con mayores o menores cantidades de vWf presentes. Usualmente, los productos con una baja cantidad de vWf contienen albúmina humana añadida y/u otros estabilizantes que incluyen concentraciones salinas aumentadas para estabilizar la molécula de FVIII. Los procedimientos usados para purificar FVIII eran normalmente una combinación de diferentes procedimientos de precipitación tales como crioprecipitación, precipitación con hidróxido de aluminio, etc., y etapas de cromatografía, principalmente, intercambio iónico, etapas de filtración en gel y por afinidad.

Para mejorar los productos de FVIII se empleó la cromatografía de afinidad, que eliminó eficazmente contaminantes hasta un grado elevado de pureza de FVIII incluyendo también la posibilidad de reducir también vWf (Farrugia y col., *Biotechnology and plasma fractionation Industry; The impact of advances in the production of Coagulation FVIII. Biotechnology, Vol. 3, N° 1, Febrero de 1993*). La desventaja de la cromatografía de afinidad era que esta es relativamente cara y que los anticuerpos monoclonales utilizados como ligandos de afinidad eran de origen animal.

En la mitad de la década de los 80 del siglo XX existían algunas transmisiones víricas asociadas con los productos de FVIII derivados de plasma. Incluso aunque se resolvió este problema a través de la implementación de etapas de reducción específicas de virus, esto fue el punto de partida del desarrollo de productos de FVIII recombinantes (rFVIII). En la década de los 90 se comercializó el primer producto de rFVIII y hasta la fecha existen tres productos de rFVIII diferentes (dos moléculas de longitud completa y una molécula sin el dominio B en la que se ha eliminado una parte inactiva de la molécula de FVIII para aumentar la productividad de la célula hospedadora (Eriksson y col., *The Manufacturing Process for B-domain deleted recombinant FVIII. Seminars in Hematology, Vol 38, Supl. 4 (Abril), 2001: pp24-31*)) con un alto grado de pureza (todas sin vWf).

Los procedimientos de purificación utilizados para purificar rFVIII eran una combinación de diferentes técnicas de cromatografía (ref. Bhattacharyya y col., Artículo de revisión; *Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, N° 3 julio-septiembre de 2003*). Uno de los procedimientos era la conocida técnica de inmunoafinidad (incluso aunque existen productos que resuelven esto, por ejemplo, con la afinidad peptídica (Kelly y col., *Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of FVIII.*) o un fragmento de anticuerpo derivado de levadura (Resina de afinidad VIIISelect FVIII – GE Health care, N° de cat. 17-5450, introduciéndose actualmente en el mercado) como se usa para el FVIII plasmático.

Como vWf está ausente en todos los productos de rFVIII, han de tomarse determinadas medidas para estabilizar la molécula de FVIII frente a la pérdida de actividad (agregación, proteasas, adsorción superficial, etc.). En uno de los productos se añade un agente quelante (EDTA, etc.) para proteger FVIII frente a la degeneración de las metaloproteasas (documento US-A-5.831.026). Añadir albúmina, aprotinina, insulina o incluso expresar simultáneamente rFVIII con vWf (y eliminar este corriente abajo en el ciclo de purificación) son estrategias que se han realizado para aumentar la estabilidad de la molécula de rFVIII (ref. Bhattacharyya y col., Artículo de revisión; *Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, N° 3, julio-septiembre de 2003*).

Se divulga otra estrategia (para mantener un procedimiento exento de aditivos mamíferos y agentes quelantes) en el documento EP-A-1 707 634, en el que una combinación de cantidades crecientes de sales contribuye a la estabilidad y a una elevada recuperación del producto de rFVIII (Wang y col, *Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15*). Sin embargo, esta técnica tiene una determinada desventaja. Por ejemplo, el contenido salino relativamente elevado hace que no sea adecuado procesar directamente con un intercambiador iónico sin dilución (y existe riesgo de una posible desestabilización Parti y col., *In vitro stability of recombinant FVIII. Haemophilia (2000), 6, 513-522. Biotechnology and Bioengineering, Vol 87, N° 3, 5 de agosto, 2004*).

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

El documento EP-A-1707634 divulga un procedimiento para el aislamiento de proteínas producidas de manera recombinante entre otros mediante diversos procedimientos tales como cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad, precipitación de proteínas, intercambios de tampones, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, medio de cromatografía de intercambio hidrófobo/iónico en modo mixto, cromatografía con quelación, cromatografía de afinidad de hidratos de carbono tal como cromatografía de afinidad de lectina o de heparina, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, diálisis, agentes de precipitación diferentes tales como polietilenglicol, sulfato de amonio, etanol, adsorción en hidroxipatito, adsorción mediante membrana con filtro, ligandos acoplados a partículas magnéticas, etc. Sin embargo, se identifican etapas concretas de purificación cromatográfica.

El documento WO-A-2005-082483 divulga un procedimiento para la purificación de anticuerpos a partir de una o más impurezas e un líquido, cuyo procedimiento comprende poner en contacto dicho líquido con una primera resina de cromatografía comprendida por un soporte al cual se han inmovilizado ligandos multimodales para adsorber los anticuerpos a la resina, donde cada ligando multimodal comprende al menos un grupo de intercambio catiónico y al menos un sistema de anillo aromático o heteroaromático. Se añade un eluyente para liberar los anticuerpos de la resina y se pone en contacto el eluato con una segunda resina de cromatografía.

El documento WO-A-2005/121163 divulga un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas de una solución de proteínas. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar una solución de proteínas que comprende una o más proteínas específicas y que tiene un pH preestablecido y una fuerza iónica o conductividad preestablecida.

Descripción de la invención

Un objeto de la invención era evitar los inconvenientes de los procedimientos de purificación de la técnica anterior. Se divulga un procedimiento para purificar FVIII en particular a partir de fuentes que tienen un elevado contenido salino, en concreto, tal como se usan en la fabricación de FVIII recombinante.

Esto se lleva a cabo mediante un procedimiento de purificación del factor de coagulación FVIII en una secuencia de purificación que emplea cromatografía en la que al menos se realiza una cromatografía utilizando una resina multimodal. El término "resina multimodal" tal como se usa en el presente documento significa un material cromatográfico que tiene un soporte y restos unidos al soporte cuyos restos interactúan con grupos químicos de las sustancias que se van a separar. En una realización concreta de la invención, la resina multimodal comprende restos unidos a una matriz y los restos pueden interactuar con FVIII en una mezcla mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones tales como puente de hidrógeno y/o interacción hidrófoba.

Se proporciona un procedimiento para purificar o enriquecer el factor de coagulación FVIII empleando cromatografía que comprende las etapas de proporcionar una fracción que contiene FVIII en una solución acuosa que tiene una elevada fuerza iónica; poner en contacto la fracción que contiene FVIII con una resina multimodal; lavando opcionalmente la resina multimodal que tiene FVIII adsorbida con un tampón acuoso de lavado; eluyendo las fracciones que contienen FVIII mediante un tampón de elución acuosa que comprende al menos un aminoácido y que está cargado positivamente a un pH 6 a 8; y recogiendo opcionalmente las fracciones que contienen FVIII en una forma purificada o enriquecida.

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

Las técnicas tienen determinadas ventajas y desventajas. Siendo una ventaja la posibilidad de unirse a proteínas en una concentración salina más alta, en comparación con la cromatografía de intercambio iónico utilizada más a menudo. Una desventaja es que la elución incluye a menudo condiciones relativamente rigurosas similares por ejemplo a un pH por debajo o por encima del pH neutro, solo o en combinación con otros parámetros de elución. FVIII es una proteína relativamente inestable, por ejemplo, con respecto a valores de pH fuera del valor neutro; pH 6-8 (Wang y col, Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15). Este problema se resuelve en condiciones de elución suaves en un intervalo de pH aproximadamente neutro que retiene la actividad de la molécula de FVII y facilita el uso de cromatografía multimodal en combinación con los efectos de estabilización de la concentración salina aumentada descritos, por ejemplo en el documento EP-A-1 707 634.

Se divulga que la cromatografía multimodal se puede realizar en una columna cromatográfica. Esto se puede considerar como una primera etapa de captura. El procedimiento puede realizarse también en modo discontinuo. Se

facilita también un procedimiento de purificación sin adición de aditivos estabilizantes derivados de seres humanos o animales y el uso de un procedimiento completo que está ausente en el anterior (resinas de inmunoafinidad basadas en anticuerpos monoclonales). El uso de la resina multimodal, en comparación como etapa de captura, facilita también una mayor capacidad de unión en comparación con los intercambiadores de iones convencionales, que da como resultado un eluato del producto más concentrado a partir de la etapa, que es ventajoso para la estabilidad del producto.

El procedimiento está relacionado normalmente con la purificación de FVIII recombinante (FVIII), en concreto FVIII recombinante al que se ha eliminado el dominio B.

Normalmente, la solución comprende FVIII en una solución a concentración salina elevada que corresponde a una conductividad de entre aproximadamente 25 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C

Se divulga que FVIII se aplicó a la resina multimodal y tras la unión a la resina multimodal se eluyó posteriormente con un tampón adecuado.

Tras la aplicación de la mezcla que comprende FVIII y la unión de FVIII a la resina multimodal, se eluyó la molécula de FVIII de la resina multimodal usando un tampón de elución que comprende al menos un aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8, en particular, el aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8 es lisina, arginina y/o histidina y sus combinaciones, en particular en concentraciones de > 0,4 M, concretamente > 0,5 M.

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

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

Particularmente, la concentración del aminoácido que está cargado positivamente a un pH de 6 a 8 está actualmente en una cantidad de al menos >0,4 M, en concreto >0,5 M. Si se usan concentraciones mayores que 1 M del aminoácido concreto, esto no conduce a ventajas adicionales. Normalmente, la cantidad de arginina está en el intervalo de entre aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 1,0 M, en particular, en un intervalo desde aproximadamente 0,7 M a aproximadamente 0,9 M. El grupo hidroxilo que contiene un compuesto orgánico tal como un alcohol, por ejemplo, etilenglicol están en concreto presente en cantidades de entre 0 % (v/v) a 30 % (v/v), en particular entre aproximadamente 0,0001 M a aproximadamente 0,1 M, en particular entre aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 0,03 M. La concentración del compuesto para regular la fuerza iónica del tampón debe estar en el intervalo para proporcionar una conductividad entre aproximadamente 15 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C. La cantidad de detergente no iónico está normalmente en el intervalo entre aproximadamente 0,001 % a 1 %.

Se divulga que se aplica un tampón de lavado a la resina multimodal. Esta se puede usar para eliminar los contaminantes por lavado y retener el FVIII, antes de que se libere el FVIII.

