

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 109**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/18** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009 E 09793497 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2373677**

54 Título: **Purificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

**02.12.2008 EP 08170454**

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

**05.07.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BJELKE, JAIS, ROSE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 576 109 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 polipéptidos

**Campo de la Invención**

5 La presente invención se refiere a la purificación de polipéptidos. En particular, la presente invención se refiere a métodos que utilizan cromatografía de intercambio iónico, por la cual pueden purificarse diferentes formas de polipéptidos gamma-carboxiladas.

**Antecedentes de la Invención**

10 El ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) es un aminoácido singular que se fija al calcio. Es una forma modificada de ácido glutámico (Glu) y puede producirse *in vivo* por la modificación postraduccional de residuos glutamato. La carboxilación del ácido glutámico de esta manera hace posible la fijación de calcio y permite la unión de proteínas tales como procoagulantes y anticoagulantes a los fosfolípidos. Esta reacción mediada por enzimas, conocida como  $\gamma$ -carboxilación (gamma-carboxilación), requiere vitamina K como cofactor.

15 Algunas proteínas maduras tienen un dominio que es rico en aminoácidos que se han convertido en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico de esta manera. Éste se conoce como dominio GLA. Este dominio GLA es en muchos casos responsable de la fijación con afinidad alta de los iones calcio por la proteína. Un dominio GLA de este tipo puede encontrarse en una diversidad de proteínas diferentes. Por ejemplo, los factores de coagulación de la sangre VII, IX y X y la protrombina incluyen todos ellos un dominio GLA que comprende cierto número de residuos de aminoácido Gla.

20 Gillis S. et al., Protein Science, Vol. 6, No. 1, (1997) describe diversos polipéptidos del Factor IX humanos con diferentes cantidades de residuos gla.

Malhotra et al., Biochemical et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymologie, vol. 746, No. 1-2, (1983) describe que las protrombinas tienen diferentes cantidades de residuos gla.

EP 0 363 126 da a conocer un método para purificación de proteínas dependientes de vitamina K ejemplificadas por proteína C humana, utilizando cromatografía de intercambio iónico.

25 Yan S.C.B. et al. Bio/Technology, Vol. 8, No. 7 (1 julio 1990) describe que la actividad de Proteína C depende del grado de gamma-carboxilación.

EP 0 617 049 describe un proceso para el aislamiento de factores IX, X y II altamente purificados a partir de complejo de protrombina o plasma humano.

**Sumario de la Invención**

30 Los autores de la presente invención han encontrado que es posible separar o purificar diferentes especies de un polipéptido en el cual las diferentes especies varían en la cantidad de gamma-carboxilación, o el número de residuos de ácido gamma-carboxiglutámico que contienen las mismas. La invención aborda en particular la separación cromatográfica de especies de polipéptidos que tienen contenidos diferentes de ácido gamma-carboxiglutámico.

35 Así pues, la invención proporciona un método para purificación de un polipéptido que tiene un contenido deseado de ácido gamma-carboxiglutámico a partir de una muestra que comprende una mezcla de especies de dicho polipéptido que tienen contenidos diferentes de ácido gamma-carboxiglutámico, comprendiendo dicho métodos los pasos de:

(a) cargar dicha muestra sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico;

40 (b) eluir dicho polipéptido utilizando una solución con un pH menor que pH 9,0 que comprende al menos una sal seleccionada de acetato de amonio, cloruro de amonio y acetato de sodio;

(c) seleccionar una fracción obtenida por dicha elución, en donde los polipéptidos de la fracción tienen el contenido deseado de ácidos gamma-carboxiglutámicos.

Un método preferido de este tipo comprende los pasos siguientes:

(a) equilibrar un material de intercambio aniónico con un tampón a un pH menor que 9,0;

45 (b) cargar dicha muestra sobre el material de intercambio aniónico;

(c) opcionalmente, lavar el material de intercambio aniónico con un tampón a un pH menor que 9,0;

(d) eluir dicho polipéptido del material de intercambio aniónico utilizando una solución con un pH menor que 9,0 que comprende al menos una sal seleccionada de acetato de amonio, cloruro de amonio y acetato de sodio; y

(e) seleccionar una fracción obtenida por dicha elución en la cual los polipéptidos de la fracción tienen el contenido deseado de ácidos gamma-carboxiglutámicos.

5 Polipéptidos adecuados para purificación de esta manera incluyen Factor IX, Factor VII, Factor VIIa, Factor X, protrombina, Proteína-S, Proteína-C, Proteína-Z, Osteocalcina, Proteína Matriz-Gla, 6-específica de la detención del crecimiento, Gla-1 rico en Prolina, Gla-2 rico en Prolina, Gla-3 rico en Prolina y Gla-4 rico en Prolina. En un método preferido, el polipéptido es Factor IX, Factor X, Factor VII o Factor VIIa.

Donde el polipéptido es Factor IX, el método puede comprender seleccionar una fracción obtenida por dicha elución que tiene un aumento en la proporción de formas #1-11-Gla y/o #1-12-Gla de Factor IX comparada con la proporción de formas #1-11-Gla y/o #1-12-Gla de Factor IX en la muestra que se purifica.

