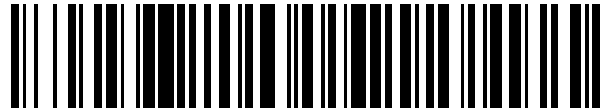


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 256**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10747134 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2467399**

54 Título: **Purificación de FVW para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica**

30 Prioridad:

**20.08.2009 US 235570 P**

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

**03.03.2016**

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)  
1200 Lakeside Drive  
Bannockburn, IL 60015, US y  
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MITTERER, ARTUR;  
HASSLACHER, MEINHARD y  
MAYER, CHRISTA**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 562 256 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 FVW para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud Provisional US nº 61/235.570, presentada el 20 de agosto de 2009.

#### CAMPO DE LA INVENCION

En general, la invención se refiere a métodos para purificar FVW para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El factor von Willebrand (FVW) es una glicoproteína circulante del plasma como una serie de multímeros cuyos tamaños oscilan entre aproximadamente 500 y 20.000 kD. Las formas multiméricas de FVW están compuestas por subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El FVW interviene en la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared vascular dañada. Únicamente los multímeros más grandes presentan actividad hemostática. Se supone que las células endoteliales segregan grandes formas poliméricas de FVW y que las formas del FVW de bajo peso molecular (FVW de bajo peso molecular) son el resultado de la disociación proteolítica. Los multímeros de alto peso molecular se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan en caso de estimulación.

15 El FVW es sintetizado por células endoteliales y megacariocitos como prepro-FVW, que consiste en gran medida en dominios repetidos. Después de la disociación del péptido señal, el pro-FVW se dimeriza a través de los enlaces disulfuro en su región C-terminal. Los dímeros sirven como promotores para la multimerización, que está controlada por enlaces disulfuro entre los extremos terminales libres. Después de la reunión en multímeros, se produce la eliminación proteolítica de la secuencia propeptídica (Leyte y col., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

20 El producto de traducción primario previsto del ADN clonado de FVW es un polipéptido precursor (prepro-FVW) de 2.813 residuos. El prepro-FVW consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, comprendiendo el FVW maduro 2.050 aminoácidos (Ruggeri Z. A., y Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)).

25 Los defectos en el FVW son causa de la enfermedad de von Willebrand (EVW), que se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La EVW de tipo 3 es la forma más grave, donde el FVW falta por completo, y la EVW de tipo 1 se refiere a una pérdida cuantitativa de FVW y su fenotipo puede ser muy leve. La EVW de tipo 2 se refiere a defectos cualitativos del FVW y puede ser tan grave como la EVW de tipo 3. La EVW de tipo 2 tiene muchas subformas, estando algunas de ellas asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. El síndrome de von Willebrand de tipo 2a (SVW-2A) se caracteriza por una pérdida tanto de multímeros intermedios como de multímeros grandes. El SVW-2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de mayor peso molecular. En la técnica se conocen otras enfermedades y afecciones relacionadas con el FVW.

30 La eliminación o inactivación de virus sin envoltura lipídica de soluciones proteínicas terapéuticas se lleva a cabo tradicionalmente con tratamientos por métodos físicos, como alta temperatura (por ejemplo calor seco, calor por vapor, pasteurización), irradiación con rayos de alta energía (por ejemplo rayos ultravioleta (UV) o radiación beta), pH bajo, nanofiltración, o por procedimientos cromatográficos, en particular cromatografía de afinidad. Sin embargo, estos tratamientos con frecuencia son ineficaces para purificar una proteína de alto peso molecular como el FVW, que no pasa a través de un nanofiltro y/o pierde su potencia o integridad molecular al tratarse con calor o radiación.

35 El documento US 6.465.624 B1 se refiere a un método para recuperar un factor de von Willebrand (FvW) purificado por cromatografía de intercambio catiónico. Cameron R y col., Biologicals (1997), vol. 25, nº 4, páginas 391-401, se refiere a la purificación de albúmina humana utilizando procedimientos cromatográficos de intercambio iónico. El capítulo 9 de "Protein Methods (2ª edición)" de Bollag DM y col., 1996, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY, describe métodos de purificación de proteínas utilizando cromatografía de intercambio iónico.

40 Las directrices reguladoras actuales piden a los fabricantes que aborden la cuestión de la reducción y/o inactivación tanto de virus de envoltura lipídica como de virus de envoltura no lipídica para productos farmacéuticos recombinantes. La ICH "Guideline on Viral Safety Evaluations of Biotechnology Products"

(Federal Register, 1998, 63(185): 51074- 51084) otorga flexibilidad a los fabricantes sobre cómo abordar las cuestiones de los virus teniendo en cuenta el tipo de producto, el proceso de producción y el riesgo de virus potencialmente contaminantes. Estas directrices señalan que el riesgo de contaminación viral es una característica común de todos los productos biotecnológicos derivados de líneas celulares. Esta contaminación podría tener graves consecuencias clínicas y puede resultar de la contaminación de las propias líneas celulares fuente (sustratos celulares) o de la introducción accidental de virus durante la producción.

Mientras que la inactivación de virus de envoltura lipídica se puede llevar a cabo con mucha eficacia siguiendo un método de tratamiento disolvente/detergente (S/D), la inactivación de virus modelo sin envoltura lipídica (*non-lipidvelopedviruses* - NLEV) puede resultar difícil debido a su pequeño tamaño y su estabilidad física.

Por consiguiente, en la técnica existe la necesidad de desarrollar métodos para inactivar o eliminar eficazmente virus sin envoltura lipídica durante la purificación de FVW.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método eficaz de purificación de FVW para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica. La presente invención proporciona un nuevo método de purificación de FVW para aumentar la eliminación de NLEV mediante la realización del paso de carga del producto y el paso de lavado del proceso de purificación a un pH alto.

Un método conocido en la técnica para purificar polipéptidos de NLEV implica el uso de la nanofiltración. El principio que subyace a la separación eficiente de proteína y virus utilizando nanofiltración aprovecha la diferencia de tamaño entre el polipéptido y el virus; una separación eficiente requiere que el polipéptido tenga un tamaño efectivo menor que el del virus, lo que permite que el polipéptido atraviese los poros del nanofiltro mientras que el virus queda retenido. Sin embargo, si el polipéptido y el virus tienen tamaños comparables entre sí, la separación resulta problemática ya que, o bien tanto el polipéptido como el virus atraviesan los poros del nanofiltro, o bien no pasa ninguno de los dos. Los métodos dados a conocer aquí superan este problema mediante el uso de una resina de intercambio catiónico en lugar de la nanofiltración, y la carga y/o el lavado de la resina a un pH lo suficientemente alto para separar el polipéptido del virus.

Sin estar limitados por la teoría, los métodos aquí descritos son útiles para aumentar la eliminación de NLEV de soluciones de polipéptido donde el polipéptido tiene un determinado tamaño y/o conformación. Un polipéptido con un tamaño suficientemente grande es probable que tenga características de carga localizada en el punto isoeléctrico del polipéptido o por encima del mismo, es decir, ciertas regiones del polipéptido pueden mantener cargas positivas o negativas localizadas, permitiendo así que el polipéptido se adsorba en la resina de la columna mientras el virus fluye a su través. Esta distribución irregular de la carga a lo largo de un polipéptido permite que éste permanezca unido a la resina a pesar de cargar y/o lavar la resina a un pH alto.

La invención proporciona un método según se define en las reivindicaciones para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que consiste en cargar una proteína de la solución sobre una resina de intercambio catiónico y lavar la resina con un tampón a un pH mayor que el punto isoeléctrico de la proteína para eluir el virus. En un aspecto, la proteína se carga sobre la resina en un tampón con un pH mayor que el del punto isoeléctrico de la proteína para eluir el virus. En otro aspecto, la proteína se carga sobre la resina en un tampón que no es el tampón utilizado en el paso de lavado, y la resina se lava a continuación con el tampón que tiene un pH mayor que un punto isoeléctrico de la proteína.

En una realización se proporciona un método para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína tal como se define en las reivindicaciones, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoeléctrico de la proteína, y lavar la resina de intercambio catiónico con un tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho tampón de lavado un pH igual o inferior al de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico.

En un aspecto, el pH de la solución es aproximadamente 1 unidad de pH mayor que el punto isoeléctrico de la proteína. En otros aspectos, el pH de la solución es de aproximadamente 1,1, o aproximadamente 1,2, o aproximadamente 1,3, o aproximadamente 1,4, o aproximadamente 1,5, o aproximadamente 1,6, o aproximadamente 1,7, o aproximadamente 1,8, o aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0, o aproximadamente 2,1, o aproximadamente 2,2, o aproximadamente 2,3, o aproximadamente 2,4, o aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2,6, o aproximadamente 2,7, o aproximadamente 2,8, o aproximadamente 2,9, o aproximadamente 3,0, o aproximadamente 3,1, o aproximadamente 3,2, o aproximadamente 3,3, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,5, o aproximadamente 3,6, o