Se divulga que, en el procedimiento, la resina de cromatografía "multimodal" contiene al menos uno de los siguientes restos:

- i) un ligando de N-Bencil-N-metil etanolamina cargado positivamente
- ii) un ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanoico cargado negativamente,
- iii) un ligando de fenilpropilo,
- iv) un ligando de N-hexilo,
- v) un ligando de 4-mercapto-etil-piridina,
- vi) un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahydrofuran-2-ilmetil)-amino)-fenil)-amino)-benzoico o una de sus combinaciones.

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

Se divulga que, en el procedimiento, la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad donde se proporciona la afinidad mediante un ligando de la proteína tal como un fragmento de anticuerpo que se expresa en levaduras.

Se divulga que, en el procedimiento, la secuencia de purificación comprende además etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación química, una etapa de eliminación en función del tamaño, etapas de cromatografía o sus combinaciones cuyas etapas se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno que se va a eliminar.

5 En particular, en el procedimiento, la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:

- i. el uso de una membrana aniónica tal como Sartobind Q, en particular para la reducción del ADN;
- ii. una resina catiónica multimodal tal como Capto MMC;
- iii. una resina de intercambio catiónico tal como SP Sefarosa FF;
- 10 iv. el uso de una membrana aniónica secundaria tal como Sartobind Q en particular para la reducción adicional del ADN;
- v. una etapa de inactivación química para virus con envoltura lípidas en particular, la inactivación con disolvente/detergente que emplea fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100 como se describe en el documento EP-A-131740;
- 15 vi. una resina de afinidad basada en un ligando de proteínas expresado en levaduras, tal como VIIISelect o una resina aniónica de cromatografía multimodal tal como Capto Adhere;
- vii. una etapa de eliminación de filtración de patógenos con un tamaño de poro promedio de aproximadamente 20 nm tal como Planova 20N;
- viii. una resina de intercambio aniónico tal como Q Sefarosa FF;
- ix. una resina de cromatografía de exclusión por tamaño tal como Superdex 200pg.

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

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

Una composición de materia es el sujeto de la invención, cuya composición de materia comprende una FVIII recombinante purificada de acuerdo con la reivindicación I (sin la adición o el uso de cualquier aditivo humano o animal similar a albúmina o a un anticuerpo monoclonal basado en ligandos de afinidad). Se describen realizaciones preferidas adicionales en las reivindicaciones dependientes.

30 El apéndice 1 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento en el que la etapa de captura se realizó en una resina multimodal. Se procesó una suspensión celular añadiendo sal, separación de las células seguida por una etapa de reducción del ADN, preferiblemente en una membrana Q. La membrana Q (por ejemplo, Sartobind Q de Sartorius) es un intercambiador aniónico básico fuerte con grupos de amonio cuaternario como un resto de intercambio aniónico. En los intervalos específicos de pH y conductividad, la membrana Q se une específicamente al ADN, mientras que el producto (y las proteínas de las células hospedadoras) permanece en el flujo a su través. En contraste con la cromatografía de columna de intercambio iónico convencional, el ligando cargado se une a un soporte de membrana que facilita un alto rendimiento y es fácil de usar. La etapa de captura comprende el procedimiento de utilizar la resina multimodal. La etapa de captura va seguida por separación en un intercambiador catiónico, SP Sepharose FFTM (GE HealthCare) seguido por una reducción adicional en una membrana Q. Se realizó un tratamiento de inactivación vírica mediante el procedimiento del detergente disolvente (procedimiento S/D como para el ejemplo divulgado en el documento EP-A-131740 y una etapa de purificación adicional en, por ejemplo, la resina de afinidad VIII SelectTM. Se realizó una etapa adicional de concentración / pulido en una columna de intercambio aniónico, por ejemplo en Q Sepharose FFTM (GE HealthCare). El producto concentrado se procesó posteriormente en una columna de filtración en gel (por ejemplo, Superdex 200 p.g.TM (GE HealthCare)) para intercambiar el tampón y eliminar los agregados y fragmentos potenciales. Se recogió el producto resultante, el eluato GF. Las respectivas etapas se explican con más detalle en los Ejemplos.

El apéndice 2 y 3 divulga la sustitución de la etapa de afinidad específica (VIIISelectTM (GE Healthcare)) que se describe en el Apéndice 1 por una cromatografía multimodal; Capto AdhereTM (GE HealthCare). De forma sorprendente, la secuencia de purificación, que se describe en el Apéndice 2, ejerció la misma pureza que la secuencia de purificación descrita en el Apéndice 1 (incluyendo la etapa de afinidad basada en el anticuerpo específico). Este resultado se repitió con el mismo material de partida, que se describe en el Apéndice 3. Este muestra el amplio potencial de utilización de la técnica de purificación multimodal más de una vez (en la etapa de captura; Capto AdhereTM (GE HealthCare) y en la etapa adicional de purificación corriente abajo con Capto AdhereTM (GE HealthCare) como se describe en el Apéndice 2 y 3) utilizando las condiciones de elución específicas para FVIII de acuerdo con la invención.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

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

Ejemplo 1: Producción de una suspensión celular que contiene FVIII.

5 Células

La línea de células utilizada es un derivado de las células 293 de riñón embrionario humano (HEK 293), que se adaptó al crecimiento exento de suero. Este hospedador, HEK 293F, se transfectó de manera estable con un casete de expresión que transportaba el gen de FVIII humano con el dominio B eliminado bajo el control de un promotor fuerte (documento EP-A-1 739 179).

10 Procedimiento de cultivo

Las células se cultivaron en medio exento de suero en equipo general y de acuerdo con los procedimientos generales bien conocidos en la materia, por ejemplo, cultivos con agitación o agitados en matraces con forma de t, matraces con agitador y biorreactores (sistemas desechables y tanques agitados convencionales, desarrollándose como cultivos con alimentación continua, alimentación discontinua, cultivos quimiostáticos con perfusión o continuos (Freshney, R I, Culture of animal cells: a manual of basic Technique, 4ª ed, Wiley – Liss; Spier, R E ed (2000), Encyclopedia of cell Technology, Wiley, Nueva York, Enfors, S-O y Häggström, L (2000), Bioprocess Technology: fundamentals and applications, Högskoletrickeriet, Royal Institute of Technology, Estocolmo; Vinci, V A y Parekh, S R (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, Microbial, and plant cells. Humana Press, USA). Normalmente, se usó la perfusión del medio para aumentar el número y el producto celular más allá de los niveles de cultivos discontinuos normalizados. El rendimiento del producto y la cantidad de proteínas de células hospedadoras difieren dependiendo del modo de cultivo:

- el título del producto aumentará normalmente con el número de células
- el contenido total de proteínas y el contenido de ADN aumentará normalmente con el número de células
- el contenido total de proteínas y el contenido de ADN puede aumentar también con la longevidad del cultivo
- los cultivos discontinuos acumulan proteínas y ADN; no se añade nada externamente, tampoco se elimina.
- los procedimientos de perfusión sensibilizan los cultivos celulares procedentes de metabolitos, proteínas, ADN y otras impurezas; se usaron normalmente filtros o centrifugas celulares para la retención de las células.

Debido a que el producto recombinante se asocia con las células, la suspensión de células es la cosecha. Las propiedades de la cosecha (títulos e impurezas del producto que se han mencionado anteriormente) difieren dependiendo del modo de cultivo utilizado.

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

El material de partida FVIII exento de células para purificación cromatográfica se obtuvo como sigue. Se añadió una disolución madre de cloruro de sodio y cloruro de calcio a la suspensión de células, producidas de acuerdo con el ejemplo 1, para dar concentraciones finales de 0,3 M y 30 mM respectivamente, y una conductividad de 30-40 mS/cm a 25 °C. La solución se mezcló durante aproximadamente 30 minutos, en los que después que se eliminaran las células mediante centrifugación continuó una etapa de filtración para eliminar cualquier desecho celular restante (para inhibir la coagulación de las siguientes etapas de la columna).

Ejemplo 3: condiciones de elución de la resina catiónica multimodal Capto MMC

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

Ejemplo 3a, evaluación de diferentes concentraciones salinas y pH para eluir FVII de la resina capto MMC (ejemplo de referencia).Columna y resina

La resina Capto MMC se empaquetó con una altura de lecho de 10 cm en una columna C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 8 ml. Se obtuvo la resina Capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317).

Material de partida

Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVII, obtenida como se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

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

- 5 Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida con un caudal de 5 mil/min. FVIII se unió a la resina durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el flujo a su través). La resina se sometió posteriormente a diferentes condiciones de elución como se describe en la Tabla 1 y se analizaron las cantidades de FVIII resultantes que salían procedentes de la columna con un procedimiento FVIII:C y se calcularon en un % en relación con la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 1

Condiciones de elución	Volumen eluido (CV)	FVIII:C encontrado en el eluato, (%)
NaCl 0,1 M, pH 6,5*	10	0
NaCl 0,3 M, pH 7,0*	90	0
NaCl 1 M pH 6,5**	20	0
NaCl 2 M, pH 6,5** (OgH07-626)	15	0

* Los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso

** El tampón de elución incluye L-histidina 0,05 M, CaCl₂ 0,05 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso

10 Conclusión del Ejemplo de Referencia 3a

Como puede apreciarse en la tabla 1, la unión de FVIII a la columna Capto MMC no es una interacción iónica.

Ejemplo de Referencia 3b, que evalúa las condiciones de elución de capto MMC, concentración de NaCl diferente con etilenglicol al 50 % constante.

Columna y Resina

- 15 La resina Capto MMM se empaquetó a una altura del lecho de 2 cm en una columna XK16/20 (1 volumen de columna (VC) = 4 ml). Se obtuvo la resina Capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317).

Material de partida

Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2.

20 Tampón de equilibrio

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

- 25 Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida con un caudal de 1 ml/min- FVIII se unió a la resina durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el caudal a su través). La resina se sometió posteriormente a las condiciones de elución diferentes que se describen en la Tabla 2 y se analizaron las cantidades resultantes procedentes de la columna con un procedimiento FVIII:C y se calcularon en un % en relación con la cantidad aplicada de FVIII.