10 Donde el polipéptido es Factor X o Factor VII, el método puede comprender seleccionar una fracción contenida por dicha elución que tiene un aumento en la proporción de formas #1-10-Gla y/o #1-11-Gla de Factor X o Factor VII comparada con la proporción de formas #1-10-Gla y/o #1-11-Gla de Factor X o Factor VII en la muestra que se purifica.

15 Donde el polipéptido es Factor IX, el método puede comprender seleccionar una fracción obtenida por dicha elución que tiene una disminución en la proporción de forma #1-10-Gla del Factor IX comparada con la proporción de forma #1-10-Gla de Factor IX en la muestra que se purifica.

Donde el polipéptido es Factor X o Factor VII, el método puede comprender seleccionar una fracción obtenida por dicha elución que tiene una disminución en la proporción de forma #1-9-Gla del Factor X o Factor VII comparada con la proporción de forma #1-9-Gla de Factor X o Factor VII en la muestra que se purifica.

20 En los métodos de la invención, puede aplicarse uno cualquiera o más de lo siguiente:

- el tampón de elución puede tener un pH entre 5,0 y 8,5;
- acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio pueden estar presentes en el patrón de elución en una proporción entre 0,1 M y 2,0 M, con preferencia a aproximadamente 0,6 M.
- la cromatografía de intercambio iónico puede utilizar un tampón de equilibración a un pH entre 5,0 y 8,5.

25 La presente invención se extiende también a formulaciones de polipéptidos obtenidas por los métodos descritos en esta memoria, es decir formulaciones en las cuales la cantidad de una o más especies del polipéptido se han alterado, donde las especies difieren en la extensión de gamma-carboxilación, o en el número de residuos de ácido gamma-carboxiglutámico que contienen las mismas.

### Breve Descripción de las Figuras

30 La Figura 1A muestra la estructura primaria del Factor IX humano con sub-dominios identificados. El dominio GLA se encuentra en los aminoácidos 1-46; el dominio EGF1 se encuentra en los aminoácidos 47-83, el dominio EGF2 se encuentra en los aminoácidos 84 a 124, el péptido de activación se encuentra en los aminoácidos 146 a 180 y el dominio de proteasa se encuentra en los aminoácidos 181 a 415. Los 12 aminoácidos en el dominio Gla que están sujetos posiblemente a gamma-carboxilación están marcados como "γ" y están localizados en los aminoácidos 7, 8,  
35 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36 y 40.

La Figura 1B muestra un alineamiento de parte de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos humanos Factor VII, Factor IX y Factor X. Estos alineamientos se derivan del dominio GLA de cada uno de estos polipéptidos y muestran la localización de residuos Gla como \*.

40 La Figura 2 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de cambio de aniones de una muestra de rhFIX como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 3 muestra una subsección expandida de la Figura 2.

La Figura 4 muestra un análisis de la distribución de especies Gla antes y después de la separación por cromatografía de intercambio aniónico del Ejemplo 2. Antes = distribución de especies Gla en la muestra de rhFIX utilizada como "Aplicación" en el Ejemplo 2. Esta muestra se había purificado por captura de inmunofinidad para producir una muestra de rhFIX con pureza mayor que 95%. Después = distribución de especies Gla en el conjunto  
45 de fracciones C12-D3 obtenidas en el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio aniónico de una muestra de rhFIX como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 6 muestra una subsección expandida de la Figura 5.

La Figura 7 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio de aniones de una muestra de FVII como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 8 muestra una subsección expandida de la Figura 7.

50 La Figura 9 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio de aniones de una muestra de rhFIX como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 10 muestra una subsección expandida de la Figura 9.

La Figura 11 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio de aniones de una muestra de rhFIX como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 12 muestra una subsección expandida de la Figura 11.

La Figura 13 muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio de aniones de una muestra de FX como se describe en el Ejemplo 7.

## 5 Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se deriva de los hallazgos de que especies de polipéptidos que tienen niveles diferentes de gamma-carboxilación pueden tener diferentes niveles de actividad, y que tales especies diferentes pueden purificarse o separarse utilizando cromatografía de intercambio iónico. Por aumento de la proporción de especies de polipéptidos más activas, y/o por disminución de la proporción de especies de polipéptidos menos activas o inactivas en una muestra, esto puede dar como resultado la producción de una formulación purificada que tenga actividad específica incrementada.

Un "polipéptido" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio para hacer referencia a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, u otros peptidomiméticos. El término "polipéptido" incluye así secuencias peptídicas cortas además de polipéptidos más largos y proteínas. Como se utiliza en esta memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos que incluyen glicina y los dos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Una proteína "madura" es un polipéptido que ha sido sometido a procesamiento postraduccional, tal como carboxilación, glicosilación o la escisión de regiones propeptídicas tales como secuencias de direccionamiento. Un polipéptido de la invención que se encuentra en forma de una proteína madura puede haber sido sometido por tanto a gamma-carboxilación y puede haber tenido uno o más residuos Glu en su secuencia traducida convertidos en Gla.

Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para la purificación de cualquier polipéptido que está, o puede estar, gamma-carboxilado.

El polipéptido para uso en los métodos de la invención puede ser un polipéptido que comprende uno o más residuos de ácido gamma-carboxiglutámico. Un polipéptido de este tipo puede identificarse por investigación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido y determinación de si está presente Gla.

Se conocen cierto número de polipéptidos que comprenden ácido gamma-carboxiglutámico. Cierta número de proteínas de la coagulación de la sangre y reguladoras, que incluyen protrombina, Factor VII (con inclusión de Factor VIIa), Factor IX, Factor X, proteína C y proteína S, incluyen residuos Gla. Estas proteínas pueden contener 10 a 12 residuos de ácido gamma-carboxiglutámico en el dominio GLA, localizados dentro de los primeros 40 residuos del término N de la proteína madura. Las proteínas de huesos tales como osteocalcina y proteína Matriz Gla y otras proteínas de mamífero dependientes de vitamina K tales como 6-específica de la detención del crecimiento (Gas6), proteína Z, Gla-1 rico en Prolina (PRGP1), Gla-2 rico en Prolina (PRGP2), Gla-3 rico en Prolina (PRGP3) y Gla-4 rico en Prolina (PRGP4) comprenden también residuos Gla múltiples. Se han encontrado también residuos de ácido gamma-carboxiglutámico en proteínas no de mamífero, tales como los conopéptidos Conantokina G y Conantokina T. Cualquiera de estos polipéptidos puede purificarse con arreglo a la invención.

El polipéptido para uso en los métodos de la invención puede ser un polipéptido que puede estar modificado postraduccionalmente para incluir uno o más residuos de ácido gamma-carboxiglutámico. Por ejemplo, tales residuos pueden producirse por gamma-carboxilación de residuos ácido glutámico en el polipéptido. La secuencia de aminoácidos del polipéptido puede comprender por tanto uno o más residuos de ácido glutámico (Glu). Un polipéptido que puede modificarse postraduccionalmente de este modo puede ser un polipéptido existente naturalmente. Un polipéptido de este tipo puede derivarse de cualquier organismo adecuado. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido de mamífero existente naturalmente, tal como un polipéptido de roedor, primate, gato, perro, oveja, vaca, cerdo u otro mamífero. Preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido de ratón, rata, o humano. Muy preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido humano. El polipéptido puede derivarse de una especie de no-mamífero. Por ejemplo, algunas conotoxinas pueden comprender gamma-carboxiglutamato. El polipéptido puede ser por tanto un polipéptido existente naturalmente de un molusco tal como un gasterópodo. El gasterópodo puede ser un caracol tal como un caracol cónico. Un polipéptido que puede modificarse postraduccionalmente de este modo puede ser una variante de un polipéptido existente naturalmente, tal como una variante de una de las proteínas gamma-carboxiladas conocidas indicadas anteriormente, un polipéptido generado artificialmente, tal como un polipéptido sintético o una proteína mutante o variante producida recombinantemente.

El polipéptido puede ser un polipéptido que tiene un dominio GLA. El dominio GLA es un dominio proteínico que contiene modificaciones postraducionales de residuos glutamato (Glu) múltiples para formar gamma-carboxiglutamato (Gla). Estos residuos Gla están localizados generalmente en una sola región o dominio del polipéptido. Éste está localizado en muchos casos en el término N del polipéptido o de la proteína madura.

Por ejemplo, la Figura 1A muestra la estructura primaria de la proteína humana Factor IX. Esta proteína incluye un dominio GLA en los aminoácidos 1 a 46. Este dominio incluye 12 residuos de aminoácido que pueden estar modificados de glutamato a Gla. Éstos están localizados en las posiciones 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36 y

40. Por tanto éste puede comprender hasta 12 residuos Gla. El polipéptido a purificar conforme a la presente invención puede ser por tanto Factor IX. La Figura 1B muestra un alineamiento basada en el dominio Gla de las proteínas humanas Factor VII, IX y X. Las localizaciones de los residuos de aminoácido que pueden estar modificadas de glutamato a Gla en cada secuencia se identificaron como \*. El polipéptido a purificar de acuerdo con la presente invención puede ser por tanto Factor VII o Factor X.

El polipéptido para uso en la invención puede comprender un dominio GLA de una proteína gamma-carboxilada conocida, tal como un dominio GLA de Factor IX, Factor VI o Factor X, o de cualquiera de las otras proteínas gamma-carboxiladas conocidas indicadas anteriormente, tal como de otro factor de coagulación de la sangre.