- aproximadamente 3,7, o aproximadamente 3,8, o aproximadamente 3,9, o aproximadamente 4,0, o aproximadamente 4,1, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,3, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,5, o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,7, o aproximadamente 4,8, o aproximadamente 4,9, o aproximadamente 5,0, o aproximadamente 5,1, o aproximadamente 5,2, o
- 5 aproximadamente 5,3, o aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,5, o aproximadamente 5,6, o aproximadamente 5,7, o aproximadamente 5,8, o aproximadamente 5,9, o aproximadamente 6,0 o más unidades de pH, o más por encima del punto isoeléctrico de la proteína. En estas realizaciones, el pH es superior a aproximadamente 7. En un aspecto relacionado, el pH de la solución que contiene proteína es de aproximadamente 7,0. En otros aspectos, el pH de la solución que contiene proteína es de aproximadamente
- 10 7,1, o aproximadamente 7,2, o aproximadamente 7,3, o aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,7, o aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,1, o aproximadamente 8,2, o aproximadamente 8,3, o aproximadamente 8,4, o aproximadamente 8,5, o aproximadamente 8,6, o aproximadamente 8,7, o aproximadamente 8,8, o aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0, o aproximadamente 9,1, o
- 15 aproximadamente 9,2, o aproximadamente 9,3, o aproximadamente 9,4, o aproximadamente 9,5, o aproximadamente 9,6, o aproximadamente 9,7, o aproximadamente 9,8, o aproximadamente 9,9, o aproximadamente 10,0, o aproximadamente 10,1, o aproximadamente 10,2, o aproximadamente 10,3, o aproximadamente 10,4, o aproximadamente 10,5, o aproximadamente 10,6, o aproximadamente 10,7, o aproximadamente 10,8, o aproximadamente 10,9, o aproximadamente 11,0, o aproximadamente 11,1, o
- 20 aproximadamente 11,2, o aproximadamente 11,3, o aproximadamente 11,4, o aproximadamente 11,5, o aproximadamente 11,6, o aproximadamente 11,7, o aproximadamente 11,8, o aproximadamente 11,9, o aproximadamente 12,0, o aproximadamente 12,1, o aproximadamente 12,2, o aproximadamente 12,3, o aproximadamente 12,4, o aproximadamente 12,5, o aproximadamente 12,6, o aproximadamente 12,7, o aproximadamente 12,8, o aproximadamente 12,9, o aproximadamente 13,0 o superior.
- 25 En otra realización se proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico, lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico, y lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH
- 30 igual o inferior al del primer tampón de lavado.
- En un aspecto, el pH del primer tampón de lavado es aproximadamente 1 unidad de pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico. En otros aspectos, el pH del primer tampón de lavado es de aproximadamente 0,1, o aproximadamente 0,2, o aproximadamente 0,3, o aproximadamente 0,4, o aproximadamente 0,5, o aproximadamente 0,6, o aproximadamente 0,7, o aproximadamente 0,8, o
- 35 aproximadamente 0,9, o aproximadamente 1,1, o aproximadamente 1,2, o aproximadamente 1,3, o aproximadamente 1,4, o aproximadamente 1,5, o aproximadamente 1,6, o aproximadamente 1,7, o aproximadamente 1,8, o aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0, o aproximadamente 2,1, o aproximadamente 2,2, o aproximadamente 2,3, o aproximadamente 2,4, o aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2,6, o aproximadamente 2,7, o aproximadamente 2,8, o aproximadamente 2,9, o
- 40 aproximadamente 3,0, o aproximadamente 3,1, o aproximadamente 3,2, o aproximadamente 3,3, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,5, o aproximadamente 3,6, o aproximadamente 3,7, o aproximadamente 3,8, o aproximadamente 3,9, o aproximadamente 4,0, o aproximadamente 4,1, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,3, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,5, o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,7, o aproximadamente 4,8, o aproximadamente 4,9, o
- 45 aproximadamente 5,0, o aproximadamente 5,1, o aproximadamente 5,2, o aproximadamente 5,3, o aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,5, o aproximadamente 5,6, o aproximadamente 5,7, o aproximadamente 5,8, o aproximadamente 5,9, o aproximadamente 6,0, o aproximadamente 6,1, o aproximadamente 6,2, o aproximadamente 6,3, o aproximadamente 6,4, o aproximadamente 6,5, o aproximadamente 6,6, o aproximadamente 6,7, o aproximadamente 6,8, o aproximadamente 6,9, o
- 50 aproximadamente 7,0, o aproximadamente 7,1, o aproximadamente 7,2, o aproximadamente 7,3, o aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,7, o aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8 o aproximadamente 8,1, o aproximadamente 8,2, o aproximadamente 8,3, o aproximadamente 8,4, o aproximadamente 8,5, o aproximadamente 8,6, o aproximadamente 8,7, o aproximadamente 8,8, o aproximadamente 8,9, o
- 55 aproximadamente 9, o aproximadamente 9,1, o aproximadamente 9,2, o aproximadamente 9,3, o aproximadamente 9,4, o aproximadamente 9,5, o aproximadamente 9,6, o aproximadamente 9,7, o aproximadamente 9,8, o aproximadamente 9,9, o aproximadamente 10 o más unidades de pH, o más, por encima del punto isoeléctrico de la proteína. En estas realizaciones, el pH del primer tampón de lavado es superior a aproximadamente 7. En otros aspectos, el pH del primer tampón de lavado es de
- 60 aproximadamente 7,1, o aproximadamente 7,2 o aproximadamente 7,3, o aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,7, o aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,1, o aproximadamente 8,2, o

aproximadamente 8,3, o aproximadamente 8,4, o aproximadamente 8,5, o aproximadamente 8,6, o aproximadamente 8,7, o aproximadamente 8,8, o aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0, o aproximadamente 9,1, o aproximadamente 9,2, o aproximadamente 9,3, o aproximadamente 9,4, o aproximadamente 9,5, o aproximadamente 9,6, o aproximadamente 9,7, o aproximadamente 9,8, o 5 aproximadamente 9,9, o aproximadamente 10,0, o aproximadamente 10,1, o aproximadamente 10,2, o aproximadamente 10,3, o aproximadamente 10,4, o aproximadamente 10,5, o aproximadamente 10,6, o aproximadamente 10,7, o aproximadamente 10,8, o aproximadamente 10,9, o aproximadamente 11,0 o superior.

10 En una realización, la proteína de la solución es un polipéptido que tiene una masa molecular de al menos aproximadamente 175 kilodaltons, o aproximadamente 180 kilodaltons, o aproximadamente 190 kilodaltons, o aproximadamente 200 kilodaltons, o aproximadamente 210 kilodaltons, o aproximadamente 220 kilodaltons, o aproximadamente 230 kilodaltons, o aproximadamente 240 kilodaltons, o aproximadamente 250 kilodaltons, o aproximadamente 260 kilodaltons, o aproximadamente 270 kilodaltons, o aproximadamente 280 kilodaltons, o aproximadamente 290 kilodaltons, o aproximadamente 300 kilodaltons, o aproximadamente 310 kilodaltons, 15 aproximadamente 320 kilodaltons, o aproximadamente 330 kilodaltons, o aproximadamente 340 kilodaltons, o aproximadamente 350 kilodaltons, o aproximadamente 360 kilodaltons, o aproximadamente 370 kilodaltons, o aproximadamente 380 kilodaltons, o aproximadamente 390 kilodaltons, o aproximadamente 400 kilodaltons, o aproximadamente 410 kilodaltons, o aproximadamente 420 kilodaltons, o aproximadamente 430 kilodaltons, o aproximadamente 440 kilodaltons, o aproximadamente 450 kilodaltons, o aproximadamente 460 kilodaltons, o 20 aproximadamente 470 kilodaltons, o aproximadamente 480 kilodaltons, o aproximadamente 490 kilodaltons, o aproximadamente 500 kilodaltons o más. Tal como se describen aquí, los polipéptidos también comprenden estructuras multiméricas y dichas estructuras multiméricas, en diversos aspectos, tienen una masa molecular de al menos aproximadamente 500 kilodaltons. En aspectos relacionados, las estructuras multiméricas tienen una masa molecular de al menos aproximadamente 510, o aproximadamente 520, o aproximadamente 530, o 25 aproximadamente 540, o aproximadamente 550, o aproximadamente 560, o aproximadamente 570, o aproximadamente 580, o aproximadamente 590, o aproximadamente 600, o aproximadamente 610, o aproximadamente 620, o aproximadamente 630, o aproximadamente 640, o aproximadamente 650, o aproximadamente 660, o aproximadamente 670, o aproximadamente 680, o aproximadamente 690, o aproximadamente 700, o aproximadamente 710, o aproximadamente 720, o aproximadamente 730, o 30 aproximadamente 740, o aproximadamente 750, o aproximadamente 760, o aproximadamente 770, o aproximadamente 780, o aproximadamente 790, o aproximadamente 800, o aproximadamente 810, o aproximadamente 820, o aproximadamente 830, o aproximadamente 840, o aproximadamente 850, o aproximadamente 860, o aproximadamente 870, o aproximadamente 880, o aproximadamente 890, o aproximadamente 900, o aproximadamente 910, o aproximadamente 920, o aproximadamente 930, o 35 aproximadamente 940, o aproximadamente 950, o aproximadamente 960, o aproximadamente 970, o aproximadamente 980, o aproximadamente 990 kilodaltons, o aproximadamente 1 megadalton, o aproximadamente 1,1 megadaltons, o aproximadamente 1,2 megadaltons, o aproximadamente 1,3 megadaltons, o aproximadamente 1,4 megadaltons, o aproximadamente 1,5 megadaltons, o aproximadamente 1,6 megadaltons, o aproximadamente 1,7 megadaltons, o aproximadamente 1,8 40 megadaltons, o aproximadamente 1,9 megadaltons, o aproximadamente 2,0 megadaltons, o aproximadamente 2,1 megadaltons, o aproximadamente 2,2 megadaltons, o aproximadamente 2,3 megadaltons, o aproximadamente 2,4 megadaltons, o aproximadamente 2,5 megadaltons, o aproximadamente 2,6 megadaltons, o aproximadamente 2,7 megadaltons, o aproximadamente 2,8 megadaltons, o aproximadamente 2,9 megadaltons, o aproximadamente 3,0 megadaltons, o 45 aproximadamente 3,1 megadaltons, o aproximadamente 3,2 megadaltons, o aproximadamente 3,3 megadaltons, o aproximadamente 3,4 megadaltons, o aproximadamente 3,5 megadaltons, o aproximadamente 3,6 megadaltons, o aproximadamente 3,7 megadaltons, o aproximadamente 3,8 megadaltons, o aproximadamente 3,9 megadaltons, o aproximadamente 4,0 megadaltons, o aproximadamente 4,1 megadaltons, o aproximadamente 4,2 megadaltons, o aproximadamente 4,3 50 megadaltons, o aproximadamente 4,4 megadaltons, o aproximadamente 4,5 megadaltons, o aproximadamente 4,6 megadaltons, o aproximadamente 4,7 megadaltons, o aproximadamente 4,8 megadaltons, o aproximadamente 4,9 megadaltons, o aproximadamente 5,0 megadaltons o más.

55 En algunas realizaciones, la resina de intercambio catiónico tiene un grupo cargado negativamente seleccionado de entre el grupo consistente en carboximetilo (CM), sulfoalquilo (SP, SE), sulfato y metilsulfonato (S), así como cualquier otro ligando cargado negativamente.

En otra realización, la proteína es una proteína de coagulación sanguínea. En diversos aspectos, la proteína de coagulación sanguínea se selecciona de entre el grupo consistente en factor VIII, factor von Willebrand, FI (fibrinógeno), FV (proacelerina), FXI (antecedente de tromboplastina plasmático) y FXIII (factor estabilizador de la fibrina).

5 En una realización se proporciona un método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene factor von Willebrand (FVW) tal como se define en las reivindicaciones, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoeléctrico del FVW y lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer tampón de lavado un pH igual o inferior al de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico.