Tabla 2

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

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,02 M, CaCl₂ 0,02 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso

Conclusión del Ejemplo de Referencia 3b

5 Como puede apreciarse en la tabla 2, la unión de FVIII a la columna Capto MMC puede ser inhibida por una combinación de etilenglicol y NaCl. Se usa normalmente etilenglicol al 50 % como tampón de elución para las resinas de afinidad basadas en proteínas convencionales. Se mejoraba la elución de FVIII si se combinaba etilenglicol con una concentración aumentada de cloruro de sodio hasta 1,5 M. Dos pH diferentes ensayados (pH 6,5 y 7,5) no cambian la recuperación de FVIII, indicando que el pH no se puede usar como un parámetro de elución de FVIII, comprendido en los límites de estabilidad de la proteína (aproximadamente 6-8). Una elevación de la concentración de NaCl a 2,5 M no aumenta la recuperación de FVIII:C en el eluato.

Ejemplo 3c variación de la arginina como un componente de elución de Capto MMC.10 Columna y resina

La resina Capto MMC se empaquetó a una altura del lecho de 8 cm en una columna Tricorn 5/100 (1 volumen de columna (VC) = 1,6 ml). Se obtuvo la resina Capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317-10).

Material de partida

15 Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

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

20 La columna se equilibró con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida con un caudal de 0,6 ml/min. FVIII se unió a la resina durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el caudal a su través). La resina se sometió posteriormente a condiciones de elución secuenciales diferentes (aproximadamente 10 volúmenes de columna (VC) cada uno) como se describe en la Tabla 3 y se analizaron las cantidades resultantes de FVIII eluyendo desde la columna con el procedimiento FVIII:C y se calcularon en % en relación con la cantidad aplicada de FVIII,

25 Tabla 3

Condiciones de elución*	FVIII:C encontrado en el eluato, (%)
Etilenglicol al 20 %	0
Arginina 0,1 M + etilenglicol al 20 %	0
Arginina 0,2 M + etilenglicol al 20 %	0
Arginina 0,3 M + etilenglicol al 20 %	0
Arginina 0,4 M + etilenglicol al 20 %	1
Arginina 0,5 M + etilenglicol al 20 %	10
Arginina 0,6 M + etilenglicol al 20 %	37
Arginina 0,7 M + etilenglicol al 20 %	32
Arginina 0,8 M + etilenglicol al 20 %	8
Arginina 0,9 M + etilenglicol al 20 %	1
Arginina 1,0 M + etilenglicol al 20 %	0

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

Conclusión del Ejemplo 3c (de acuerdo con la invención)

Como puede apreciarse en la tabla 3, la unión de FVIII a la columna capto MMC puede ser sorprendentemente inhibida por una combinación de etilenglicol y arginina. Se observa la elución de FVIII en eluatos que contienen hasta 0,9 M de arginina junto con etilenglicol al 20 % (en p/p).

Ejemplo 3d (de acuerdo con la invención), comparación de arginina y lisina como un componente de elución de Capto MMCColumna y resina

5 La resina Capto MMC se empaquetó hasta una altura del lecho de 4-8 cm en una columna Tricorn 50/100 o C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 1,6-3 ml). Se obtuvo la resina Capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317).

Material de partida

Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2.

Tampón de equilibrio

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

15 La columna se equilibrio con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida con un caudal que representaba un tiempo de contacto de 1-2 minutos. FVIII se unió a la resina durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el flujo a su través). La resina se sometió posteriormente a condiciones de elución diferentes como se describe en la Tabla 4 y se analizaron las cantidades resultantes de FVIII que salían desde la columna con el procedimiento FVIII:C y se calcularon en % en relación con la cantidad de FVIII aplicada.

Tabla 4

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

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

Conclusión del Ejemplo 3d (de acuerdo con la invención)

20 Como puede apreciarse en la tabla 4, se ha estudiado la unión de FVIII a la columna Capto MMC con etilenglicol al 20 % en combinación con lisina y arginina de concentración diferente. La arginina eluye FVIII mejor que la lisina, una concentración de 0,75 M parece dar como resultado aproximadamente una recuperación del 90 %. Parece posible usar cantidades más bajas de cualesquiera aminoácidos en combinación con etilenglicol, como etapa de lavado para eliminar impurezas de la molécula de FVIII, antes de eluir FVIII con por ejemplo arginina 0,75 M.

Ejemplo 3e, evaluación de la pureza y la recuperación usando condiciones de lavado y elución diferentes para la resina Capto MMC.Columna y resina

La resina Capto MMC se empaquetó en tamaños de columna diferentes (2-9 cm de altura del lecho, volumen 1,6 – 48 ml). Se obtuvo la resina capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317).

Material de partida

30 Los materiales de partida utilizados eran soluciones de proteínas que contienen rFVIII, obtenidas como se describen en el ejemplo 2, con una pureza típica de app. 100 UI de FVIII / mg de proteínas (como se puede ver en el ejemplo 9, tabla 18).

Tampón de equilibrio

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

Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida con caudales adecuados (dependiendo del tamaño de la columna, aproximadamente 13-300 cm/h). FVIII se unió a la resina

durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el flujo a su través). La resina se sometió posteriormente a condiciones de lavado y elución diferentes como se describen en la Tabla 5 y se analizaron las cantidades resultantes de FVIII que salía de la columna con el procedimiento FVIII:C y se calcularon en % en relación con la cantidad aplicada de FVIII.

5 Tabla 5

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

* Todos los tampones de elución incluyen L-histidina 0,01 M, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M y Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

** Medido con Bradford

Conclusión del Ejemplo 3e

10 Como puede apreciarse en la tabla 5, la combinación de etilenglicol al 20 % y arginina 0,4 M en una etapa de lavado antes de aplicar una concentración mayor de arginina en el tampón de elución proporciona un rendimiento elevado y un producto puro, la concentración de arginina en el tampón de lavado no debería exceder de 0,4 M debido a la recuperación de FVIII relativamente baja resultante.

Conclusión del ejemplo 3

15 Resulta claro que la resina multimodal catiónica (Capto MMC) no se puede eluir utilizando condiciones convencionales del intercambiador de iones (concentración elevada de sal) o de resinas de interacción hidrófobas (concentración baja de sal). Una cantidad creciente de aminoácidos cargados solos o en combinación con etilenglicol podría liberar de manera sorprendente la molécula de FVIII unida a la resina Capto MMC. Además, podrían variarse las concentraciones de NaCl, arginina, lisina y etilenglicol durante el lavado y la elución de la resina, para optimizar la recuperación y la pureza del eluato de Capto MMC.

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

20 Se realizaron las siguientes series de experimentos para evaluar condiciones de elución diferentes en la resina aniónica multimodal Capto Adhere.

Columna y resina

La resina Capto Adhere se empaquetó hasta un lecho de altura de 13,5 cm en una columna C10/20. Se obtuvo la resina Capto Adhere de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5444).

Material de partida

25 Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 6C.

Tampón de equilibrio

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

30 Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida. Se sometió posteriormente la resina a condiciones de elución diferentes como se describe en la Tabla 6 y se analizó la cantidad de FVIII resultante que salía de la columna.

Tabla 6

Muestra	Volumen, ml,	FVIII, UI/ml	FVIII Total, UI	FVIII Total (%)
Material de partida (carga)	184	140	25760	100
A (Tampón de equilibrio)	159	0,0	0	0

(continuación)

Muestra	Volumen, ml,	FVIII, UI/ml	FVIII Total, UI	FVIII Total (%)
B (Alto contenido en sal)	212	0,0,	0	0
C (Bajo contenido en sal)	53	0,0	0	0
D (Bajo contenido en aminoácidos + Bajo contenido en etilenglicol)	212	3,5	935	4
E (Aminoácido)	32	701	22432	87

Condición de elución A

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

Condición de elución B (Concentración elevada de sal)

L-histidina 0,05 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 13 ± 5 mS/cm a 25 °C.

Condición de elución C (concentración baja de sal)

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

Condición de elución D (Concentración baja de aminoácidos + concentración baja de etilenglicol)

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

15 Condición de elución E (Aminoácidos)

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,3 M, clorhidrato de arginina 0,8 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 53 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Conclusión del ejemplo 4

20 Resulta claro que la resina multimodal aniónica (Capto Adhere) no se puede eluir usando condiciones de elución convencionales del intercambiador de iones (concentración elevada de sal) o resinas de interacción hidrófobas (concentración baja de sal). Una cantidad creciente de un aminoácido cargado solo o en combinación con etilenglicol liberaría sorprendentemente la molécula de FVIII unida,

Ejemplo 5, Comparación de una etapa convencional de intercambio catiónico (SP Sepharose FF) con una resina multimodal catiónica (Capto MMC) como una etapa de purificación (etapa de captura)25 Columna y resina

La resina Capto MMC se empaquetó hasta una altura de lecho de 11 cm en una columna C10/20 (1 volumen de columna (VC) = 8,5 ml). Se obtuvo la resina Capto MMC de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5317).

La resina SP Sefarosa FF se empaquetó hasta una altura del lecho de 18 cm en una columna XK26/20 (1 volumen de columna (VC) = 100 ml). Se obtuvo la resina SP Sefarosa FF de GE Healthcare (Nº de cat. 17-0729).

30 Material de partida

Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2 (se utilizó material de partida idéntico para ambos experimentos). Para la resina Sefarosa FF, el material de partida se diluyó con tampón de dilución a una conductividad de 12 mS antes de aplicarse a la resina, para que FVIII fuera capaz de unirse.

35 Dilución del tampón SP

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01, NaCl 0,07 M, Polisorbato 80 en p/p, pH 6,5

Tampón de equilibrio MMC

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

Tampón de equilibrio SP

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

- 5 Se equilibraron las columnas con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida a un caudal de 5 ml/min a 40 ml/min respectivamente. Se unió FVIII a las resinas durante estas condiciones del tampón (no se detectaría FVIII en el flujo a su través). Se sometió posteriormente la resina a condiciones de lavado y elución diferentes, el principio descrito en el ejemplo 3d (lavado con lisina 0,75 M + etilenglicol al 20 %) y el ejemplo 3b (elución NaCl 1,5 M + etilenglicol al 50 %) para la etapa con Capto MMC y en el ejemplo 6B para la etapa de la SP Sefarosa FF (lavado con NaCl 0,15 M y elución con NaCl 0,36 M). En la Tabla 7 se pueden estudiar las diferencias entre las dos etapas de purificación.

Tabla 7

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

* Calculado a partir de material de partida sin diluir

** Medido con Bradford

Conclusión del ejemplo 5 (comparativo)

El resultado de la tabla 7 muestra, que el uso de la etapa con capto MMC como una etapa de captura/purificación de FVIII que ejerce algunas ventajas que incluyen:

- 15
- Mejor recuperación de FVIII
 - Mayor pureza con respecto a las proteínas de las células hospedadoras
 - Mayor pureza con respecto al ADN
 - Mayor capacidad de unión a la resina FVIII/ml
 - Tiempo de procedimiento más corto debido a una menor dilución (la resina MMC se puede procesar con una conductividad mayor)
- 20

Ejemplo 6, Elución específica (Ca) y lavado de componentes de FVIII y su purificación en una resina de intercambio catiónico (SP Sefarosa FF) (comparativo).