El polipéptido para uso en los métodos de la invención puede ser un polipéptido que comprende o es susceptible de comprender uno o más residuos de ácido gamma-carboxiglutámico. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender o ser susceptible de comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 o más residuos Gla. Preferiblemente, el polipéptido comprende o es susceptible de comprender más de 1 residuo Gla, tal como más de 1, más de 2, más de 5 o más de 9 residuos Gla. El polipéptido puede comprender o ser susceptible de comprender hasta 10, hasta 12, hasta 15 o hasta 20 residuos Gla. Como se expone adicionalmente más adelante, los métodos de la invención permiten la purificación de diferentes especies moleculares del polipéptido en las cuales se han producido niveles diferentes de gamma-carboxilación. Los números a que se hace referencia aquí son el número total de residuos Gla que puede estar presente en dicho polipéptido. Es decir, si el polipéptido está totalmente gamma-carboxilado, estos números indican el número de residuos Gla que están presentes. Por ejemplo, donde la gamma-carboxilación tiene lugar en el dominio GLA, estos números se refieren al número total de sitios posibles para gamma-carboxilación en dicho dominio GLA, tal como el número total de residuos Glu en el polipéptido traducido o el número máximo de residuos Gla que pueden producirse por la acción de una enzima tal como  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa. Especies adicionales del mismo polipéptido pueden existir también, en las cuales están presentes menos residuos de ácido gamma-carboxiglutámico que este máximo.

El polipéptido puede comprender por tanto residuos Glu múltiples en los 40 residuos N-terminales de su secuencia de aminoácidos traducida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido expresado puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más residuos Glu en los 40 residuos de aminoácido más próximos al término N del polipéptido, o en los 40 aminoácidos más próximos al término N de la proteína madura.

La gamma-carboxilación puede conseguirse utilizando una enzima. Una enzima  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa de este tipo se sabe que está implicada en la gamma-carboxilación de muchos polipéptidos *in vivo*. La  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa es una enzima endoplásmica que cataliza la modificación postraduccional de Glu en Gla en el dominio GLA de cierto número de factores de coagulación dependientes de vitamina K. Polipéptidos para uso en la presente invención pueden identificarse así por determinación de si los mismos están gamma-carboxilados por  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa.

Se cree que la enzima  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa se fija a su proteína sustrato por un motivo de secuencia en el lado amino-terminal de los residuos glutamato a carboxilar. La enzima puede carboxilar luego residuos glutamato múltiples en dicha área, por ejemplo todos los residuos glutamato en el dominio GLA, antes de la liberación del sustrato. Un polipéptido para uso en la presente invención puede comprender por tanto un motivo o sitio que es reconocido por  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa o por otra enzima susceptible de gamma-carboxilación. Este sitio de reconocimiento puede estar localizado en la región N-terminal del polipéptido, por ejemplo dentro de los 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 ó 40 aminoácidos más próximos al polipéptido tal como se traduce, o al que será el terminal N de la proteína madura. El sitio de reconocimiento puede estar localizado en el lado amino-terminal de los residuos glutamato a carboxilar. Por ejemplo, en muchas proteínas gamma-carboxiladas existentes naturalmente, la enzima  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa reconoce y se fija a un sitio en la región propeptídica. Dicha región se escinde subsiguientemente del resto del polipéptido durante el procesamiento postraduccional. El sitio de reconocimiento de la gamma-carboxilasa puede por tanto estar ausente de la proteína madura.

En protrombina y Factor IX, el sitio implicado en el reconocimiento de la enzima  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa está definido por los residuos -18, -17, -15, -15 y -10. Un sitio de reconocimiento similar se encuentra en otras proteínas gamma-carboxiladas. Una fenilalanina en posición -16 y alanina en posición -10 están bien conservadas dentro de los propéptidos de los sustratos de carboxilasa, como lo son residuos alifáticos tales como isoleucina, leucina y valina en las posiciones -17 y -15. Leucina, valina o lisina en posición -16 pueden soportar también la carboxilación. El polipéptido para uso en la invención puede comprender un sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación de una proteína gamma-carboxilada conocida, tal como un sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación de Factor IX, Factor X, Factor VII, o cualquiera de las otras proteínas gamma-carboxiladas conocidas expuestas anteriormente. Por ejemplo, una región propeptídica de cualquiera de tales proteínas, que comprende un sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación puede estar presente en el terminal N del polipéptido traducido para permitir el procesamiento postraduccional adecuado del polipéptido por  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa.

Un polipéptido susceptible de estar gamma-carboxilado cumple preferiblemente uno o los dos criterios siguientes:

(1) el polipéptido comprende un sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación, y

(2) existen residuos de ácido glutámico dentro de 40 residuos del sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación.

Se cree que la enzima  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa es activa en el retículo endoplásmico rugoso. Para que un polipéptido sea gamma-carboxilado por esta enzima, el polipéptido pasa preferiblemente a través del retículo endoplásmico rugoso de una célula que expresa la enzima  $\gamma$ -glutamyl-transferasa. El polipéptido puede comprender así secuencias que permiten el tráfico del polipéptido recién sintetizado a través del retículo neoplásmico bruto. Secuencias señal susceptibles de direccionamiento de un polipéptido al retículo endoplásmico son bien conocidas. Tales secuencias señal se encuentran con frecuencia en el término amino del polipéptido, pueden tener 16 hasta 30 aminoácidos de longitud y pueden comprender 4 a 12 residuos hidrófobos. Tales péptidos señal son escindidos generalmente de la molécula del polipéptido por la peptidasa señal y no están presentes por tanto en la proteína madura.