10 En otra realización se proporciona un método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene FVW tal como se define en las reivindicaciones, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico, lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico, y lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado.

15 En otra realización se proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene FVW, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoeléctrico del FVW y lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el punto isoeléctrico de la proteína aplicada a la resina de intercambio catiónico; y lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1: muestra el resultado de una separación SDS-PAGE seguida de tinción con plata (A) y análisis Western Blot (B) para el FVW residual.  
 Figura 2: muestra el gel teñido de las pasadas UNO S con muestras con adición de virus MMV y REO.  
 Figura 3: muestra el gel teñido de las pasadas UNO S con muestras con adición de virus MMV y REO.  
 25 Figura 4: muestra los resultados obtenidos al someter las preparaciones de FVWr purificadas obtenidas mediante las variantes de proceso a digestión proteolítica por V8 proteasa en estado nativo y separar los péptidos resultantes mediante RP-HPLC.  
 Figura 5: muestra los resultados obtenidos al someter las preparaciones de FVWr purificadas obtenidas mediante las variantes de proceso a tripsina en estado desnaturalizado y separar los péptidos resultantes por RP-HPLC.

#### 30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos de purificación de FVW para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica. Los métodos de la invención son aplicables tanto en columna (es decir, cromatografía) como en modo por lotes (es decir, sin equipo de columna).

35 El método de la presente invención emplea un método de purificación sobre una resina de intercambio catiónico para aumentar la eliminación de virus sin envoltura lipídica. Los métodos previos de purificación de FVW utilizando cromatografía de intercambio catiónico se realizaban con pH neutro. Estos métodos posibilitaban la producción de FVW purificado con buen rendimiento y pureza, pero sorprendentemente el proceso no tenía capacidad para eliminar virus sin envoltura lipídica.

#### Definición de términos

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan aquí tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton y col., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ª ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 45 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5ª ed., R. Rieger y col.(eds.), Editorial Springer (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

Se señala que, tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

50 Tal como se utilizan aquí, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a no ser que se especifique otra cosa.

Tal como se utilizan aquí, los términos "expresar", "que expresa" y "expresión" significan permitir o hacer que la información incluida en un gen o secuencia de ADN se ponga de manifiesto, por ejemplo produciendo una

5 proteína mediante la activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en una célula o es expresada por una célula para formar un "producto de expresión", como una proteína. También se puede decir que el propio producto de expresión, por ejemplo la proteína resultante, está "expresado". Un producto de expresión se puede caracterizar como intracelular, extracelular o segregado. El término "intracelular" significa dentro de una célula. El término "extracelular" significa fuera de una célula, por ejemplo determinados tipos de proteínas transmembrana. Una sustancia es "segregada" por una célula si aparece en una medida significativa fuera de la célula, procedente de algún lugar sobre la célula o dentro de la misma.

10 Tal como se utiliza aquí, el término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos aminoácidos, variantes estructurales, variantes estructurales naturales relacionadas, y análogos sintéticos no naturales de los mismos unidos por enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se pueden preparar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de polipéptidos automático. El término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos cortos. El término "polipéptido" también incluye estructuras poliméricas. Por tanto, un polipéptido puede ser un monómero, un dímero, un trímero o una estructura multimérica mayor. Estas estructuras multiméricas pueden tener una masa molecular de hasta 5 megadaltons o más.

Tal como se utiliza aquí, el "punto isoeléctrico" es el valor pH al que la carga eléctrica neta de un polipéptido en una solución acuosa es cero.

20 Tal como se utiliza aquí, un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier parte de un polipéptido o proteína menor que el producto de expresión del polipéptido o proteína de longitud completa.

25 Tal como se utiliza aquí, un "análogo" se refiere a cualquiera de dos o más polipéptidos que presentan una estructura esencialmente similar y tienen la misma actividad biológica, pero que pueden tener grados de actividad variables en relación con la molécula completa o con un fragmento de la misma. Los análogos se diferencian en la composición de sus secuencias de aminoácidos en base a una o más mutaciones que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas, en función del grado de parecido fisicoquímico o funcional del aminoácido sustituido por el aminoácido que lo sustituye.

30 Tal como se utiliza aquí, una "variante" se refiere a un polipéptido, una proteína o análogo de éstos que está modificado para que incluya fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Estas fracciones pueden modular la solubilidad, absorción, vida media biológica, etc. de la molécula. Alternativamente, las fracciones pueden reducir la toxicidad de la molécula y eliminar o mitigar efectos secundarios no deseables de la molécula, etc. En Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) se describen fracciones que pueden producir estos efectos. Los procedimientos para acoplar estas fracciones con una molécula son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede consistir en un factor de coagulación sanguínea que presenta una modificación química que confiere una vida media más larga *in vivo* a la proteína. En diversos aspectos, los polipéptidos se modifican por glicosilación, pegilación y/o polisialilación.

**FVW recombinante**

40 El polinucleótido y las secuencias de aminoácidos del prepro-FVW se muestran en SEQ ID N°: 1 y SEQ ID N°: 2, respectivamente, y están disponibles en GenBank con los números de acceso NM\_000552 y NP\_000543, respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína de FVW madura se muestra en SEQ ID N°: 3 (correspondiente a los aminoácidos 764-2813 de la secuencia de aminoácidos del prepro-FVW de longitud completa).

45 Una forma útil de FVWr tiene al menos la propiedad de estabilizar *in vivo*, por ejemplo unir, al menos una molécula de factor VIII (FVIII), y de tener opcionalmente un patrón de glicosilación farmacológicamente aceptable. Ejemplos específicos incluyen FVW sin dominio A2 y en consecuencia resistente a la proteólisis (Lankhofy col., Thromb. Haemost. 77: 1008- 1013, 1997), y el fragmento de FVW de Val 449 a Asn 730 que incluye el dominio de unión de glicoproteína Ib y sitios de unión para colágeno y heparina (Pietu y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 1339-1347, 1989). La determinación de la capacidad de un FVW para estabilizar al menos una molécula de FVIII se puede llevar a cabo en mamíferos con deficiencia de FVW de acuerdo con métodos conocidos en la técnica actual.

50 El FVWr de la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. En el documento WO86/06096, publicado el 23 de octubre de 1986, y en la Solicitud de Patente US n° 07/559.509, presentada el 23 de julio de 1990, se describe un ejemplo específico. Por consiguiente, en la técnica actual se conocen métodos para (i) producir ADN recombinante por ingeniería genética, por ejemplo por

transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas por transfección, por ejemplo electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo de forma continua o por lotes, (iv) expresar FVW, por ejemplo de forma constitutiva o tras inducción, y (v) aislar dicho FVW, por ejemplo del medio de cultivo o cosechando las células transformadas, para (vi) obtener FVW<sub>r</sub> purificado, por ejemplo por cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. Un FVW recombinante se puede producir en células huésped transformadas utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica actual. Por ejemplo, en el ADN se podrían eliminar secuencias codificadoras del polipéptido utilizando enzimas de restricción adecuadas.

10 Alternativamente, la molécula de ADN se podría sintetizar utilizando técnicas de síntesis química, como el método de fosforamido. También sería posible utilizar una combinación de estas técnicas.

La invención también proporciona vectores que codifican polipéptidos de la invención en un huésped apropiado. El vector comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido unido funcionalmente con secuencias de control de expresión. Los métodos para realizar esta unión funcional, antes o después de la inserción del polinucleótido en el vector, son bien conocidas. Las secuencias de control de expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómicos, señales de inicio, señales de parada, señales de terminación, señales de poliadenilación, y otras señales implicadas en el control de transcripción o traducción. El vector resultante que incluye el polinucleótido se utiliza para transformar un huésped apropiado. Esta transformación se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica.

20 En la práctica de esta invención se puede utilizar cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y conocidas. La selección de un huésped particular depende de diversos factores reconocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la velocidad de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, las características de expresión, la bioseguridad y los costes. Es necesario encontrar un equilibrio entre estos factores sabiendo que no todas las células huésped son igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas directrices generales, las células huésped microbianas útiles incluyen bacterias, levaduras y otros hongos, insectos, plantas, células de mamífero (incluyendo el ser humano) en cultivo, u otros huéspedes conocidos en la técnica.

30 A continuación, el huésped transformado se cultiva y purifica. Las células huésped se pueden cultivar bajo condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen los compuestos deseados. Estas condiciones de fermentación son conocidas en la técnica. Por último, los polipéptidos del cultivo se purifican por métodos conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar un compuesto de la invención, puede resultar conveniente unir grupos carbohidrato (oligosacárido) a sitios conocidos por ser sitios de glicosilación en proteínas. En general, los oligosacáridos con enlace O se unen a residuos serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que los oligosacáridos con enlace N se unen a residuos asparagina (Asn) cuando forman parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Preferentemente, X es uno de los 19 aminoácidos naturales sin contar la prolina. Las estructuras de oligosacáridos con enlace N y con enlace O y los residuos de azúcar hallados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se halla comúnmente en ambos es el ácido N-actilneuramínico (denominado ácido siálico). Normalmente, el ácido siálico es el residuo tanto de los oligosacáridos con enlace N como de los oligosacáridos con enlace O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Este o estos sitios se pueden incorporar en el engarce de los compuestos de esta invención y preferentemente se glicosilan mediante una célula durante la producción recombinante de los compuestos de polipéptido (por ejemplo en células de mamífero tales como CHO, BHK, COS). No obstante, estos sitios se pueden glicosilar adicionalmente mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

Alternativamente, los compuestos se pueden preparar por métodos sintéticos. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de síntesis en fase sólida. En la técnica se conocen métodos adecuados, incluyendo los descritos en Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis y col. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; Patente US nº 3.941.763; Finn y col. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson y col. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferente para preparar péptidos individuales, ya que es el método con la mejor relación coste-eficacia para producir péptidos pequeños.

#### 55 **Fragmentos, variantes y análogos de FVW**

En la técnica se conocen bien métodos para preparar fragmentos, variantes o análogos de polipéptidos.