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

- 25 **Ejemplo 6a, Cloruro de sodio y arginina como elución específica y lavado de los componentes utilizados en una resina de intercambio catiónico (SP Sefarosa FF).**

Columna y resina

La resina SP Sefarosa FF se empaquetó a una altura del lecho de 15 cm en una columna XK16. Se obtuvo la resina SP Sefarosa FF de GE Healthcare (Nº de cat. 17-0729).

- 30 Material de partida

Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2 y procesadas adicionalmente en una resina Capto MMC, como se describe en el ejemplo 9. El eluato procedente de la columna Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad hasta aproximadamente 12 ms/cm, que permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sefarosa FF.

- 35 Tampón de dilución

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

Tampón de equilibrio

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

Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida. La resina se sometió posteriormente a condiciones de elución diferentes como se describe en la Tabla 8 y se analizó la cantidad resultante de FVIII que salía de la columna.

5

Tabla 8

Muestra	Volumen ml	FVIII UI/ml	FVIII total UI	Total %	Actividad específica ** UI/mg
Material de partida (carga)	2830	5	14150	100	178
Tampón de equilibrio y lavado	300	0,0	0	0	na
Lavado A	600	0,0	0	0	na
Elución	90	153	13770	97	362

na – no analizado

** Medido con Bradford

Lavado A

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,035 M, NaCl 0,15 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 16,5 – 18,0 mS/cm a 25 °C.

10

Tampón de elución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,025 M, NaCl 0,34 M, d-sorbitol 0,2 M, clorhidrato de arginina 0,045 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5, conductividad 36 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Conclusión del ejemplo 6a (comparativo)

15 Se eluyó eficazmente la FVIII unida procedente de la columna de SP Sefarosa FF cuando se utilizó un tampón de elución con una conductividad de 36 mS/cm. Esta conductividad era un efecto de la concentración de NaCl y en parte de las concentraciones de CaCl₂ y arginina. El sorbitol y la arginina se incluyeron en el tampón para estabilizar la molécula de FVIII durante el procesamiento, la congelación y la descongelación.

20 **Ejemplo 6b, Cloruro de sodio como una elución específica y lavado de componentes utilizados en una resina de intercambio catiónico (SP Sefarosa FF).**

Columna y resina

Se empaquetó la resina SS Sefarosa FF hasta una altura del lecho de 15 cm en una columna C10/20. Se obtuvo la resina SP Sefarosa FF de GE Healthcare (N° de cat. 17-0729).

Material de partida

25 Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2 y el ejemplo 9. El eluato procedente de la columna Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad, lo que permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sefarosa FF.

Tampón de dilución

Histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,01 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5

30 Tampón de equilibrio

Histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, Polisorbato 80 al 0,02 %, pH 6,5, conductividad 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida. Se sometió posteriormente la resina en condiciones de elución diferentes como se describe en la Tabla 9 y se analizó la cantidad resultante de FVIII que salía de la columna.

35

Tabla 9

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

** Medido con Bradford

Lavado B

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

Tampón de elución

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

Conclusión del ejemplo 6b

10 Se usó un tampón de elución con una conductividad de 36 mS/cm. En comparación con la usada en el experimento 5a se excluyó la arginina y se ajustó la conductividad a 36 mS/cm añadiendo una concentración de NaCl ligeramente mayor. El porcentaje de FVIII eluido fue ligeramente inferior que en el experimento 5a indicando que la arginina tiene una función positiva durante el procedimiento.

15 **Ejemplo 6C, Cloruro de calcio como una elución específica y lavado de componentes utilizados en una resina de intercambio catiónico.**

Columna y resina

La resina SP sefarosa FF se empaquetó hasta una altura del lecho de 15,5 cm en una columna XK26. Se obtuvo la resina SP Sefarosa FF de GE Healthcare (Nº de cat. 17-0729).

Material de partida

20 Los materiales de partida utilizados eran una solución de proteínas que contenía rFVIII, obtenidas como se describe en el ejemplo 2 y el ejemplo 9. El eluato procedente de la columna Capto MMC se diluyó 12x con un tampón de dilución para disminuir la conductividad, lo que permite la unión de la proteína diana a la resina SP Sefarosa FF.

Tampón de dilución

L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,01 M, NaCl 0,1 M, Polisorbato 80 al 0,02 % en p/p, pH 6,5

25 Tampón de equilibrio

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

30 Se equilibró la columna con tampón de equilibrio seguido por la carga del material de partida. La resina se sometió posteriormente a condiciones de elución diferentes como se describe en la Tabla 10 y se analizó la cantidad de FVIII resultante que salía de la columna.

Tabla 10

Muestra	Volumen ml	FVIII UI/ml	FVIII total UI	Total FVIII %	Actividad específica ** UI/mg
Material de partida (carga)	2000	31.7	63400	10	578

Muestra	Volumen ml	FVIII UI/ml	FVIII total UI	Total FVIII %	Actividad específica ** UI/mg
Tampón de equilibrio y lavado	830	0.0	0	0	na
Lavado B	3320	0.0	0	0	na
Lavado C (Sorbitol)	249	0	0	0	na
Elución (Cloruro de calcio)	410	149	61090	96	2811

** Medido con Bradford

Lavado B

5 L-histidina 0,01 M, CaCl₂ 0,2 M, NaCl 0,1 M, D-sorbitol 0,2 M, Polisorbato 80 al 0,02 % de Polisorbato 80, pH 6,5, conductividad 18,7 (18,0-19,0) mS/cm a 25 °C.

Lavado C (Sorbitol)

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

Tampón de elución (cloruro de calcio)

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

Conclusión del ejemplo 6c (6a, 6b)

15 En este experimento (6c) se hizo disminuir la concentración de NaCl y se usó una concentración de CaCl₂ superior, en el tampón de elución. Este cambio dio como resultado una conductividad de 18,7 mS/cm. La capacidad de elución del FVIII de la SP Sefarosa FF fue igualmente buena que en el experimento 5a en el que la conductividad en el tampón de elución era de 36 mS/cm. Fue un hallazgo inesperado que la recuperación de FVIII fue igual o mejor con un tampón de elución con casi la mitad de la conductividad. En la cromatografía de intercambio iónico, normalmente, la elución de las proteínas es fuertemente dependiente de la conductividad (fuerza iónica) o/y el pH. En este ejemplo, parece que los iones Ca²⁺ ejercen efectos específicos, diferentes que solamente la fuerza iónica (2811 en comparación con 362 y 948 respectivamente en 6^a y 6^b) cuando se utiliza una elución basada en Ca con una conductividad más baja.

Ejemplo 7, Purificación con un ligando de afinidad de FVIII derivado de levadura.

Se realizó el siguiente experimento para evaluar las condiciones de elución en la resina de afinidad VIIISelect.

Columna y resina

25 Se empaquetó una columna C10720 con la resina VIIISelect hasta una altura del lecho de siete cm. Se obtuvo la resina VIIISelect de GE Healthcare (Nº de cat. 17-5450).

Material de partida

El material de partida utilizado fue un eluato de SP Sefarosa que contenía rFVIII, obtenido como el principio descrito en el ejemplo 6b para la etapa de la SP Sefarosa FF (lavado con NaCl 0,15 M y elución con NaCl 0,36 M).

30 Composiciones del tampón:

Tampón A (tampón de equilibrio con los compuestos químicos S/D añadidos)

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

Lavado B (Tampón de equilibrio sin compuestos químicos S/D)

35 0,3 mol/kg de NaCl, 0,02 Mol/kg de CaCl₂, 0,02 Mol/kg de L-histidina, Polisorbato 80 al 0,02 % (p/p), pH. 6,5 ± 0,1, Conductividad: 31 ± 3 mS/cm a + 25 °C.

Lavado C (Tampón de lavado con una concentración elevada de sal)

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

Tampón D (Tampón de elución)

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

Los tampones de equilibrio, lavado y elución no se limitan al pH, concentraciones, y tipo de tampón, sales o detergentes indicados.

- 10 Se equilibró la columna con tampón de equilibrio A seguido por la carga del material de partida. Se sometió posteriormente la resina a condiciones de lavado y elución diferentes como las descritas en la Tabla 11 y se analizaron las cantidades de FVIII resultantes que salían de la columna.

Tabla 11. Resultados del experimento VIIISelect

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

** Medido con Bradford

- 15 Figura 1 SDS-PAGE teñido con plata que muestra el perfil de pureza del material de partida (Banda 1) y del eluato VIIISelect (banda 2) después de la etapa de la cromatografía de afinidad.

Conclusión del Ejemplo 7

La etapa VIIISelect es una etapa de purificación poderosa que da como resultado un eluato puro.

Ejemplo 8. Comparación de una secuencia de purificación con resina de afinidad VIIISelect o resina multimodal (Capto Adhere) en su lugar (Apéndice 3.)

- 20 Los dos diferentes esquemas de purificación se realizaron a pequeña escala de acuerdo con el ejemplo 7 (VIIISelect) y el ejemplo 10 (Capto Adhere).

Tabla 12. Comparación entre la recuperación y pureza de FVIII mediante el uso de la etapa de purificación con FVIIISelect o CaptoAdhere

Esquema de selección de FVIII	Actividad específica (IU/mg proteína)	Recuperación FVIII, %	Contenido de ADN (pg/1000 UI)	Esquema CaptoAdhere	Actividad específica (IU/mg proteína)	Recuperación FVIII, %	Contenido de ADN (pg/1000 UI)
Material de partida (Sp-filtrado)	1588*	100	1442	Material de partida (Sp-filtrado)	1588*	100	1442
Eluato VIIISelect	8759*	81	1399	Eluato VIIISelect	5112*	86	504
Q-Eluato VIIISelect	n.a.	106	840	Q-Eluato VIIISelect	n.a.	105	82
GF-Eluato VIIISelect	10322**	88	214	GF-Eluato VIIISelect	10679*	103	181

n.a. = no analizado

* Medido con Bradford

** Medido con análisis de aminoácidos

La Figura 2 muestra SDS Page teñido con plata de las muestras descritas en la Tabla 12, Comparación entre la recuperación y pureza de FVIII mediante el uso de la etapa de purificación con FVIIISelect o CaptoAdhere.

La hilera 1 muestra la pureza del material de partida (SP-filtrado) antes de su carga en la columna VIIISelect cargada con una concentración de FVIII de 483 UI/ml.