A fin de que ocurra la gamma-carboxilación del polipéptido, el polipéptido se expresa preferiblemente en una célula. Un polipéptido para uso en la invención puede sintetizarse por expresión en una célula de este tipo. Preferiblemente, la célula en la cual se expresa el polipéptido incluye la maquinaria celular necesaria para hacer posible la gamma-carboxilación de un polipéptido. Por ejemplo, la célula puede expresar  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa. Preferiblemente, la célula en la que se sintetiza la proteína tiene una enzima gamma-carboxilasa asociada con el retículo endoplásmico rugoso. La célula puede cultivarse en presencia de cofactores enzimáticos tales como vitamina K. Preferiblemente, la célula en la cual se sintetiza la proteína comprende vitamina K intracelular.

Polipéptidos que son susceptibles de gamma-carboxilación pueden identificarse por expresión de los mismos en una célula de este tipo y determinación de si existe gamma-carboxilación. Por ejemplo, un polipéptido puede expresarse en una célula como se describe en esta memoria y puede direccionarse al retículo endoplásmico rugoso de una célula de este tipo, por ejemplo por utilización de un péptido señal como se ha descrito arriba. Por expresión del polipéptido en una célula de este tipo y determinación de si el polipéptido expresado y procesado postraduccionalmente comprende residuos Gla, puede identificarse un polipéptido susceptible de ser gamma-carboxilado.

Los métodos de la invención implican la purificación de una o más especies de un polipéptido de otras especies de dicho polipéptido que tienen grados de gamma-carboxilación diferentes. En el caso de que un polipéptido pueda estar gamma-carboxilado en más de un sitio, pueden existir diferentes especies de dicho polipéptido en las cuales estén presentes números diferentes de residuos de aminoácido gamma-carboxiglutamato, o en las cuales están presentes residuos gamma-carboxiglutamato en diferentes localizaciones posibles dentro de la molécula del polipéptido.

Por ejemplo, algunas especies del polipéptido pueden estar totalmente gamma-carboxiladas. Es decir, la gamma-carboxilación puede haber convertido el glutamato en gamma-carboxiglutamato en todos los residuos del polipéptido en los cuales es posible esto, por ejemplo en todos los residuos Glu en el dominio GLA. Otras especies del polipéptido pueden estar gamma-carboxiladas parcialmente. Es decir, la gamma-carboxilación puede haber convertido glutamato en gamma-carboxiglutamato en algunos, pero no todos los residuos en el polipéptido en los que es posible esto, tales como algunos, pero no todos los residuos Glu en el dominio GLA.

Pueden identificarse una diversidad de especies parcialmente gamma-descarboxiladas. Éstas pueden clasificarse de diversas maneras. Por ejemplo, puede definirse el nivel de gamma-descarboxilación por el cual los residuos en el polipéptido están gamma-descarboxilados, o puede definirse por el número total de aminoácidos gamma-carboxiglutamato presentes en el polipéptido. La última clasificación puede significar que varias especies moleculares estructuralmente diferentes del polipéptido se consideran juntas basadas en el número total de residuos de ácido gamma-carboxiglutámico que contienen las mismas. Por ejemplo, una especie de polipéptido en la cual están presentes todos menos uno de los residuos gamma-carboxiglutamato posibles y puede contener subespecies diferentes múltiples de polipéptido, en las cuales el glutamato está retenido en posiciones diferentes que podrían haber sido gamma-carboxiladas.

Debido al mecanismo de acción de la  $\gamma$ -glutamyl-carboxilasa, la gamma-carboxilación comienza generalmente en el residuo Glu más próximo al sitio de reconocimiento de gamma-carboxilación y progresa alejándose del terminal N del polipéptido. Donde el polipéptido no está totalmente gamma-carboxilado, esto es debido generalmente a que la gamma-carboxilación se detiene, o la enzima se desprende del polipéptido, antes que los últimos residuos Glu hayan sido convertidos. Generalmente, los residuos Glu más alejados del sitio de fijación de la gamma-carboxilación o más alejados del término N de la proteína son los que no están gamma-carboxilados en un polipéptido parcialmente gamma-carboxilado.

Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, el Factor IX humano incluye hasta 12 residuos gamma-carboxiglutamato. El número real de residuos Gla presentes variará en diferentes moléculas polipeptídicas dependiendo del grado de modificación postraduccional por gamma-carboxilación que ha sufrido la molécula. Esto significa que una muestra de Factor IX humano puede comprender especies de Factor IX que están totalmente gamma-descarboxiladas, es decir que tienen la totalidad de los 12 residuos gamma-carboxiglutamato posibles (#1-12 Gla).