- Los fragmentos de un polipéptido se preparan utilizando, sin limitación, disociación enzimática (por ejemplo tripsina, quimotripsina) y también utilizando medios recombinantes para generar un fragmento de polipéptido con una secuencia de aminoácidos específica. Es posible generar fragmentos de polipéptido que incluyen una región de la proteína con una actividad particular, tal como un dominio de multimerización o cualquier otro dominio de FVW identificable conocido en la técnica.
- 5
- Aquí se prevén variantes de un polipéptido que incluyen formas humanas y no humanas de FVW (por ejemplo FVW murino). Los métodos aquí descritos también prevén el uso de polipéptidos quiméricos, por ejemplo un polipéptido de fusión ratón/humano.
- También se conocen métodos para preparar análogos de polipéptidos. Los análogos de secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, inserción, adición o delección. Los análogos de delección, incluyendo fragmentos de un polipéptido, carecen de uno o más residuos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o la actividad inmunógena. Los análogos de inserción implican la adición, por ejemplo de aminoácido(s), en un punto no terminal del polipéptido. Este análogo puede incluir la inserción de un epítopo inmunorreactivo o simplemente un residuo simple. Los análogos de adición, incluyendo fragmentos de un polipéptido, incluyen la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los dos terminales de una proteína y comprenden, por ejemplo, proteínas de fusión.
- 10
- 15
- Los análogos de sustitución normalmente intercambian un aminoácido de tipo salvaje por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido sin perder otras funciones o propiedades. En un aspecto, las sustituciones son sustituciones conservativas. La expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" significa la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que presenta una cadena lateral con un carácter químico similar. Los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservativas incluyen aquellos que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral hidrófoba alifática (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral de hidroxilo alifático (serina, treonina).
- 20
- 25
- Los análogos pueden ser esencialmente homólogos o esencialmente idénticos al FVW recombinante del que se derivan. Algunos análogos preferentes son aquellos que conservan al menos parte de la actividad biológica del polipéptido de tipo salvaje, por ejemplo la actividad de coagulación sanguínea.
- 30
- Las variantes de polipéptido previstas incluyen polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, incluyendo polisialilación, conjugación con agentes terapéuticos o diagnósticos, marcado, unión polimérica covalente como pegilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables, e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no están presentes en proteínas humanas. Las variantes conservan las mismas o esencialmente las mismas propiedades de unión de las moléculas de la invención no modificadas. Esta modificación química puede incluir unión directa o indirecta (por ejemplo a través de un engarce) de un agente al polipéptido de FVW. En caso de una unión indirecta está prevista la posibilidad de que el engarce sea hidrolizable o no hidrolizable.
- 35
- En general, la preparación de análogos de polipéptido pegilados comprenderá los pasos de (a) someter a reacción el polipéptido con polietilenglicol (como un derivado estérico o aldehídico reactivo de PEG) bajo condiciones en las que el polipéptido de construcción de unión se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en base a parámetros conocidos y del resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la relación PEG:proteína, mayor es el porcentaje de producto polipegilado. En algunas realizaciones, el constructo de unión tendrá una sola fracción PEG en el extremo N-terminal. Al factor de coagulación sanguínea se le puede añadir polietilenglicol (PEG) para lograr una vida media *in vivo* más larga. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG oscila entre aproximadamente 2 kilodaltons ("kDa") y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, o entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se unen al factor de coagulación sanguínea mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o artificial en la fracción PEG (por ejemplo un grupo aldehído, amino, tiol o éster) a un grupo reactivo en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo un grupo aldehído, amino o éster) o mediante cualquier otra técnica conocida.
- 40
- 45
- 50
- En la Publicación de Patente de Estados Unidos 20060160948, Fernandes y Gregoriadis; Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997, y Saenko y col., Haemophilia 12:42-51, 2006, se describen métodos para preparar polipéptido polisialilado. En resumen, una solución de ácido colomínico que contiene NaIO<sub>4</sub> 0,1M se agita en oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el AC. La solución de AC activada se dializa, por ejemplo
- 55

5 contra tampón de fosfato de sodio 0,05M, pH 7,2, en oscuridad, y esta solución se añade a una solución de FVWr y se incuba durante 18 horas a temperatura ambiente en oscuridad bajo agitación suave. Después, los reactivos libres se pueden separar del conjugado de FVWr-ácido polisialícopor ultrafiltración/diafiltración. La conjugación de FVWr con ácido polisialícico también se puede lograr utilizando glutaraldehído como reactivo reticulante (Migneault y col., *Biotechniques* 37: 790-796, 2004).

10 También está previsto que un polipéptido de la invención pueda ser en una proteína de fusión con un segundo agente que es un polipéptido. En una realización, el segundo agente que es un polipéptido es, sin limitación, una enzima, un factor de crecimiento, un anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, un receptor de superficie celular, el dominio extracelular de un receptor de superficie celular, una molécula de adhesión celular, o un fragmento o un dominio activo de una proteína arriba descrita. En una realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguínea, como factor VIII, factor VII, factor IX. La proteína de fusión prevista se prepara mediante técnicas químicas o recombinantes conocidas en la técnica actual.

15 También está previsto que los polipéptidos de prepro-FVW y pro-FVW puedan proporcionar un beneficio terapéutico en las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, la Patente US nº 7.005.502 describe una preparación farmacéutica que comprende cantidades esenciales de pro-FVW que inducen generación de trombina en presencia de plaquetas *in vitro*. Además de fragmentos, variantes o análogos recombinantes biológicamente activos del FVW natural, la presente invención prevé el uso de fragmentos, variantes o análogos recombinantes biológicamente activos de los polipéptidos prepro-FVW (mostrado en SEQ ID Nº: 2) o polipéptidos pro-FVW (residuos aminoácidos 23 a 764 de SEQ ID Nº: 2) en las formulaciones aquí descritas.

20 Los polinucleótidos que codifican fragmentos, variantes y análogos pueden ser generados fácilmente por un trabajador cualificado para codificar fragmentos, variantes o análogos biológicamente activos de la molécula natural que tienen una actividad biológica igual o similar a la de la molécula natural. Estos polinucleótidos se pueden preparar utilizando técnicas de RCP, digestión/ligación de moléculas codificadoras de ADN, y similares. Por tanto, un experto en la técnica podrá generar cambios de bases simples en la cadena de ADN para obtener un codón alterado y una mutación sin sentido invertida, utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, de forma no exclusiva, mutagénesis específica de sitio. Tal como se utiliza aquí, la frase "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" significa, por ejemplo, hibridación a 42°C en formamida al 50% y lavado a 60°C en 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Los expertos en la técnica entenderán que una variación de estas condiciones se produce según la longitud y el contenido base de nucleótidos GC de las secuencias a hibridar. Las fórmulas estándar en la técnica son apropiadas para determinar las condiciones de hibridación exactas. Véase Sambrook y col., 9.47-9.51 en *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

#### **Métodos para producir FVW**

35 Industrialmente, el FVWm, en particular el FVW recombinante (FVWr) humano se sintetiza y expresa junto con FVIIIr en una línea celular de CHO sometida a ingeniería genética. La función del FVWrcoexpresado es estabilizar el FVIIIr en el proceso de cultivo celular. El FVWr se sintetiza en la célula como forma "pro", que contiene un propéptido grande unido al extremo N-terminal. Después de su maduración en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, el propéptido se disocia por la acción de la proteasa furina celular y se segrega como un homopolímero de subunidades idénticas, consistentes en dímeros de la proteína expresada.

#### **Purificación de FVW**

45 Aquí se proporciona un método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína tal como se define en las reivindicaciones, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína, y lavar la resina de intercambio catiónico con un tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho tampón de lavado un pH igual o inferior al de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico.

50 En un aspecto, el pH de la solución es aproximadamente 1 unidad de pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína. En otros aspectos, el pH de la solución es de aproximadamente 1,2, o aproximadamente 1,4, o aproximadamente 1,6, o aproximadamente 1,8, o aproximadamente 2,0, o aproximadamente 2,2, o aproximadamente 2,4, o aproximadamente 2,6, o aproximadamente 2,8, o aproximadamente 3,0, o aproximadamente 3,2, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,6, o aproximadamente 3,8, o aproximadamente 4,0, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,8, o aproximadamente 5,0, o aproximadamente 5,5, o aproximadamente 6,0 o más unidades de pH por encima del punto isoelectrico de la proteína.

En estas realizaciones, el pH es superior a aproximadamente 7. En otros aspectos, el pH es de aproximadamente 7,1, o aproximadamente 7,2, o aproximadamente 7,3, o aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,7, o aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,1, o aproximadamente 8,2, o 5 aproximadamente 8,3, o aproximadamente 8,4, o aproximadamente 8,5, o aproximadamente 8,6, o aproximadamente 8,7, o aproximadamente 8,8, o aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0, o aproximadamente 9,1, o aproximadamente 9,2, o aproximadamente 9,3, o aproximadamente 9,4, o aproximadamente 9,5, o aproximadamente 9,6, o aproximadamente 9,7, o aproximadamente 9,8, o 10 aproximadamente 9,9, o aproximadamente 10,0, o aproximadamente 10,1, o aproximadamente 10,2, o aproximadamente 10,3, o aproximadamente 10,4, o aproximadamente 10,5, o aproximadamente 10,6, o aproximadamente 10,7, o aproximadamente 10,8, o aproximadamente 10,9, o aproximadamente 11,0, o aproximadamente 11,1, o aproximadamente 11,2, o aproximadamente 11,3, o aproximadamente 11,4, o aproximadamente 11,5, o aproximadamente 11,6, o aproximadamente 11,7, o aproximadamente 11,8, o aproximadamente 11,9, o aproximadamente 12,0, o aproximadamente 12,1, o aproximadamente 12,2, o 15 aproximadamente 12,3, o aproximadamente 12,4, o aproximadamente 12,5, o aproximadamente 12,6, o aproximadamente 12,7, o aproximadamente 12,8, o aproximadamente 12,9, o aproximadamente 13,0 o superior.

En otra realización se proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que consiste en aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico, lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico, y lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho segundo tampón de lavado un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado. En un aspecto, el pH del primer tampón de lavado es aproximadamente 1 unidad de pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico. Para esta etapa está previsto que el medio de intercambio iónico sea UNOsphere™ S (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA), pero en la práctica de estos métodos también se pueden utilizar otros sistemas de intercambio catiónico. Estos sistemas de intercambio catiónico son conocidos por los expertos en la técnica.