5 La hilera 2 muestra la pureza del eluato VIIISelect cargado con una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

La hilera 3 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-VIIISelect-Q Seph cargada con una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

La hilera 4 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-VIIISelect-Q Seph- filtración en gel, cargada con una concentración de FVIII de 385 UI/ml.

10 La hilera 5 muestra la pureza del material de partida (SP-filtrado) antes de su carga en la columna Capto Adhere cargada con una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

La hilera 6 muestra la pureza del eluato de Capto Adhere cargada con una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

La hilera 7 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-Capto Adhere-Q Seph, cargada con una concentración de FVIII de 500 UI/ml.

15 La hilera 8 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP-Capto Adhere-Q Seph-filtración en gel, cargada con una concentración de FVIII de 493 UI/ml.

La hilera 8 muestra un marcador molecular.

Conclusión del ejemplo 8

20 Se puede conseguir la misma pureza usando tanto la etapa de afinidad VIIISelect como la etapa cromatográfica Capto Adhere, si la pureza se compara en el producto final (GF-eluato). La pureza después de la etapa VIIISelect es mayor comparada con después de la etapa Capto Adhere, pero después de las etapas de purificación restantes (Q y GF) no se puede reseñar ninguna diferencia en pureza usando métodos analíticos. La recuperación usando la etapa Capto Adhere es ligeramente mayor en comparación con la secuencia que utiliza VIIISelect.

Ejemplo 9: Secuencia de purificación a escala industrial incluyendo resina de afinidad FVIIISelect

25 Para estudiar la reproducibilidad de la recuperación y la pureza, las Etapas 1-9 descritas a continuación se realizaron sobre 3-4 lotes a escala piloto. Cada lote se originó de una sus pensión celular de 40-100 l, como se divulga en el ejemplo 1-2.

ETAPA 1. Etapa nº 1 de reducción de ADN (cromatografía aniónica).

30 La reducción primaria del ADN se realizó por filtración a través de una membrana Q (Sartobind Q, Sartorius). La membrana Q se equilibró con tampón antes de la filtración (Tabla 13).

Tabla 13 Tampón usado para la Q-membrana

Membrana Q /reducción de ADN	Tampón de equilibrado	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 7
------------------------------	-----------------------	---

El filtrado celular (del ejemplo 2) se procesó a través de la membrana Q y se recogió el flujo directo que contenía el producto. La membrana se lavó con tampón de equilibrado para recoger el posible FVIII remanente en la membrana.

35 ETAPA 2. Etapa de captura (cromatografía multimodal, Capto MMC)

La purificación y concentración (captura) del producto primario se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico multimodal en gel a 5.000 - 10.000 UI FVIII / ml (Capto MMC). Antes de la carga del producto, el gel se equilibró con tampón de equilibrado Capto MMC. El filtrado de la etapa 1 se cargó en la columna Capto MMC, que posteriormente se lavó con tampón de equilibrado Capto MMC y se lavó sucesivamente con tampón de lavado 1-3 seguido por elución de FVIII como se describe en la Tabla 14.

40

Tabla 14

Cromatografía multimodal/Capto MMC	Tampón de equilibrado	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 7
	Tampón de lavado 1	NaCl 1 mol/kg, CaCl ₂ 0,05 mol/kg, L-histidina 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de lavado 2	NaCl 0,1 Mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de lavado 3	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,4 Mol/kg, etilenglicol al 10 % en peso, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 Mol/kg, L-histidina 0,02 Mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,8 mol/kg, etilenglicol al 10 % en peso, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

ETAPA 3 Cromatografía de intercambio catiónico, SP Sepharose FF

- 5 La solución que contenía FVIII (eluato Capto MMC) de la etapa 2 se purificó adicionalmente usando un gel de sefarosa FF (GE Healthcare n° cat. 17-0729). Antes de aplicar el producto, la columna se equilibró con tampón de equilibrado SP-Sepharose y la solución de proteína se diluyó hasta alcanzar la fuerza iónica y el pH del tampón de equilibrado, para poder unir el FVIII al gel. La solución de proteína diluida se aplicó a la columna SP Sepharose, que se enjuagó a continuación con tampón de equilibrado y después se lavó seguido por la elución de FVIII tal como se describe en la Tabla 15.

- 10 Tabla 15 Tampones usados en la cromatografía de intercambio catiónico

Cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose FF)	Tampón de equilibrado	NaCl 0,1 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de lavado	NaCl 0,15 mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,34 mol/kg, CaCl ₂ 0,035 mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,045 mol/kg, Sorbitol 0,2 mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

ETAPA 4. Etapa n° 2 de reducción de ADN (cromatografía aniónica)

La reducción secundaria del ADN se realizó por filtración a través de una membrana Q (Sartobind Q, Sartorius). La membrana Q se equilibró con tampón antes de la filtración (Tabla 16).

- 15 Tabla 16 Tampón usado para la membrana Q

Q-membrana/reducción de ADN	Tampón de equilibrado	NaCl 0,34 mol/kg, CaCl ₂ 0,035 mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,045 mol/kg, Sorbitol 0,2 mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
-----------------------------	-----------------------	--

El SP-eluato de la etapa 3 se filtró a través de la membrana Q y se recogió el flujo directo que contenía el producto para su procesamiento adicional. La membrana se lavó con tampón de equilibrado para recoger el posible FVIII remanente en la membrana.

- 20 **ETAPA 5.** Inactivación del virus (Tratamiento con Disolvente/Detergente (D/D))

El filtrado de la etapa 4 es la inactivación de virus mediante tratamiento D/D (disolvente/detergente) con Triton X-100 al 1 % y Tri-(N-Butil)-Fosfato (TNBP) al 3 %. La inactivación de virus se realiza con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h.

ETAPA 6. Purificación con una resina de cromatografía de afinidad derivada de resina

La solución de FVIII con virus inactivado de la etapa 5 se procesó a través de una columna de afinidad VIIISelect de acuerdo con la descripción del ejemplo 7. Se cargaron aproximadamente 5-20.000 UI FVIII por ml de resina.

ETAPA 7: Nanofiltración

- 5 El eluato VIIISelect de la etapa 6 se sometió a nanofiltración para eliminar los posibles agentes perjudiciales como virus no envueltos, usando un nanofiltro Planova 20N (Asahi Kasei Medical). Se recogió el flujo directo que contenía el producto.

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

- 10 La resina Q Sepharose FF se obtuvo de GE Healthcare (nº cat. 17-0510). El material de partida usado es un nanofiltrado obtenido de la etapa 7, cuyo contenido en sal y PH se ajustó para ser equivalente al del tampón de equilibrado de la Tabla 17. La solución de proteína diluida se aplicó a la columna Q Sepharose FF con una carga de 5.000 – 25.000 UI/ml de gel, que posteriormente se enjuagó con tampón de equilibrado y después se lavó con tampón de lavado seguido por elución de FVIII como se describe en la Tabla 17.

Tabla 17 Tampón usado en la etapa de intercambio iónico (Q-Sepharose FF)

Intercambio de aniones / Q Sepharose FF	Tampón de equilibrado	NaCl 0,1 Mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 7,5
	Tampón de lavado	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 Mol/kg, L-histidina 0,02 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 7,5
	Tampón de elución	NaCl 0,4 Mol/kg, CaCl ₂ 0,02 Mol/kg, L-histidina 0,02 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,0

15

ETAPA 9 Etapa de cromatografía con filtración en gel

- 20 Una resina de filtración en gel (Superdex 200pg, GE Healthcare nº cat. 17-1043) se empaquetó con una altura de lecho de 60-75 cm. El material de partida usado es el Q-eluito obtenido en la etapa 8. La columna se equilibró con una composición fisiológicamente aceptable para proteger el producto de la adsorción superficial y estabilizarlo durante la congelación, almacenamiento, criodesecación. El Q-eluito se aplicó a la columna de filtración en gel con un volumen de 2-8 % del volumen total de la columna. El eluato formulado que contiene FVIII, desprovisto de fragmentos y agregados, se recogió después de la columna (GF-eluito).

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

	BPP077	BPP78	BPP080	BPP081
Material de partida (descrito en el ejemplo 2)				
Peso (kg)	81	72	1462	160
FVIII total (UI)	2327570	1699200	4031280	3870400
Rendimiento FVIII (%)	100	100	100	100
Actividad específica* (UI/mg)	83	67	107	107
Contenido en ADN (pg/1000)	1,4*10 ⁵	5,93*10 ⁹	5,3*10 ⁹	-
MMC-eluito (etapa 2)				
Peso (kg)	3,5	4,4	10,9	9,6
FVIII total (UI)	412654	1023103	3844487	3428212
Rendimiento FVIII (%)	24	70	104	96
Actividad específica* (UI/mg)	846	512	578	646
Contenido en ADN (pg/1000)	1,8*10 ⁵	1,1*10 ⁵	4,6*10 ⁵	-

(continuación)

	BPP077	BPP78	BPP080	BPP081
SP-filtrado (etapa 4)				
Peso (kg)	3,1	3,3	5,0	4,6
FVIII total (UI)	1524582	1025994	3430796	3000515
Rendimiento FVIII (%)	112	116	119	108
Actividad específica* (UI/mg)	1588	793	1362	1277
Contenido en ADN (pg/1000)	<206	4463	1313	-

* Medido con Bradford

La captura de los lotes BPP077 y BPP078 recogidos se combinaron en un lote de purificación posterior BPP079, mientras que el lote BPP080 se denominó BPP083 y el BPP081 se denominó BPP084.

5 Tabla 19. Resumen de resultados de las etapas de cromatografía descritas en la etapa 5-9, de la parte posterior de tres lotes de purificación a escala piloto.

	BPP079	BPP83	BPP084
Material de partida (ejemplo 4)			
Peso (kg)	5476	4929	4220
FVIII total (UI)	1642680	2389094	2022646
Rendimiento FVIII (%)	100	100	100
Actividad específica*** (UI/mg)	1107	1254	1210
Contenido en ADN (pg/1000)	3733	-	-
VIIISelect-eluato (etapa 6)			
Peso (kg)	666	785	810
FVIII total (UI)	1251414	2094380	1674270
Rendimiento FVIII (%)	76	88	83
Actividad específica*** (UI/mg)	8064	-	-
Contenido en ADN (pg/1000)	1554	-	-
Nanofiltrado (etapa 7)			
Peso (kg)	7680	8205	9555
FVIII total (UI)	1051392	1822331	1763853
Rendimiento FVIII (%)	94	88	97
Actividad específica (UI/mg)	-	-	-
Contenido en ADN (pg/1000)	<730	-	-
* Medido con Bradford			
Q-eluato (etapa 8)			
Peso (kg)	281	291	263
FVIII total (UI)	1002327	1755603	1857832
Rendimiento FVIII (%)*	95	96	105
Actividad específica**** (UI/mg)	10975	-	10312
Contenido en ADN (pg/1000)	47	43	<14
Q-eluato (etapa 9)			
Peso (kg)	562	740	860
FVIII total (UI)	627754	1124800	926220
Rendimiento FVIII (%)**	79	116	101
Actividad específica**** (UI/mg)	12275	10000	10663
Contenido en ADN (pg/1000)	-	<66	-

* Rendimiento calculado para la etapa Q, ** Rendimiento calculado para la etapa GF, *** Medido con Bradford, **** Medido con análisis de aminoácidos.