Ello puede comprender también una o más especies de Factor IX que tienen 11 de los 12 residuos gamma-carboxiglutamato posibles. De éstas, la situación más probable es aquella en la que los 11 residuos Glu más próximos al término N del polipéptido están convertidos en Gla, pero el residuo Glu 12<sup>o</sup>, en la posición 40 como se

muestra en la Figura 1, se mantiene como Glu. Así pues, en esta situación, únicamente los residuos Glu 1 a 11 se han convertido en Gla (#1-11 Gla).

5 Ello puede comprender también una o más especies de Factor IX que tienen 10 de los 12 residuos gamma-carboxiglutamato posibles. De éstos, la más probable es la situación en la que los 10 residuos Glu más próximos al término N del polipéptido están convertidos en Gla, pero los residuos Glu 11° y 12°, en las posiciones 36 y 40, como se muestra en la Figura 1, se mantienen como Glu. Así, en esta situación, únicamente los residuos Glu 1 a 10 se han convertido en Gla (#1-10 Gla).

10 Ello puede comprender también una o más especies de Factor IX que tienen 9 de los 12 posibles residuos gamma-carboxiglutamato tales como #1-9 Gla. Ello puede comprender también una o más especies de Factor IX que tienen menos de 9, tal como 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o ninguno de los 12 residuos gamma-carboxiglutamato posibles.

15 La presente invención proporciona métodos para la purificación de una especie de polipéptido de este tipo. En particular, una especie de un polipéptido puede purificarse en relación con otras especies de dicho polipéptido en la muestra. Así, un método de la invención puede conducir a un método en la proporción relativa de una especie de interés en la muestra del polipéptido. Esto puede conseguirse por separación de una o más especies diferentes del polipéptido de la muestra, y aumento consiguiente de la proporción del polipéptido como un todo que se forma a partir de la especie de interés. Esto puede lograrse por separación específica de una o más especies particulares de la muestra, por la separación de una o más especies que no son la especie de interés de la muestra, o por separación de una fracción de la muestra en la cual la proporción de la especie de interés es menor que la de la muestra original. Cualquiera de estos enfoques puede conducir a un aumento global en la proporción de la especie de interés. Los métodos de la invención pueden conducir por tanto a un aumento o disminución en la proporción de una especie particular de polipéptido en una muestra que comprende una mezcla de especies diferentes de dicho polipéptido.

20 Un aumento en la proporción de una especie de polipéptido puede ser un aumento de hasta 5%, hasta 10%, hasta 20%, hasta 30%, o más en la proporción de dicha especie en la muestra del polipéptido como un todo. Una disminución en la proporción de una especie de polipéptido puede ser una disminución de hasta 5%, hasta 10%, hasta 20%, hasta 30%, hasta 50%, hasta 70%, hasta 90% o más en la proporción de dicha especie en la muestra del polipéptido como un todo. Una disminución en la proporción de una especie de polipéptido puede ser una disminución de hasta 5%, hasta 10%, hasta 20%, hasta 30%, hasta 50%, hasta 70%, hasta 90% o más en la cantidad de dicha especie que está presente comparada con la cantidad presente en la muestra original. Una disminución en la proporción de una especie de polipéptido puede ser la separación completa o sustancial de dicha especie de la muestra. Por ejemplo, un método de la invención puede purificar una muestra de un polipéptido por separación de la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de polipéptido detectable de una especie particular de la muestra. La cantidad de una especie de este tipo que queda en la muestra puede ser menor que 10%, menor que 5%, menor que 2%, o menor que 1% de la cantidad presente en la muestra original.

35 El propósito de los métodos de la invención es por tanto hacer posible que las proporciones relativas de las diferentes especies en una muestra del polipéptido se alteren. Especies diferentes pueden tener propiedades diferentes o actividades diferentes. Por cambio de la cantidad o proporción de dicha especie en una muestra del polipéptido, pueden alterarse las propiedades o la actividad de la muestra como un todo. Por ejemplo, donde diferentes especies de un polipéptido tienen niveles de actividad diferentes, por alteración de las proporciones de las diferentes especies a fin de aumentar la proporción de especies que tienen niveles más altos de actividad y/o por disminución de las proporciones de especies que tienen actividad menor o nula, puede aumentarse la actividad específica de la muestra, v.g. la actividad media por molécula de polipéptido o el porcentaje de la actividad máxima posible para dicha cantidad de polipéptido.

45 Por ejemplo, se ha encontrado que el Factor humano IX producido por medios recombinantes (rhFIX) exhibe una actividad específica de aproximadamente 50%. El fraccionamiento de una muestra de este tipo demostró que la misma contenía especies individuales de rhFIX con predominio de #1-8-, #1-9-, #1-10-, #1-11- y #1-12-Gla. Se ha encontrado que #1-11- y #1-12-Gla son totalmente activas en un ensayo de coagulación y en un ensayo de actividad de dos etapas. Las especies #1-8-, #1-9- y #1-10-Gla exhibían actividad reducida a aproximadamente 2-5%, 14-22% y 27-36% dependiendo del ensayo utilizado.