En otros aspectos, el pH del primer tampón de lavado es de aproximadamente 1,1, o aproximadamente 1,2, o 30 aproximadamente 1,3, o aproximadamente 1,4, o aproximadamente 1,5, o aproximadamente 1,6, o aproximadamente 1,7, o aproximadamente 1,8, o aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0, o aproximadamente 2,1, o aproximadamente 2,2, o aproximadamente 2,3, o aproximadamente 2,4, o aproximadamente 2,5, o aproximadamente 2,6, o aproximadamente 2,7, o aproximadamente 2,8, o aproximadamente 2,9, o aproximadamente 3,0, o aproximadamente 3,1, o aproximadamente 3,2, o 35 aproximadamente 3,3, o aproximadamente 3,4, o aproximadamente 3,5, o aproximadamente 3,6, o aproximadamente 3,7, o aproximadamente 3,8, o aproximadamente 3,9, o aproximadamente 4,0, o aproximadamente 4,1, o aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,3, o aproximadamente 4,4, o aproximadamente 4,5, o aproximadamente 4,6, o aproximadamente 4,7, o aproximadamente 4,8, o aproximadamente 4,9, o aproximadamente 5,0, o aproximadamente 5,1, o aproximadamente 5,2, o 40 aproximadamente 5,3, o aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,5, o aproximadamente 5,6, o aproximadamente 5,7, o aproximadamente 5,8, o aproximadamente 5,9, o aproximadamente 6,0 o más unidades de pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína. En estas realizaciones, el pH del primer tampón de lavado es superior a aproximadamente 7. En otros aspectos, el pH del primer tampón de lavado es de aproximadamente 7,1, o aproximadamente 7,2, o aproximadamente 7,3, o aproximadamente 7,4, o 45 aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7,6, o aproximadamente 7,7, o aproximadamente 7,8, o aproximadamente 7,9, o aproximadamente 8,0, o aproximadamente 8,1, o aproximadamente 8,2, o aproximadamente 8,3, o aproximadamente 8,4, o aproximadamente 8,5, o aproximadamente 8,6, o aproximadamente 8,7, o aproximadamente 8,8, o aproximadamente 8,9, o aproximadamente 9,0, o aproximadamente 9,1, o aproximadamente 9,2, o aproximadamente 9,3, o aproximadamente 9,4, o 50 aproximadamente 9,5, o aproximadamente 9,6, o aproximadamente 9,7, o aproximadamente 9,8, o aproximadamente 9,9, o aproximadamente 10,0, o aproximadamente 10,1, o aproximadamente 10,2, o aproximadamente 10,3, o aproximadamente 10,4, o aproximadamente 10,5, o aproximadamente 10,6, o aproximadamente 10,7, o aproximadamente 10,8, o aproximadamente 10,9, o aproximadamente 11,0, o aproximadamente 11,1, o aproximadamente 11,2, o aproximadamente 11,3, o aproximadamente 11,4, o 55 aproximadamente 11,5, o aproximadamente 11,6, o aproximadamente 11,7, o aproximadamente 11,8, o aproximadamente 11,9, o aproximadamente 12,0, o aproximadamente 12,1, o aproximadamente 12,2, o aproximadamente 12,3, o aproximadamente 12,4, o aproximadamente 12,5, o aproximadamente 12,6, o aproximadamente 12,7, o aproximadamente 12,8, o aproximadamente 12,9, o aproximadamente 13,0 o superior.

60 Los siguientes ejemplos no están concebidos como ejemplos limitativos, sino que simplemente ilustran realizaciones específicas de la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Los virus y células utilizados en los ensayos abajo descritos son los siguientes:

5 REO-3 (Familia Reoviridae; virus de ARNds sin envoltura lipídica), Cepa Dearing (ATCC VR-824) se obtuvo de la ATCC. El virus se propagó y tituló en células Vero obtenidas de ECACC (84113001). MMV (Familia Parvoviridae; virus de ADNss sin envoltura lipídica), la cepa prototipo (ATCC VR-1346), se obtuvo de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. El virus se propagó y tituló en células A9 (ATCC CCL-1 .4). PPV (Familia Parvoviridae; virus de ADNss sin envoltura lipídica), cepa Tennessee (BRFF #PP951024), se obtuvo de Biological Research Faculty & Facility, Ijamsville, Maryland. El virus se propagó y tituló en células PK-13 (ATCC CRL-6489). EMCV (Familia Picornaviridae; ARNss sin envoltura) (ATCC #VR-129B) se obtuvo de la American Type Culture Collection. El virus se propagó y tituló en células Vero (European Collection of Cell Cultures, ECACC, #84113001). HadV (Familia Adenoviridae; ADNds sin envoltura), cepa Adenoid 75 (ATCC VR-5), se obtuvo de la American Type Culture Collection. El virus se propagó y tituló en células HeLa (ATCC CCL-2).

15 Los pasos incluidos en un ejemplo de proceso de purificación de FVW comprenden:

- Cromatografía de inmunoafinidad de sobrenadante de cultivo celular.
  - i. Fracción de circulación.
- Intercambio aniónico (por ejemplo columna de intercambio aniónico de trimetilaminoetilo).
- Filtración (0,45/0,2 µm).

20

- Intercambio aniónico (por ejemplo Mustang Q (PallCorporation)).
- Inactivación viral (por ejemplo por tratamiento disolvente/detergente).
- Filtración (0,8/0,65 µm).
- Intercambio catiónico (por ejemplo columna UNO S).
- Ultrafiltración/concentración.

25

- Filtración (0,45/0,2 µm).
- Filtración por gel (Superose 6, grado prep (GE LifeSciences)).

30 **Optimización del paso de UNO S.** Durante el paso de UNO S, el FVWr se une a una resina de intercambio catiónico fuerte mientras algunas de las impurezas atraviesan la columna. Después de lavar la columna con tampones de conductividad elevada, el FVWr unido se libera de la columna con un paso de sal. Durante los estudios iniciales de eliminación viral, este paso mostraba al menos una tasa de eliminación significativa del modelo de virus REO. Las condiciones de los parámetros aplicados y los resultados correspondientes se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1**

Parámetro	Valor estándar	Valor cambiado	Factor de reducción MMV (log10)
Conductividad carga / lavado	15 mS/cm	25 mS/cm	n.a.
pH carga / lavado / elución	6,5	8,0	0,9
Tampón de lavado 2	TQA quemado*	Tampón TQA con betaína 200 mM	0,7
Tampón de lavado 3	Tampón TQA	Tampón TQA con 20% etilenglicol	
Tampón de lavado 4	Tampón TQA	Tampón TQA con CaCl <sub>2</sub> 10 mM	0,8
Tampón de lavado 5	Tampón TQA	Tampón TQA con EDTA 10 mM	
pH carga / lavado	6,5	9,0	2,0, 2,11, 2,12 y 2,12
pH carga / lavado	6,5	9,0	2,12 para virus REO
*Tampón TQA: Tris, NaAc, NaCl mM en WFI; pH 6,3 - 6,7 a 20 - 25°C			

35

Tal como se puede ver en la Tabla 1, los cambios moderados en los parámetros de proceso (modificación de conductividad, pH 8,0 y aditivos para los tampones de lavado) no condujeron a ninguna mejora significativa de las tasas de eliminación de MMV. El aumento adicional del pH a 9,0 resultó en una tasa de eliminación significativa reproducible de más de 2 logs para virus MMV y también REO. Este cambio de proceso es técnicamente fácil de implementar y el tiempo de exposición del FVWr al entorno de pH alto se puede

40

mantener en un valor relativamente bajo (como máximo 6 horas). La elución del FVWr unido se lleva a cabo bajo condiciones neutras.

El análisis de la capacidad del proceso para la inactivación de virus se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la directriz CPMP 268/95, utilizando la siguiente fórmula:

$$R = \log \left( \frac{V_1 \times T_1}{V_2 \times T_2} \right)$$

donde

- R = factor de reducción de virus  
 $V_1$  = volumen de material inicial [ml]  
 $T_1$  = concentración de virus en el material inicial [TCID<sub>50</sub>/ml]  
 $V_2$  = volumen de material después del paso [ml]  
 $T_2$  = concentración de virus después del paso [TCID<sub>50</sub>/ml]

Los volúmenes y los títulos de cada muestra con adición de virus antes y después del tratamiento se utilizaron para calcular R. Siempre que el virus era indetectable, el límite de detección se tomó como el título del virus para el cálculo. Los cálculos se llevaron a cabo con diversos títulos (log<sub>10</sub>[TCID<sub>50</sub>/ml] dado con dos decimales, y solo resultados finales, es decir, los factores de reducción (R) se redondearon al primer decimal.

### Ejemplo 2

El eluato de UNO S se concentró a aproximadamente 800 µg antígeno de FVWr/ml por ultrafiltración utilizando membranas de celulosa modificadas con corte de 30 kDa para facilitar el análisis de trazas de impurezas y variantes de producto.

### 20 Análisis de FVWr

**Actividad de ristocetina.** La Actividad de Cofactor de Ristocetina se determina mediante un analizador turbidimétrico utilizando un reactivo de von Willebrand que contiene trombocitos estabilizados y el antibiótico "ristocetina". El Factor von Willebrand contenido en la muestra (= Cofactor de Ristocetina) provoca la aglutinación de trombocitos estabilizados en presencia de ristocetina. La aglutinación reduce la turbidez de la preparación de reactivo, y el cambio de la densidad óptica se mide mediante el analizador turbidimétrico. La calibración se lleva a cabo mediante la norma de referencia de concentrado de la OMS nº 00/514.

**Antígeno de FVW.** Las muestras de FVW se analizaron en cuanto a su contenido de antígeno de FvW en un ensayo ELISA sistema de doble sándwich con dos anticuerpos policlonales. La medición de las reacciones de color sobre las placas de microtitulación se lleva a cabo con un fotómetro a 490 nm. La concentración de cada muestra se calcula con respecto a la curva estándar con un Programa de Análisis ELISA asistido por ordenador (algoritmo de curva: regresión cúbica). Todas las lecturas se corrigen contra el ensayo en blanco.

**Actividad de unión a FVIII.** La unión a FVIII de FVWr bajo condiciones estáticas se determinó por un ensayo ELISA cromogénico (ECA) incubando una cantidad constante de FVIIIr con una muestra que contenía FVW diluido. El complejo FVW-FVIII formado se transfirió después a una placa de microtitulación revestida con un anticuerpo policlonal de FVW antihumano de conejo comercial. Después de la incubación, el FVIII no unido se eliminó en un paso de lavado posterior. El FVIII unido se cuantificó mediante un ensayo cromogénico de FVIII comercial (Technochrom FVIII: C reagent kit, Technoclone, Austria). Las densidades ópticas corregidas contra ensayo en blanco (en mOD/min a 405 nm) se representaron en un gráfico en función de las concentraciones de FVW:Ag a escala logarítmica.