La Figura 3 muestra un diseño SDS-PAGE con tinción de plata del producto final antes (Hilera 3 - BPP083, Hilera 7 - BPP084) y después (Hilera 6 - C810A139, Hilera 8 - C811A139) de la formulación de acuerdo con el ejemplo 9 (Tabla 18-19). La hilera 2 muestra un marcador molecular. La hilera 3 muestra una muestra de control de FVIII y la hilera 4 muestra un producto FVIII comercialmente disponible (ReFacto® - Lote C66202).

5 La Figura 4 muestra una transferencia Western de FVIII usando anticuerpos policlonales humanos dirigidos contra FVIII. Las hileras 1 y 10 están vacías, la hilera 2 muestra un patrón de masa molecular (Precision Plus Protein Western C de Bio-rad), la hilera 3 muestra un producto FVIII comercialmente disponible (ReFacto® lote C66202, la hilera 4-6 muestra muestras de control de FVIII, las hileras 7-9 muestran productos finales formulados de los lotes BPP079, BPP083 y BPP084 purificados de acuerdo con el ejemplo 9 (Tabla 17-18). Las muestras se diluyeron a una
10 concentración de FVIII correspondiente a 5 UI FVIII:C/ml antes de aplicarse a la transferencia Western.

La Figura 5 muestra un 2-D-PAGE después de la tinción con plata y la transferencia western de los productos finales formulados de los lotes BPP079 y BPP083, producto final (GF-eluato) de los lotes BPP079 GF eluato y BPP083 GF eluato purificados de acuerdo con el ejemplo 9 (Tabla 17-18). Se usó como referencia un producto FVIII comercial (ReFacto®, Lote 70591). Panel izquierdo: imágenes teñidas con plata de los geles con los GF-eluatos de BPP079 y BPP083 y ReFacto®. Panel derecho. Imágenes de transferencia western con los GF-eluatos de BPP083 y ReFacto®.
15

Conclusión del ejemplo 9

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

Ejemplo 10: Secuencia de purificación a escala industrial sin ligando de afinidad específico (resina aniónica multimodal, en su lugar Capto Adhere)

Para estudiar la reproducibilidad de la recuperación y la pureza, las Etapas 2-3 (Capto MMC y SP Sepharose FF) y la etapa 5 (inactivación del virus), se realizaron tal como se divulga en el ejemplo 9 sobre dos lotes (BPP068-069) a
25 escala piloto. A continuación, los dos lotes se combinaron en un lote posterior (BPP071) que se procesó de acuerdo con la Etapa 6-9 del ejemplo 9, con la excepción de que la etapa 6 (el gel VIIISelect) se cambió por una etapa de cromatografía de intercambio aniónico multimodal (Capto Adhere). La secuencia de purificación completa se puede estudiar en el Apéndice 2. Cada lote (BPP068-069) se originó de una sola suspensión celular de 50 l, como se divulga en el ejemplo 1-2.

30 La etapa Capto Adhere

La columna de intercambio aniónico multimodal (Capto Adhere, GE Healthcare, nº Cat. 17-5444) se cargó en el intervalo de 5.000 - 10.000 UI FVIII / ml de resina. Antes de la carga del producto, el gel se equilibró con tampón de equilibrado. La solución de virus inactivado (como se describe en el ejemplo 9, etapa 5) se cargó en la columna Capto Adhere, que posteriormente se lavó con tampón de equilibrado y se lavó sucesivamente con tampón de lavado 1-3 seguido por elución de FVIII como se describe en la Tabla 20.
35

Tabla 20

Cromatografía multimodal/Capto Adhere	Tampón de equilibrado	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 7
	Tampón de lavado 1	NaCl 2 mol/kg, CaCl ₂ 0,05 mol/kg, L-histidina 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de lavado 2	NaCl 0,1 Mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de lavado 3	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,01 Mol/kg, L-histidina 0,01 Mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,3 mol/kg, etilenglicol al 20 % en peso, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5
	Tampón de elución	NaCl 0,3 mol/kg, CaCl ₂ 0,02 Mol/kg, L-histidina 0,02 Mol/kg, clorhidrato de L-arginina 0,8 mol/kg, etilenglicol al 10 % en peso, Polisorbato 80 al 0,02 % en peso, pH 6,5

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

Tabla 21

	BPP068	BPP069
	Material de partida (como se describe en el ejemplo 1-2)	
Peso (kg)	98,6	110,5
FVIII total (UI)	734570	569700
Rendimiento FVIII (%)	100	100
Actividad específica* (UI/mg)	43	52
Contenido en ADN (pg/1000)	2,1*10 ⁹	7,1*10 ⁸
	Eluato Capto MMC (etapa 2 ejemplo 9)	
Peso (kg)	3,8	4,0
FVIII total (UI)	500813	389814
Rendimiento FVIII (%)	68	65
Actividad específica*** (UI/mg)	449	596
Contenido en ADN (pg/1000)	3,4*10 ⁷	3,5*10 ⁷
	Eluato SP (etapa 3 ejemplo 9)	
Peso (kg)	2,2	3,1
FVIII total (UI)	368903	315000
Rendimiento FVIII (%)	88	79
Actividad específica (UI/mg)	1490	2071
Contenido en ADN (pg/1000)	1,6*10 ⁷	4,3*10 ⁶

1) Rendimiento calculado en la etapa SP

* Medido con Bradford

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

	BPP079
	Material de partida (etapa 5 ejemplo 9)
Peso (kg)	5,2
FVIII total (UI)	568326
Rendimiento FVIII (%)	100
Actividad específica (UI/mg)	-
Contenido en ADN (pg/1000)	-
	Eluato Capto Adhere
Peso (kg)	296
FVIII total (UI)	543752
Rendimiento FVIII ²⁾ (%)	96
Actividad específica*** (UI/mg)	5117
Contenido en ADN (pg/1000)	2,5*10 ⁵
	Eluato Q (etapa 8, ejemplo 9)
Peso (kg)	244
FVIII total (UI)	266212
Rendimiento FVIII ³⁾ (%)	52
Actividad específica (UI/mg)	-
Contenido en ADN (pg/1000)	1121

(continuación)

BPP079	
Eluato GF (etapa 9, ejemplo 9)	
Peso (kg)	12
FVIII total (UI)	5610
Rendimiento FVIII ⁴⁾ (%) [*]	84
Actividad específica**** (UI/mg)	8061
Contenido en ADN (pg/1000)	836

2) Rendimiento calculado en la etapa Capto Adhere

3) Rendimiento calculado en la etapa Q Sepharose

4) Rendimiento calculado en la etapa de filtración en gel

* Medido con Bradford

5 La Figura 6 muestra un gel SDS-PAGE con tinción de plata de las muestras procedentes del lote piloto BPP071 purificado de acuerdo con el ejemplo 10. La hilera 1 muestra un producto FVIII comercialmente disponible (ReFacto®). La hilera 2 muestra el material de partida (SP-filtrado) antes de la etapa Capto Adhere. La hilera 3 muestra el perfil de pureza del eluato Capto Adhere. La hilera 4 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP filtrado - Capto Adhere - Q Seph. La hilera 5 muestra la pureza después de la secuencia de purificación SP filtrado - Capto Adhere - Q Seph – Filtración en del.

10 La Figura 7 muestra un gel de transferencia Western de muestras procedentes del lote piloto BPP071 purificado de acuerdo con el ejemplo 10. La hilera 1 muestra un producto FVIII comercialmente disponible (ReFacto®). La hilera 2 muestra el eluato Capto Adhere. La hilera 3 muestra el resultado de la secuencia de purificación SP filtrado - Capto Adhere - Q Seph. La hilera 4 muestra los resultados después de la secuencia de purificación SP filtrado - Capto Adhere - Q Seph – Filtración en gel

CONCLUSIÓN del Ejemplo 10

15 El proceso de purificación a escala piloto, incluyendo una etapa de cromatografía multimodal (Capto Adhere) en lugar del ligando de afinidad VIIISelect, reveló la misma recuperación, pureza y calidad de producto en el GF-eluato final.

Descripción de análisis

FVIII: C, Método de cribado basado en Coatest

20 El método se base en el principio en dos etapas, y se realizó usando técnica de microplacas. En una etapa, el factor activado X (Xa) se genera mediante la ruta intrínseca en la que FVIII: C actúa como cofactor. En la etapa dos, el Factor Xa se determina después mediante el uso de un sustrato cromogénico sintético, S-2222, en presencia de un inhibidor de trombina 1-2581 para prevenir la hidrólisis del sustrato mediante la trombina. La reacción se detuvo con ácido, y la actividad VIII: C, que es proporcional a la liberación de pNA (para-nitroanilina), se determinó fotométricamente a 405 nm contra un blanco de reactivo.

25 El método cumple el requisito de la Farmacopea Europea. La unidad de FVIII: C se expresa en unidades internacionales (UI) tal como se define en el actual International Concentrate Standard (IS) establecido por la Organización Mundial de la Salud. La rutina de utilizar tampón que contenía BSA al 1 % en lugar de plasma hemofílico severo para las prediluciones quedó validada. Véanse también las referencias bibliográficas (Farmacopea Europea Supplement 2000, General Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosen S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. J, Haematol, Supl. 40, vol 33, 139-145, 1984; Carlebjork G, Oswaldsson U, Rosen S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. Thrombosis Research 47; 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A y Thorpe R. Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. Biological, 24, 351-362 (1996)).

Determinación de la proteína total de acuerdo con Bradford

35 La determinación de la proteína total de acuerdo con Bradford se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a la proteína. Tanto las interacciones hidrófobas como las iónicas estabilizan la forma aniónica del colorante, ocasionando un cambio de color perceptible. El ensayo es útil porque el coeficiente de extinción de una solución de complejo albúmina-colorante es constante en un intervalo de concentración de 10 veces. Véase también la referencia Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254 1976 para más información.