50 Por tanto, puede verse que diferentes especies de rhFIX, que varían sólo en su grado de gamma-carboxilación, exhiben niveles de actividad diferentes. Podría esperarse que una muestra con una proporción mayor de #1-11- y/o #1-12-Gla exhibiera una actividad específica mayor que una muestra que tenga una proporción menor de dichas especies. Podría esperarse que una muestra con una proporción mayor de #1-8- y/o #1-9- y/o #1-10-Gla exhibiera una menor actividad específica que una muestra que tenga una proporción menor de dichas especies.

55 Así, la actividad específica global de una muestra de Factor IX puede verse alterada por alteración de las proporciones de dicha especie en la muestra. En este caso, puede predecirse que la actividad específica global de una muestra de Factor IX puede aumentarse por uno cualquiera o más de lo siguiente:

- aumento de la proporción de #1-12-Gla en la muestra;

- aumento de la proporción de #1-11-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-10-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-9-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-8-Gla en la muestra;
- 5 • disminución de la proporción de #1-7-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-6-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-5-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-4-Gla en la muestra;
- disminución de la proporción de #1-3-Gla en la muestra;
- 10 • disminución de la proporción de #1-2-Gla en la muestra; y
- disminución de la proporción de #1-1-Gla en la muestra.

Uno cualquiera o más de estos cambios pueden seleccionarse cuando se purifica una muestra de Factor IX conforme a la presente invención.

- 15 Una muestra preferida de Factor IX comprenderá únicamente #1-11-Gla y #1-12-Gla y carecerá total o sustancialmente de especies que tengan grados menores de gamma-carboxilación que éste, tales como las especies #1-10-, #1-9- y #1-8-Gla.

Este enfoque puede aplicarse a composiciones existentes de hFIX. Por ejemplo, como se explica en esta memoria, se encontró que el hFIX utilizado en el Ejemplo 2 tiene 45,6% de #1-12-Gla, 36,0% de #1-11-Gla, 13,6% de #1-10-Gla, 3,3% de #1-9-Gla y 1,6% de #1-8-Gla. rhFIX está disponible comercialmente de Wyeth bajo la marca Benefix®. Benefix® tiene un contenido de #1-10-, #1-11-, y #1-12-Gla de aprox. 8-10%, 25-31% y 60-67%, respectivamente. Puede verse que los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar para aumentar la proporción de #1-11-Gla y/o #1-12-Gla en tales composiciones. Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para disminuir la proporción de especies menos gamma-carboxiladas tales como #1-10-Gla, #1-9-Gla y #1-8-Gla en tales formulaciones. Podría esperarse que esto mejorara la actividad específica del hFIX en una formulación de este tipo.

25 Puede utilizarse un enfoque similar en relación con otros polipéptidos que contienen Gla. Por ejemplo, Factor VII y Factor X pueden incluir hasta 11 residuos Gla. Como se muestra en el Ejemplo 4, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para alterar las proporciones de, por ejemplo, #1-9-, #1-10-, o #1-11-Factor VII. Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse por tanto para alterar las proporciones de diferentes especies de Factor VII dependiendo de su contenido de Gla. Por ejemplo, los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para aumentar la proporción de #1-10-Gla y/o #1-11-Gla en tales composiciones. Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para reducir la proporción de especies menos gamma-carboxiladas, por ejemplo #1-9-Gla e inferiores, en tales composiciones.

35 Análogamente, el Ejemplo 7 muestra que una formulación que comprende especies múltiples de Factor X puede procesarse conforme a un método de la invención a fin de alterar las proporciones de diferentes especies de Factor X que contienen Gla. Por selección de fracciones adecuadas durante la cromatografía de intercambio de aniones, pueden seleccionarse muestras que comprenden proporciones diferentes de distintas especies de Gla. Por ejemplo, puede verse por el Ejemplo 7 que los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para aumentar la proporción de #1-10-Gla y/o #1-11-Gla en tales composiciones. Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para reducir la proporción de especies menos gamma-carboxiladas tales como #1-9-Gla e inferiores.

40 La invención proporciona por tanto métodos que permiten que una especie de un polipéptido se purifique de otras especies del mismo polipéptido, en donde las especies difieren en la proporción en que las mismas están gamma-carboxiladas, o en el número de residuos Gla en su secuencia de aminoácidos.

45 Los métodos de la invención utilizan cromatografía de intercambio de aniones. La invención se refiere en particular a métodos en los que un polipéptido de interés está unido a un material de intercambio de aniones y la elución del polipéptido del material de intercambio de aniones se realiza utilizando un tampón que comprende acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio.

Un material de intercambio de aniones es un material de intercambio de anión que está cargado positivamente. El mismo tiene por tanto aniones libres que pueden intercambiarse por aniones en una solución acuosa pasada sobre o a través del material de intercambio de aniones. La carga puede proporcionarse por fijación de uno o más ligandos

cargados a la fase sólida, o puede tratarse de una propiedad inherente de la fase sólida. La fase sólida puede ser, por ejemplo, una columna de purificación, partículas o cuentas, una membrana o un filtro. En general, puede utilizarse una resina de intercambio de anión para la purificación de polipéptidos con un pI menor que aproximadamente 7. Materiales de intercambio de anión disponibles comercialmente que pueden utilizarse como se describe en esta memoria incluyen, por ejemplo, Sepharose Q Fast Flow, Macroprep 25Q, Poros HQ50, Source 30Q, Source 15Q, MiniQ, MonoQ, preferiblemente MiniQ, MonoQ, CaptoQ, Q Sepharose HP, Toyopearl QAE 550C, Unosphere Q, DE-AE Sepharose FF, Fratoprep DTEAE y Q HyperD20.