**40 Análisis SDS-PAGE.** Un análisis SDS-PAGE 8% convencional bajo condiciones de reducción y tinción de los geles con azul de Coomassie y tinción con plata puede proporcionar una idea de la composición proteínica del FVWr. Después de transferir las bandas proteínicas separadas a una membrana de nitrocelulosa y de realizar una tinción inmunológica de la proteína con anticuerpos apropiados contra FVW, FVIII y Furina, respectivamente, se puede llevar a cabo una comparación de las proteínas relacionadas con el FVW y las proteínas totales.

**45 Análisis multimérico.** La estructura multimérica del FVW se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa SDS horizontal de alta densidad. En pocas palabras, las muestras se diluyen a la misma concentración en el intervalo de 0,3-1,0 UI/ml de FVW:Ag y se incuban con tampón Tris-EDTA-SDS, y los multímeros se separan bajo condiciones no reductoras sobre un gel de agarosa. Los multímeros de FVW se visualizaron por inmunotinción en gel con anticuerpo policlonal de FVW antihumano de conejo, seguido de

IgG anticonejo de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (ALP) utilizando el kit de desarrollo de color ALP. Alternativamente, los geles de agarosa se transfirieron a una membrana de transferencia y se llevó a cabo una tinción mediante un anticuerpo policlonal de FVW antihumano de conejo seguido de IgG anticonejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. Para la visualización se utilizó electroquimioluminiscencia, que  
5 aumenta la sensibilidad de detección del FVW en al menos dos magnitudes. Para analizar la distribución de tamaños de multímeros de FVW y la estructura multimérica se utilizaron condiciones de baja resolución (1% agarosa) y alta resolución (2,5% agarosa), respectivamente.

**Análisis HPLC.** el FVW recombinante se puede disociar mediante GluC (V8 proteasa) bajo condiciones nativas para obtener dos fragmentos principales (fragmento homodimérico N-terminal y C-terminal), que se  
10 separan en una columna HPLC C4 en fase inversa. Los fragmentos se detectan mediante control de la absorbancia de UV a 280 nm.

**Mapeo peptídico.** La estructura primaria del FVWr se investigó utilizando un método de mapeo peptídico. Las muestras de FVWr purificado se redujeron con ditioneitol (DTT) y los grupos sulfhidrilo libres se  
15 bloquearon con 4-vinilpiridina. Después se añadió tripsina de grado de secuenciación al FVWr y se dejó reaccionar durante 18 horas. La mezcla de péptidos resultante se separó mediante cromatografía en fase inversa. Los péptidos de elución se detectaron por detección UV en línea a 214 nm y espectrometría de masas por ionización por electrospray en línea.

**Análisis de FVWrdesamidado.** El método analítico para la detección de isoaspartato (un producto de reacción procedente de la desamidación de asparagina) emplea digestión triptica, seguida de la reacción  
20 enzimática de Proteína Isoaspartil Metiltransferasa (PIMT) utilizando el ISOQUANT IsoAspartate Detection Kit suministrado por Promega. La PIMT cataliza la transferencia de un grupo metilo del sustrato S-adenosil-L metionina (SAM) a IsoAsp en la posición de carboxilo, generando S-adenosil homocisteína (SAH). La SAH liberada estequiométricamente se detecta con una longitud de onda de 260 nm mediante un método de RP HPLC.

25 Los datos analíticos del producto obtenidos mediante los diferentes procesos se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2: Datos analíticos de pasadas con pH 9 y de control**

Muestra	UNO S nº 1 (pasada con pH 9)	UNO S nº 2 (pasada de control)	UNO S nº 3 (escala piloto pasada de control)
Actividad de FVW RcoF (U/ml)	36,7	64,8	84,7
Antígeno de FVW (µg/ml)	715	1090	2010
Actividad específica (U/mg)	51,3	59,4	42,1
Unión de colágeno (U/ml)	63,2	106,7	141,8
Actividad de unión de colágeno específica (U/mg)	88,4	97,9	70,5
Unión de FVIII (%)	51,7	64,6	63,1
Proteína CHO (µg/ml)	0,09	0,17	n.d.
CHO ADN (pg/ml)	No detectable	10	n.d.
Actividad de furina (mU/ml)	< 6,25	< 6,25	< 6,25
FVIII Ag (mU/ml)	< 125	152	1650
Actividad FVIII (mU/ml)	71	1452	6222
Desaminación (% en moles)	5,1	3,7	5,0
SDS-PAGE	Véase la Figura 1		
Patrón multimérico (baja resolución)	Véase la Figura 2		
Patrón multimérico (alta resolución)	Véase la Figura 3		
RP-HPLC	Véase la Figura 4		
Mapeo peptídico	Véase la Figura 5		

Tal como se puede ver en la Tabla 2, las propiedades bioquímicas del FVWr purificado mediante las diferentes variantes de proceso son comparables.

30 La banda principal de la proteína de FVWr es muy similar en todos los productos, mientras que la magnitud de las impurezas es menor en la muestra nº 1 (designada como FVW nº 7 en la Figura 1) tanto mediante tinción con plata como mediante análisis *western blot* para determinar el FVIIIr residual. El patrón de bandas de FVIIIr es comparable entre todos los lotes, lo que sugiere que no se ha producido ninguna degradación debido a las condiciones de pH 9,0.

La electroforesis en gel de agarosa de baja y alta resolución reveló la gran similitud de las preparaciones de FVWr. Mediante el análisis multimérico de baja resolución no se pudieron observar diferencias en la composición multimérica. La Figura 2 muestra el gel teñido de las pasadas UNO S con muestras con adición de virus MMV y REO. Además, el análisis multimérico de alta resolución reveló el patrón multimérico intacto, lo que sugiere que no se produjo ningún daño en los multímeros de FVWr debido a las condiciones e pH 9,0. La Figura 3 muestra el gel teñido de las pasadas UNO S con muestras con adición de virus MMV y REO.

Mediante el ensayo Isoquant no se pudo detectar ningún aumento de la desamidación debido al tiempo de permanencia del FVWr con pH 9,0. En general, el porcentaje molar de FVWrdesamidado es muy bajo. El sometimiento de las preparaciones purificadas de FVWr obtenidas mediante las variantes de proceso a digestión proteolítica mediante V8 proteasa en estado nativo (véase la Figura 4) o tripsina (véase la Figura 5) en el estado desnaturalizado y la separación de los péptidos resultantes mediante RP-HPLC resultaron en cromatogramas similares para todas las muestras.

Las diferencias menores en los patrones de picos se deben a la presencia de cantidades diferentes de impurezas (principalmente propéptido de FVWr residual, como se puede ver en la Figura 1) en las preparaciones, que se confirmó mediante espectrometría de masas o análisis de secuencia N-terminal.

### Ejemplo 3

Purificación de FVWr mediante cromatografía de intercambio catiónico con pH alto y con adición de virus MMV.

Una resina UNOsphere S empaquetada en una columna se activó con 1 CV de NaCl 2M y se equilibró con 25 CV de un tampón de equilibrado (pH = 9,0). Después, una solución que contenía FVWr ajustada a una conductividad de 15 mS/cm y un pH de 9,0 y con adición de virus diminuto de ratón (MMV) se cargó en la columna con un caudal lineal de aproximadamente 10,0 cm/h. La columna se lavó después con 10 CV de tampón de equilibrado (pH = 9,0) y el producto se eluyó con 3,5 CV de tampón de elución (pH = 7,5) con un caudal lineal de 65 cm/h. El pH aumentado durante la fase de carga y lavado redujo significativamente la unión de las partículas de virus a la resina, pero conservó la unión completa del FVW de producto. Como resultado, la mayor parte de las partículas de virus cargadas se encontraban en la fracción no unida (flujo continuo) y de lavado separada del producto que se recuperó en la carga común de eluato con altos rendimientos. Los resultados de la Tabla 3 muestran que mediante la aplicación de este procedimiento se pudo lograr una capacidad de eliminación de virus de 2 logs con el modelo sin envoltura del virus diminuto del ratón (MMV).

El ensayo de TCID50 se llevó a cabo tal como se explica a continuación. En pocas palabras, se prepararon diluciones en serie 1/2 log de las muestras en el medio de cultivo tisular apropiado y 100 µl de cada dilución se añadieron a cada uno de los 8 pocillos de una placa de microtitulación sembrada con la línea celular indicadoras. Las células se incubaron durante 7 días a 36°C±2°C antes de evaluar el efecto citopático mediante inspección visual de las células bajo un microscopio. Las dosis infecciosas de cultivo tisular medio (TCID50) se calcularon de acuerdo con la distribución de Poisson y se expresaron como log<sub>10</sub>[TCID50/ml].

**Tabla 3: Purificación de FVWr en UNOsphere S**

	Volumen	Título de virus (TCID50)	Contenido de virus (TCID50)	Reducción
	ml	Log <sub>10</sub> /ml	Log <sub>10</sub>	Log <sub>10</sub>
Carga	400	5,26	7,86	-
Carga común de eluato	89,4	3,8	5,75	2,11

La purificación se llevó a cabo utilizando una columna con un diámetro de 15 mm y una altura de lecho de 14 cm. Los datos mostrados son títulos virales del virus diminuto del ratón activo.

### Ejemplo 4

Purificación de FVWr mediante cromatografía de intercambio catiónico con pH alto y con adición de virus Reo de tipo 3.

Una resina UNOsphere S empaquetada en una columna se activó con 1 CV de NaCl 2M y se equilibró con 25 CV de un tampón de equilibrado (pH = 9,0). Después, una solución que contenía FVWr ajustada a una conductividad de 15 mS/cm y un pH de 9,0 y con adición de diversos virus sin envoltura se cargó en la columna con un caudal lineal de aproximadamente 100 cm/h. La columna se lavó después con 10 CV de

5 tampón de equilibrado (pH = 9,0) y el producto se eluyó con 3,5 CV de tampón de elución (pH = 7,5) con un caudal lineal de 65 cm/h. El pH aumentado durante la fase de carga y lavado redujo significativamente la unión de las partículas de virus a la resina, pero conservó la unión completa del FVW de producto. Como resultado de ello, la mayor parte de las partículas de virus cargadas se encontraban en la fracción no unida (flujo continuo) y de lavado separada del producto que se recuperó en la carga común de eluato con altos rendimientos. Los resultados de la Tabla 4 muestran que mediante la aplicación de este procedimiento se pudo lograr una capacidad de eliminación de virus de 2 logs con el modelo sin envoltura del virus Reo de ratón de tipo 3 (REO-III).