40

Determinación de la proteína total de acuerdo con el análisis de aminoácidos (AAA)

Antes de la AAA, todas las proteínas se hidrolizaron con HCl 6 M durante 24 h a 110 °C. Los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónicos sobre resinas de poliestireno sulfonadas y se detectaron de forma continua en el eluyente. La detección se basa en una derivatización con ninhidrina después de la columna usando un fotómetro doble para la medición simultánea a 440 nm para prolina e hidroxiprolina y 570 nm para el resto de aminoácidos. Los aminoácidos asparagina y glutamina quedaron desaminados durante la AAA y se determinaron respectivamente como ácido aspártico y ácido glutámico. De esta forma, los resultados de ácido aspártico y ácido glutámico representan la suma de ácido aspártico/asparagina (Asx) y ácido glutámico/glutamina (Glx), respectivamente, en la muestra original. El triptófano no genera una respuesta diferenciada usando este método y, por tanto, no queda cuantificado mediante el AAA. La cisteína se destruye durante la hidrólisis y no se cuantifica. El AAA se describe adicionalmente en la referencia: Total protein AAA analytical method. Spackman, D. H., Stein, W. H., y Moore, S. (1958) *Anal. Biochem.* 30: 1190-1206.

Pureza o actividad específica (FVIII:C/Proteína total)

La pureza (también denominada actividad específica) de una muestra, se calcula tomando el valor determinado en el análisis de FVIII:C y dividiéndolo por el valor conseguido en el análisis de la proteína total.

SDS-PAGE(Distribución de pesos moleculares)

La electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) implica la separación de las proteínas en función de su tamaño. Este método describe el SDS-PAGE de proteínas, que se ejecuta en condiciones reductoras. Al calentar la muestra en condiciones desnaturalizantes y reductoras, las proteínas se despliegan y quedan revestidas con el detergente aniónico docecil sulfato de sodio (SDS), adquiriendo una carga neta negativa elevada que es proporcional a la longitud de la cadena de polipéptido. Cuando se carga sobre una matriz de gel de poli(acrilamida) y se introduce en un campo eléctrico, las moléculas de proteína con carga negativa migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan por un efecto de tamiz molecular, es decir, por su peso molecular. Los geles de poli(acrilamida) impiden que las moléculas más grandes migren tan rápido como las moléculas más pequeñas. Como la relación carga-masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de las proteínas depende casi en su totalidad de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración de una proteína (R_f) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si proteínas de masa conocida se analizan junto con desconocidas, la relación entre R_f y la masa se puede representar gráficamente, y estimarse la masa de las proteínas desconocidas. Las bandas de proteína separadas mediante electroforesis se visualizan con una tinción de plata. La evaluación se realiza visualmente, juzgando el aspecto de los patrones, referencia (muestra de control) y muestras analizadas.

Método analítico para el ADN (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa), qPCR)

El ensayo es un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real PCR (qPCR) basado en la química de SYBR Green 1 chemistry. Se basa en una publicación de Umetani y col. con algunas mejoras adicionales (Umetani N, Kim J, Hiramatsu 5, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ y Hoon DSB. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Perianapullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin Chem* 2006; 52: 1062-1069). En cada ciclo de la PCR, un fragmento de 115 pares de bases de la familia de secuencias ALU se amplifica mediante cebadores, ALU11S-F y ALU15-R. La familia de secuencias ALU de gran abundancia está limitado al genoma de la familia Hominidae (chimpancé, gorila, ser humano y orangután), pero el ensayo solamente amplifica ADN de origen humano. El procedimiento permite un análisis de alto rendimiento del ADN residual HEK293F DNA en medio de cultivo de tejido exento de células y sus procesos de purificación posteriores.

Transferencia Western, distribución de masa molecular de FVII

Las proteínas y los péptidos en preparaciones FVIII se separaron de acuerdo con la masa molecular mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) con docecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones reductoras. Después, las proteínas se transfirieron electroforéticamente de la matriz de gel a una membrana de nitrocelulosa, que posteriormente se incubó con un agente de bloqueo. A continuación se añaden anticuerpos policlonales de oveja dirigidos contra la molécula FVIII completa seguido por un anticuerpo secundario que es específico de la parte Fc de anticuerpos de cabra/oveja. Como tercera etapa, se añaden complejos solubles de anticuerpo de cabra dirigidos contra peroxidasa de rábano picante (HRP) y HRP. Después, los polipéptidos FVIII se detectan por la aparición de bandas azules tras la incubación con el sustrato 4-cloro-1-naftol.

Electroforesis en gel de poli(acrilamida) bidimensional (2-D PAGE)

El 2-D-PAGE se llevó a cabo para estudiar el modelo de banda electroforética de las cadenas de proteína de la rhFVIII Human-cl. Se realizó una focalización isoelectrica como ejecución de la primera dimensión usando un gradiente lineal de pH de pH 3 a 10. La segunda dimensión SDS- PAGE se ejecutó usando geles de poli(acrilamida) en gradiente (3-8 %). Los geles se tiñeron con plata después de la ejecución de la segunda dimensión o se enviaron para transferencia western blotting (O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins (*J. Biol Chem* 250: 4007-4021).

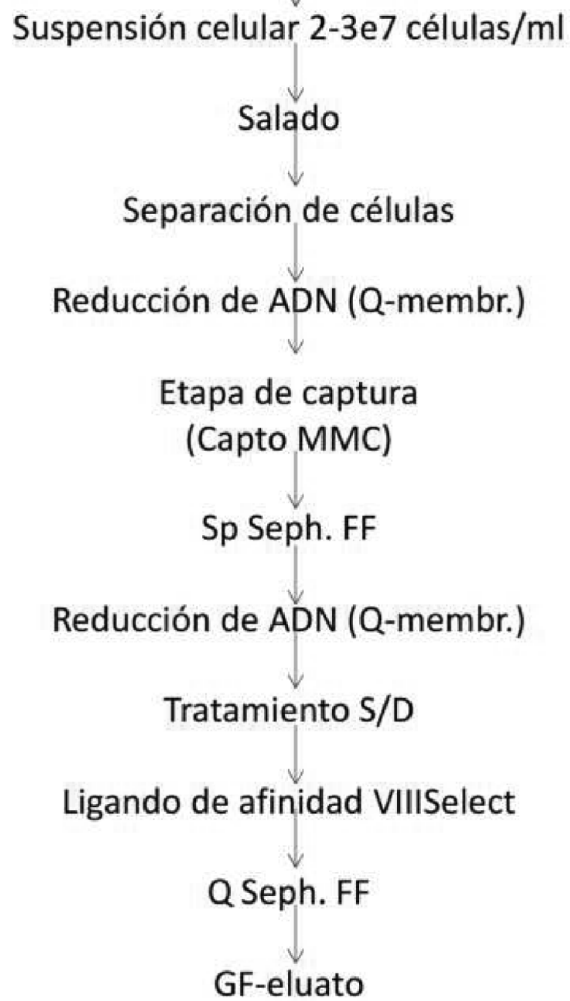
REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende un FVIII purificado recombinante que se puede obtener mediante un proceso de purificación o enriquecimiento en FVIII de coagulación que utiliza cromatografía que comprende las etapas de
- 5 - proporcionar una fracción que contiene FVIII en una solución acuosa que tiene una elevada fuerza iónica;
 - poner en contacto la fracción que contiene FVIII con una resina catiónica multimodal;
 - lavar la una resina catiónica multimodal que tiene adsorbido FVIII con un tampón acuoso de lavado;
 - eluir la fracción que contiene FVIII tampón acuoso de elución que comprende al menos un aminoácido que está cargado positivamente a un pH 6 a 8; y
- 10 - en el que la secuencia de purificación comprende además las siguiente etapas:
- i. una resina de intercambio catiónico
 ii. una membrana aniónica;
 iii. una etapa de inactivación química para virus de envoltura lipídica;
 iv. una resina de afinidad basada en un ligando proteico que consiste en un fragmento de anticuerpo expresado en levadura;
- 15 v. una etapa de eliminación de patógenos mediante filtración con un tamaño promedio de poro de aproximadamente 20 nm;
 vi. una resina de intercambio aniónico;
 vii. una resina para cromatografía de exclusión molecular y caracterizada porque la pureza después de la última etapa de purificación es > 4000 UI/mg y en que el contenido de ADN es < 100 pg/1000 UI FVIII.
- 20 2. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la membrana aniónica es Sartobind Q, especialmente para la reducción de ADN.
3. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la resina catiónica multimodal es Capto MMC.
- 25 4. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la resina de intercambio catiónico es SP Sepharose FF.
5. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la etapa de inactivación química para virus de envoltura lipídica es una inactivación con disolvente/detergente que utiliza fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100.
6. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la resina de afinidad basada en un ligando proteico es VIIISelect, consistiendo el ligando de VIIISelect en un fragmento de anticuerpo expresado en levadura.
- 30 7. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la etapa de eliminación de patógenos mediante filtración se realiza con un filtro que tiene con un tamaño promedio de poro nominal de aproximadamente 20 nm en particular con Planova 20N.
8. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la resina de intercambio aniónico es Q Sepharose FF.
- 35 9. La composición de materia de la reivindicación 1 en la que la resina de cromatografía de exclusión por tamaños es Superdex 200pg.
10. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque el FVIII recombinante se deriva de un derivado de células 293 de riñón embrionario humano.
11. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque el FVIII recombinante es un FVIII que tiene borrado el dominio B.
- 40 12. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque la disolución acuosa que comprende FVIII en una solución con alto contenido en sales corresponde a una conductividad de aproximadamente 25 a aproximadamente 200 ms/cm a 25 °C.
13. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque el aminoácido que está cargado positivamente a pH de 6 a 8 es seleccionado entre el grupo de grupos amino que contienen aminoácidos tales como lisina; arginina, histidina y sus combinaciones, especialmente en concentraciones de > 0,4 M, particularmente > 0,5 M.
- 45 14. La composición de materia de la reivindicación 1, en la que el tampón de elución comprende adicionalmente al menos un grupo hidroxilo que contiene compuestos orgánicos, tal como un alcohol, al menos un compuesto orgánico que comprende un grupo amino tal como un aminoácido, al menos una fuente que proporcione iones Ca²⁺, al menos un compuesto para regular la fuerza iónica del tampón, tal como sales inorgánicas, al menos un detergente no iónico y al menos una sustancia tamponadora para regular el pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 en particular a aproximadamente un valor neutro.
- 50