**Tabla 4: Purificación de FVWr en UNOsphere S**

	Volumen	Título virus (TCID50)	Contenido de virus (TCID50)	Reducción
	ml	Log <sub>10</sub> /ml	Log <sub>10</sub>	Log <sub>10</sub>
Carga	897	3,73	6,68	-
Carga común de eluato	89,3	2,61	4,56	2,12

10

La purificación se llevó a cabo utilizando una columna con un diámetro de 15 mm y una altura de lecho de 14 cm. Los datos mostrados son títulos virales del Reovirus de ratón de tipo III (REO-III) activo.

**Ejemplo 5**

Purificación de FVWr en UNOsphere S de acuerdo con el procedimiento estándar (pH neutro).

15 Una resina UNOsphere S empaquetada en una columna se activó con 1 CV de NaCl 2M y se equilibró con 25 CV de un tampón de equilibrado (pH = 6,5). Después, una solución que contenía FVWr ajustada a una conductividad de 15 mS/cm y un pH de 6,5 y con adición de diversos virus sin envoltura se cargó en la columna con un caudal lineal de aproximadamente 100 cm/h. La columna se lavó después con 10 CV de tampón de equilibrado (pH = 6,5) y el producto se eluyó con 3,5 CV de tampón de elución (pH = 7,5) con un caudal lineal de 65 cm/h. El título viral de los diversos virus analizados se evaluó en las diferentes fracciones cromatográficas (carga, flujo continuo en columna, lavado, eluato, posteluato) y se calcularon los factores de reducción. Los resultados de la Tabla 5 muestran que aplicando el procedimiento de purificación estándar para FVW en UNOsphere S, la capacidad de eliminación de virus sin envoltura era insuficiente para los diferentes virus modelo analizado para reivindicar un paso cromatográfico fuerte para la eliminación de virus sin envoltura lipídica.

20

25

**Tabla 5: Purificación de FVW de acuerdo con el procedimiento estándar y las capacidades de reducción correspondientes para virus sin envoltura**

	Reducción	Comentario
	Log <sub>10</sub>	Características virus
PPV (Parvovirus porcino)	< 1	Pequeño, virus de ADN
Advh (Adenovirus humano)	1,8	Grande, virus de ADN
EMCV (virus de la encefalomiocarditis)	< 1	Pequeño, ARN
Virus Reo de tipo III	1,8	Grande, ARN
MMV (virus diminuto del ratón)	< 1	Pequeño, ADN

30 La tasa de reducción se calcula como la carga viral total en la fracción de carga dividida entre la carga viral total en la fracción de eluato expresada en valores logarítmicos.

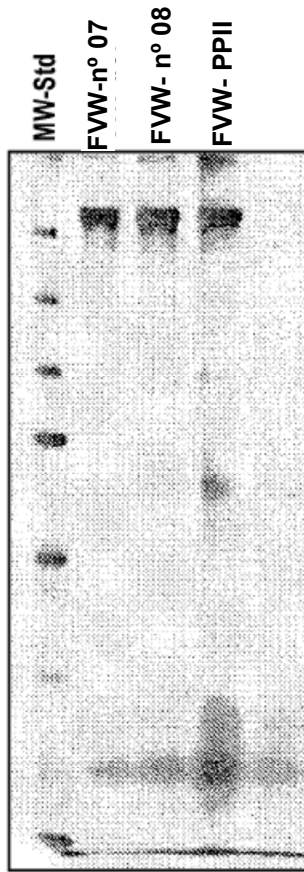


**Reivindicaciones**

1. Método para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que comprende:  
5                    aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína; y  
  
                     lavar la resina de intercambio catiónico con un tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho tampón de lavado un pH igual o inferior al de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico,  
  
10                    siendo la proteína de la solución un polipéptido que tiene una masa molecular de al menos 150 kilodaltons, y donde el virus sin envoltura lipídica se elimina de la solución que contiene proteína.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico está al menos 1 unidad de pH por encima del punto isoelectrico de la proteína.
3. Método para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que  
15                    comprende:  
  
                     aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico,  
  
                     lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico, y  
  
20                    lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado,  
  
                     siendo la proteína de la solución un polipéptido que tiene una masa molecular de al menos 150 kilodaltons, y donde el virus sin envoltura lipídica se elimina de la solución que contiene proteína.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el primer tampón de lavado está al menos 1  
25                    unidad de pH por encima del punto isoelectrico de la proteína aplicada a la resina de intercambio catiónico.
5. Método para eliminar un virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene proteína, que  
30                    comprende:  
  
                     aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína, y  
  
                     lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el punto isoelectrico de la proteína aplicada a la resina de intercambio catiónico, y  
  
                     lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado,  
  
35                    siendo la proteína de la solución un polipéptido que tiene una masa molecular de al menos 150 kilodaltons, y donde el virus sin envoltura lipídica se elimina de la solución que contiene proteína.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico está al menos 1 unidad de pH por encima del punto isoelectrico de la proteína.
- 40                    7. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque el pH del primer tampón de lavado está al menos 1 unidad de pH por encima del pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico.
8. Método según las reivindicaciones 2, 4, 6 o 7, caracterizado porque el pH es superior a 7,0.
- 45                    9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la resina de intercambio catiónico tiene un grupo con carga negativa seleccionado de entre el grupo consistente en

carboximetilo (CM), sulfoalquilo (SP, SE), ésteres de celulosa sulfatados, heparina y metilsulfonato (S).

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque la proteína es una proteína de coagulación sanguínea.
- 5 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque la proteína de coagulación sanguínea se selecciona de entre el grupo consistente en factor VIII y factor von Willebrand.
12. Método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene factor de von Willebrand (FVW), que comprende:
- 10 aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoelectrico del FVW, y
- lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer tampón de lavado un pH igual o inferior al de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico.
13. Método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene FVW, que comprende:
- 15 aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico,
- lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el pH de la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico, y
- lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado.
- 20 14. Método para eliminar virus sin envoltura lipídica de una solución que contiene FVW, que comprende:
- aplicar la solución a una resina de intercambio catiónico con un pH mayor que el punto isoelectrico del FVW, y
- lavar la resina de intercambio catiónico con un primer tampón de lavado con un pH mayor que el punto isoelectrico del FVW aplicado a la resina de intercambio catiónico; y
- 25 lavar la resina de intercambio catiónico con un segundo tampón de lavado para formar un eluato, teniendo dicho primer eluyente un pH igual o inferior al del primer tampón de lavado, y donde el virus sin envoltura lipídica se elimina de la solución que contiene FVW.