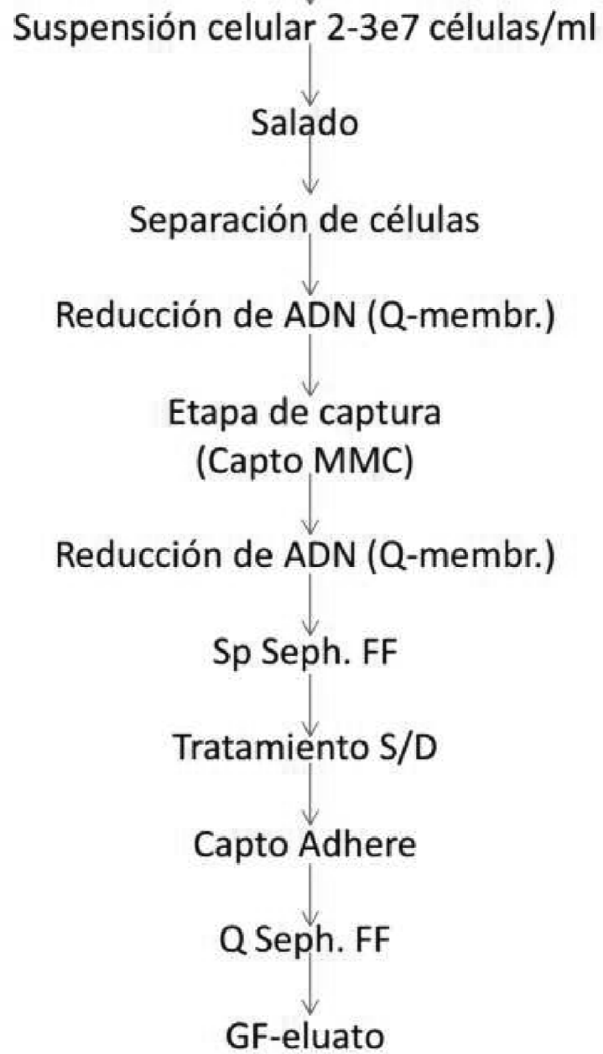
15. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia de purificación comprende además etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden etapas cromatográficas cuyas etapas están basadas en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno a eliminar.

5 16. La composición de materia de la reivindicación 1, caracterizada porque la pureza después de la última etapa de purificación es > 9000 UI/mg y preferentemente $> 10\ 000$ UI/mg de proteína y que el contenido en ADN es < 100 pg/100 UI FVIII y preferentemente < 10 pg/1000 UI FVIII.

Apéndice 1



Apéndice 2



Apéndice 3



Figura 1



Figura 2

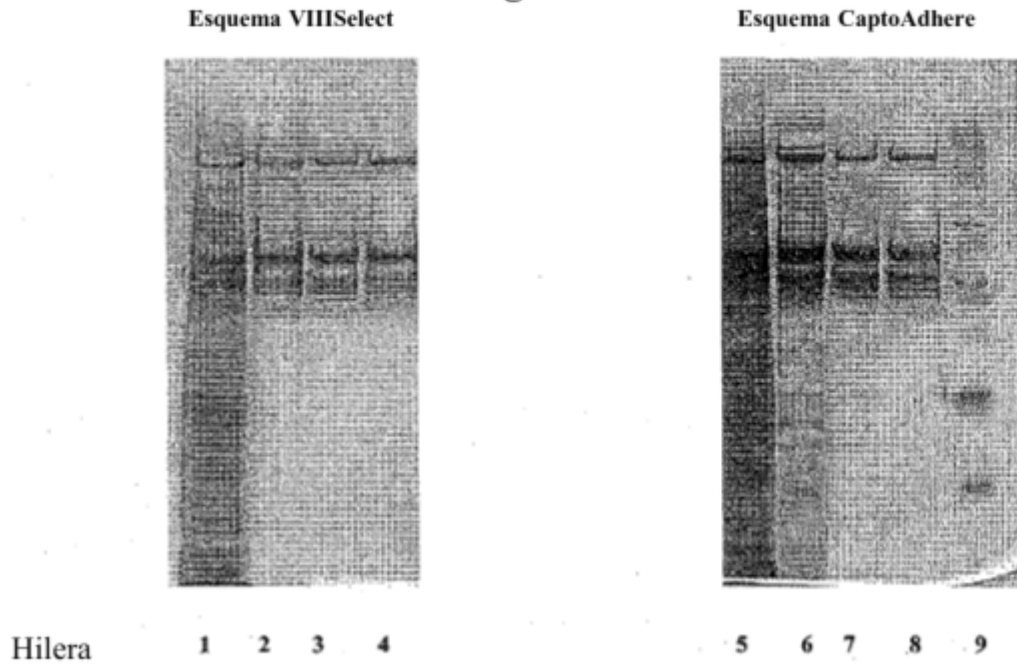


Figura 3

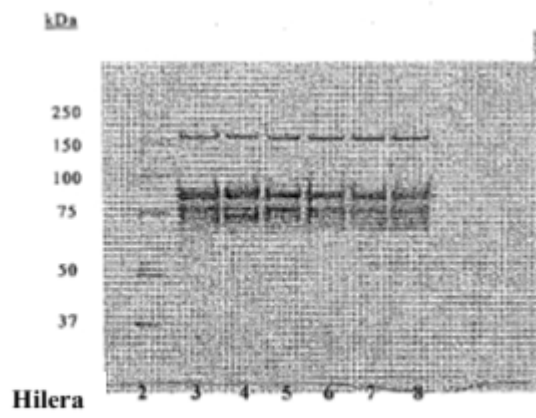


Figura 4

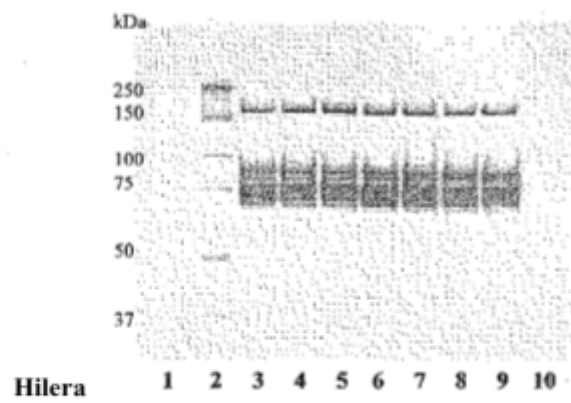


Figura 5

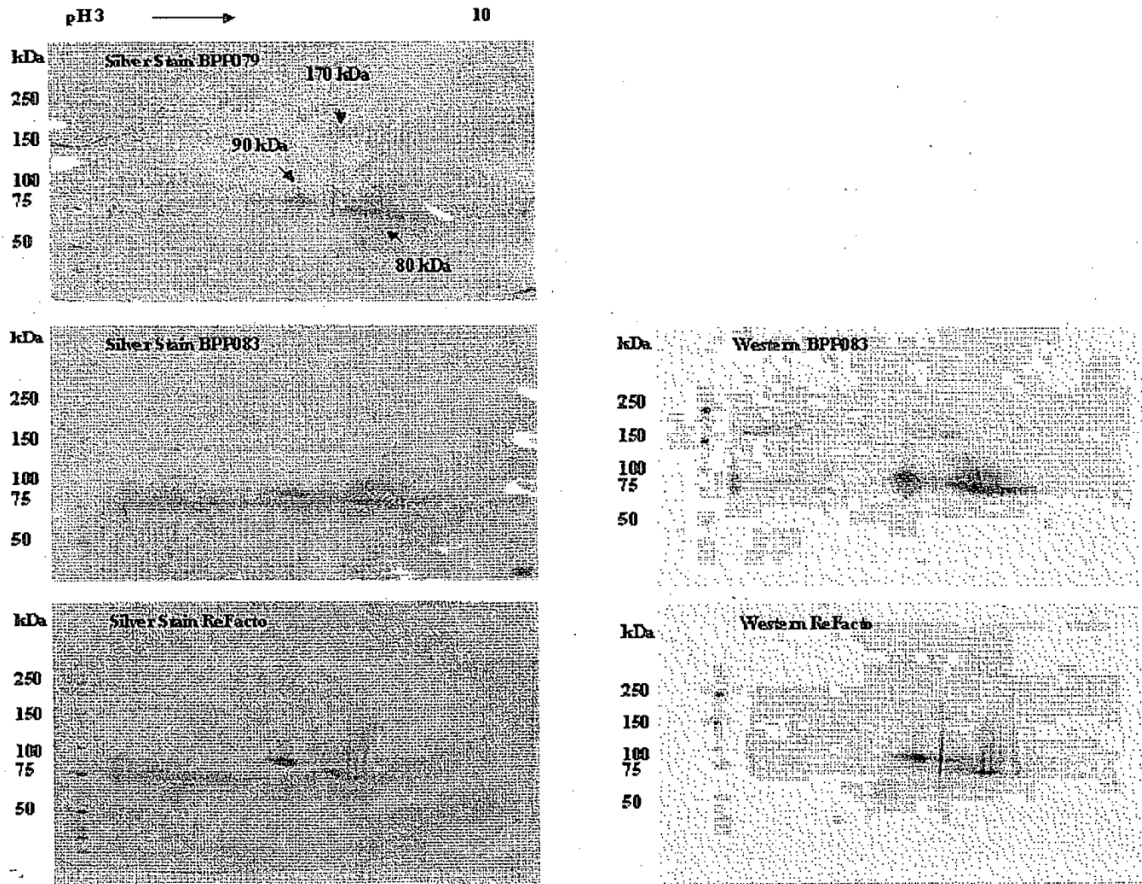


Figura 6

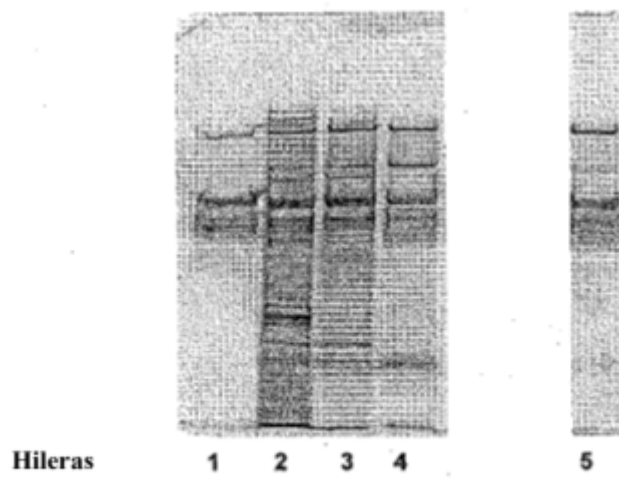


Figura 7