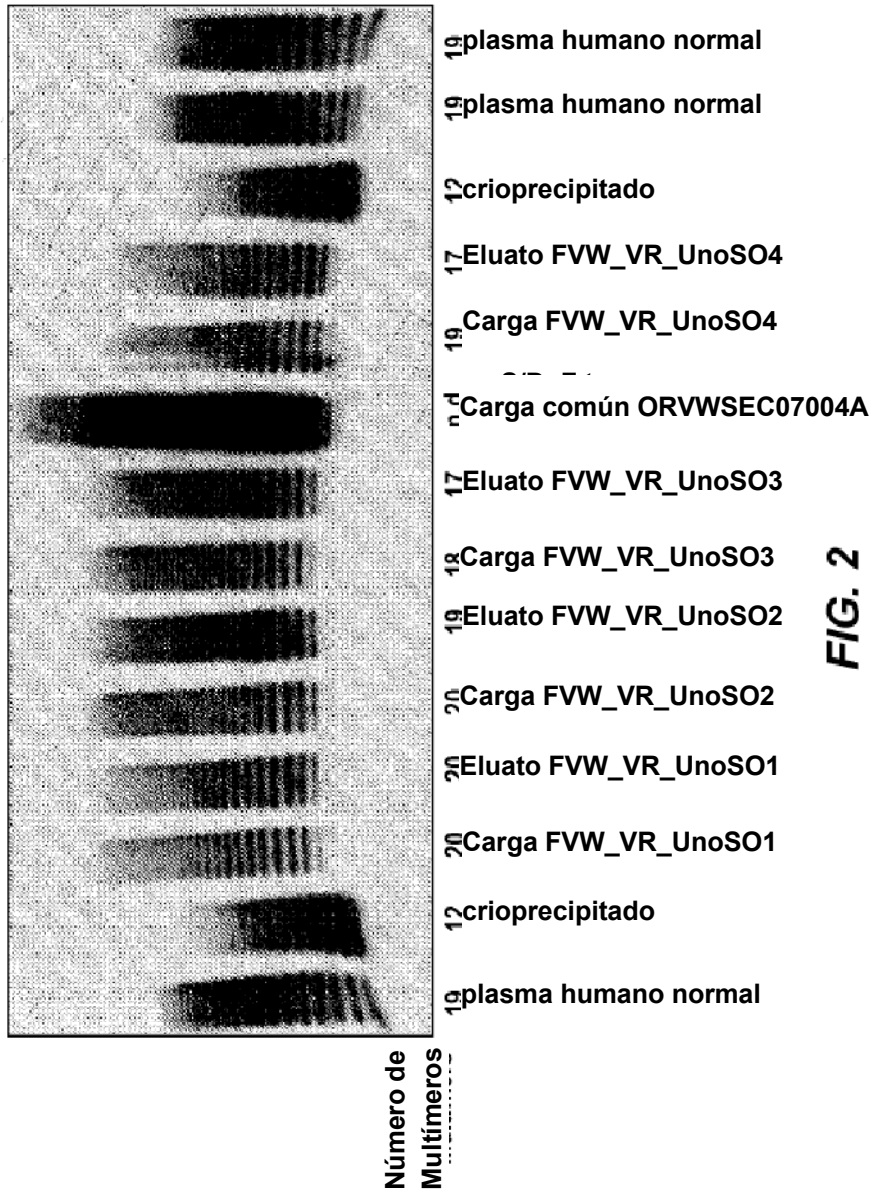


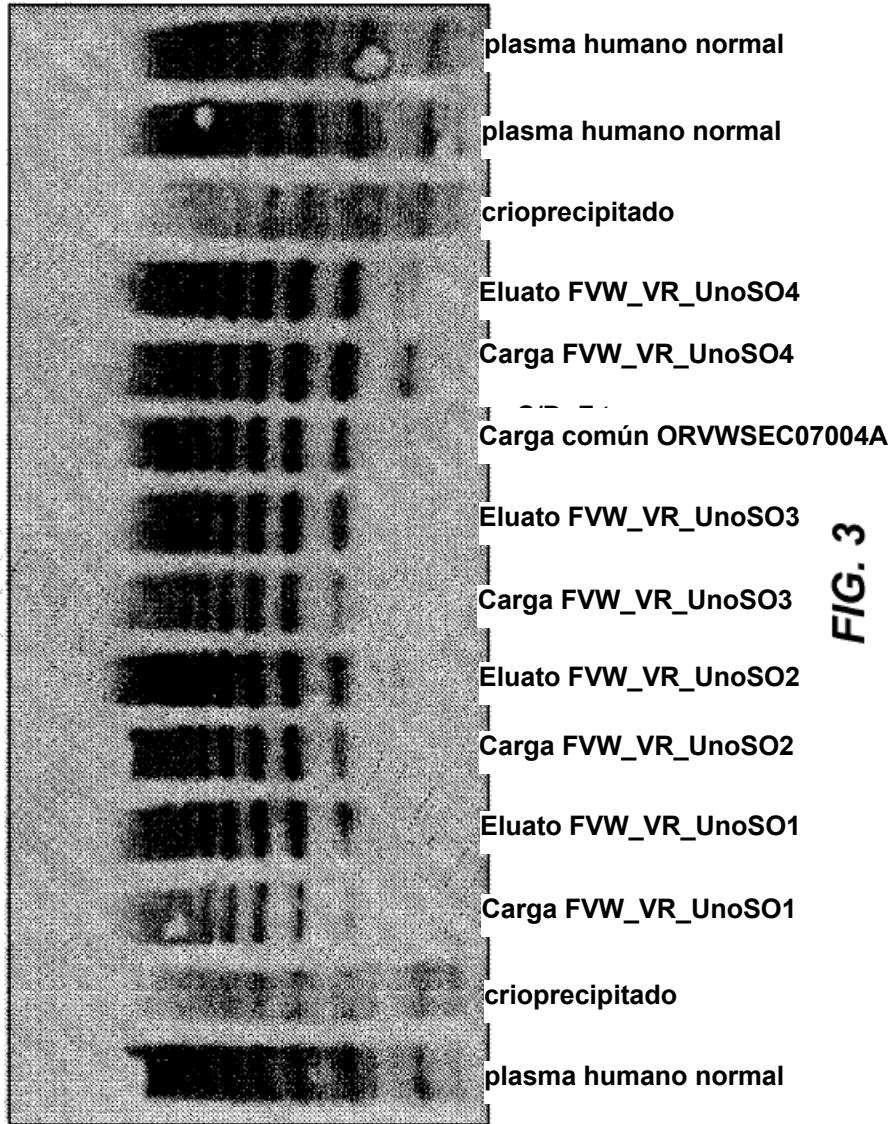
A) Tinción con plata



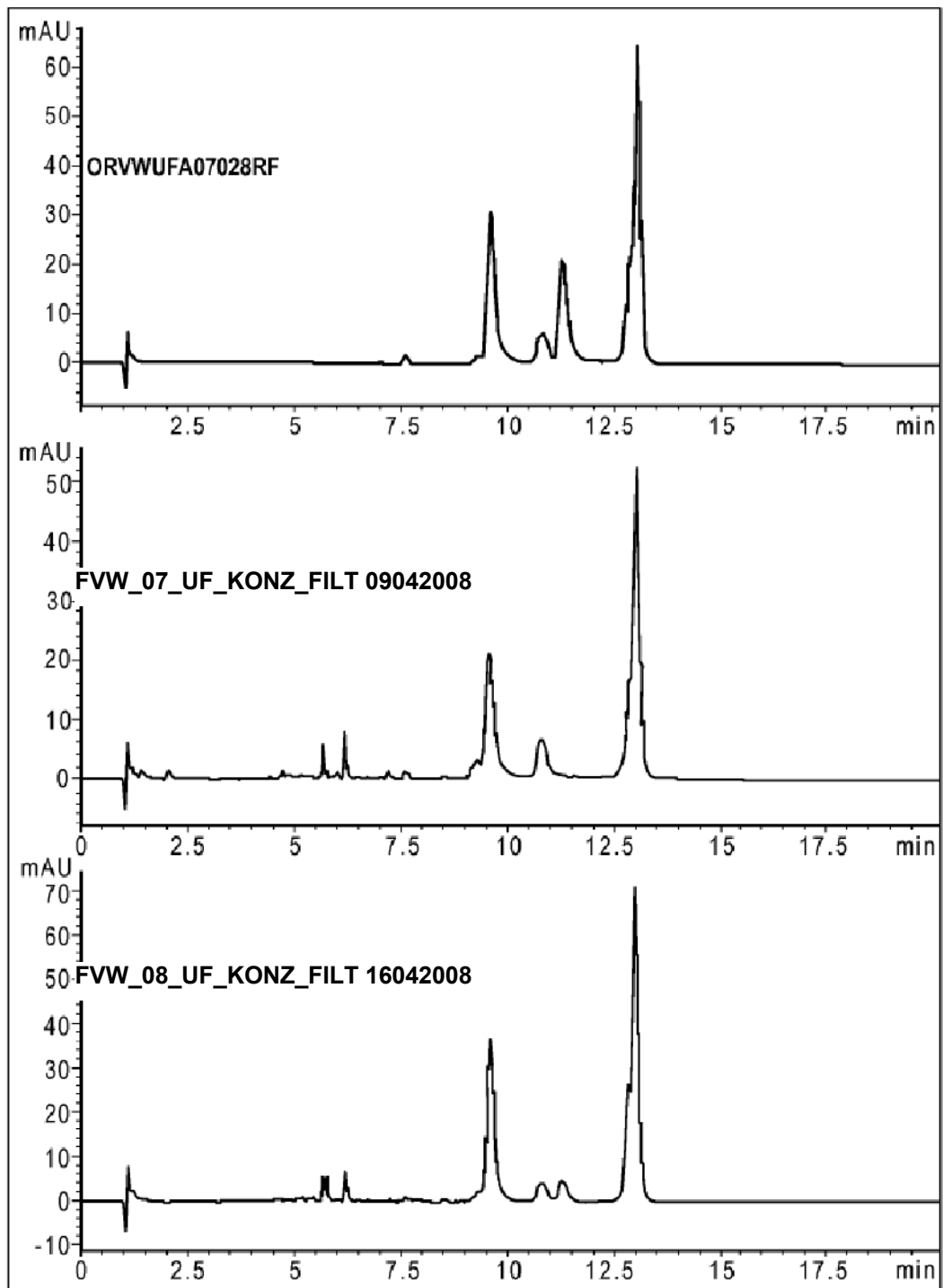
B) Western blot para FVIIIr residual

**FIG. 1**





**FIG. 3**



**FIG. 4**

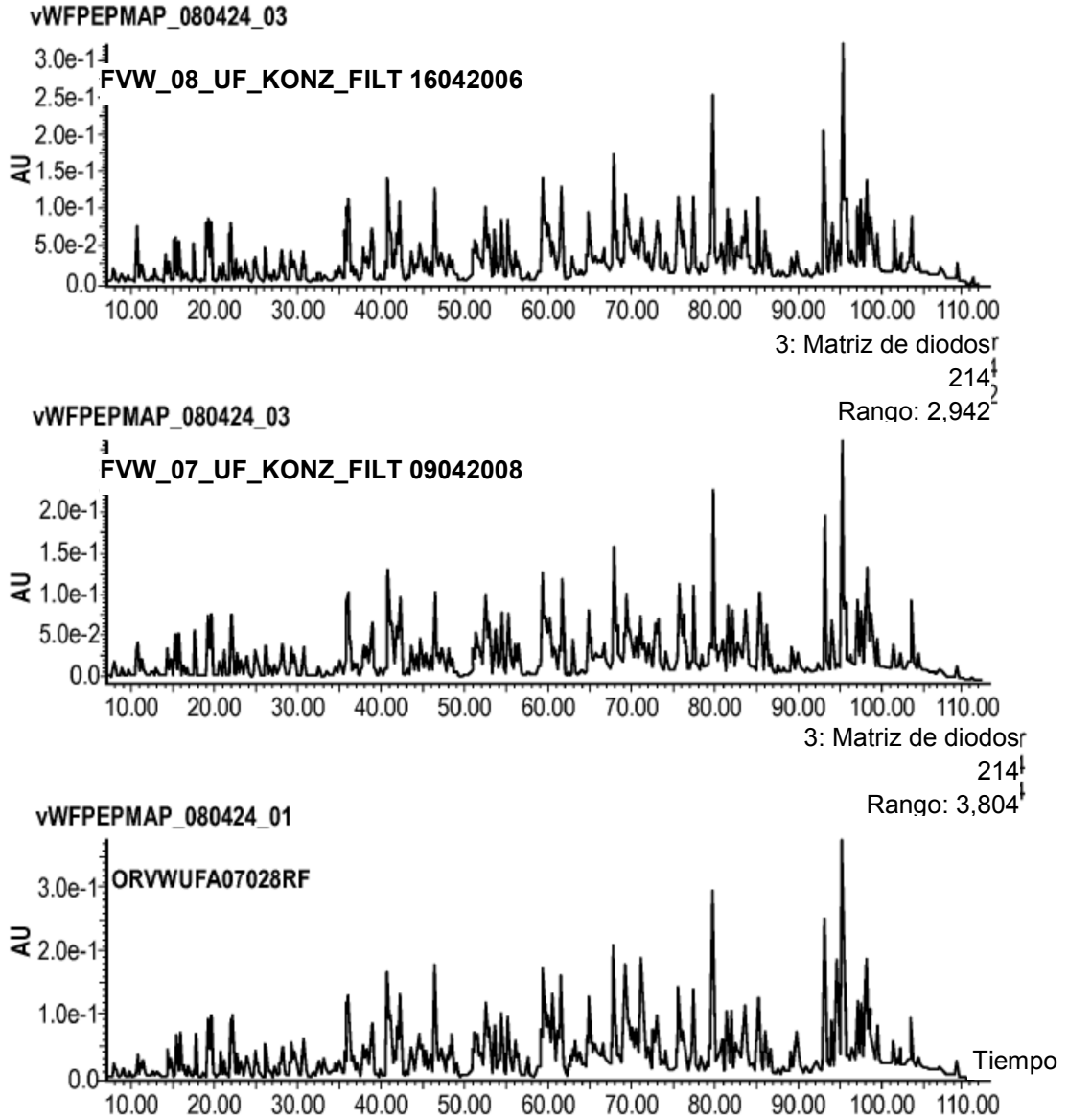


FIG. 5