Un material de intercambio de anión puede utilizar un grupo de intercambio de anión fuerte tal como una amina cuaternaria. Un material de intercambio de anión puede utilizar un grupo de intercambio de anión débil tal como Dietilaminoetil (DEAE). Un material de intercambio de anión adecuado puede ser seleccionado por el especialista experto dependiendo, por ejemplo, del polipéptido particular a purificar.

El material de intercambio de anión puede seleccionarse dependiendo del polipéptido específico a purificar y las condiciones empleadas tales como pH, tampón, fuerza iónica, etc.

Un proceso de purificación convencional por cromatografía de intercambio de anión comprende usualmente uno o más pasos seleccionados de: equilibración del material de intercambio de anión, aplicación o carga de una muestra, uno o más pasos de lavado, elución y regeneración del material de intercambio iónico. Métodos estándar para la cromatografía de intercambio de aniones pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences.

La resina de intercambio de anión se equilibra preferiblemente antes de la carga del polipéptido de interés. El propósito de este paso de equilibración es ajustar las condiciones en el material de intercambio de anión para asemejarse más estrechamente a las utilizadas en los pasos subsiguientes del método. A fin de evitar los cambios en la composición de la fase móvil durante la cromatografía, el material de intercambio de aniones debería equilibrarse al pH y la composición iónica (v.g., conductividad, composición del tampón) del tampón de partida. Por ejemplo, la fuerza iónica (v.g., conductividad, pH) del tampón de equilibración puede seleccionarse de modo que sea lo más similar posible a la fuerza iónica de los tampones a utilizar en los pasos posteriores del método, tales como el tampón utilizado para cargar el polipéptido y/o el o los tampones de lavado.

El material de intercambio de anión puede equilibrarse por tanto utilizando un tampón que esté basado estrechamente en los tampones o formulaciones a utilizar en los pasos subsiguientes. Por ejemplo, puede utilizarse el mismo tampón para equilibración del material de intercambio de anión y para la carga de la muestra. Puede utilizarse el mismo tampón para equilibración del material de intercambio de anión y para lavado del material de intercambio de anión después que se ha cargado la muestra. El tampón de equilibración puede tener el mismo pH que la formulación de carga y/o el tampón de lavado. El tampón de equilibración puede tener la misma conductividad que la formulación de carga y/o el tampón de lavado. El tampón de equilibración puede utilizar la misma sustancia tampón que la formulación de carga y/o el tampón de lavado. El tampón de equilibración puede tener la misma concentración de la sustancia tampón que la formulación de carga y/o el tampón de lavado. El tampón de equilibración puede comprender componentes adicionales presentes también en la formulación de carga y/o el tampón de lavado, tales como detergentes.

El pH del tampón de equilibración puede determinarse dependiendo del polipéptido particular a purificar. Por ejemplo, para cierto número de polipéptidos tales como Factor IX, un pH de 9,0 o mayor no es óptimo, dado que pueden observarse autoactivación y/o degradación del polipéptido a estos valores de pH.

Un tampón de equilibración para uso en la presente invención puede formularse a, por ejemplo, un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,5, tal como desde pH 5,0 a pH 8,5. El pH de un tampón de equilibración puede ser mayor que aproximadamente 5,0, mayor que aproximadamente 5,5, mayor que aproximadamente 6,0, mayor que aproximadamente 6,5, mayor que aproximadamente 7,0, mayor que aproximadamente 7,5 o mayor que aproximadamente 8,0. El pH del tampón de equilibración puede ser menor que aproximadamente 8,5, menor que aproximadamente 8,0, menor que aproximadamente 7,5, menor que aproximadamente 7,0, menor que aproximadamente 6,5, menor que aproximadamente 6,0 o menor que aproximadamente 5,5. Puede combinarse cualquier combinación de tales puntos finales. Por ejemplo, el pH del tampón de equilibración puede ser mayor que aproximadamente 7,0 y menor que aproximadamente 8,5. El pH puede ser, por ejemplo, aproximadamente pH 7,0, 7,5, 8,0 u 8,5.

Estos valores de pH pueden ser adecuados para la equilibración de materiales de intercambio de anión para la purificación de polipéptidos como se describen en esta memoria, tales como Factor IX, Factor VII o Factor X.

Componentes adecuados para un tampón de equilibración pueden incluir una sustancia tampón, v.g., Tris, fosfato, MES, Hepes o carbonato. Para un método de cromatografía de intercambio de anión, es preferible un ion de tamponamiento positivo tal como Tris. Una sustancia tampón de este tipo puede utilizarse para mantener el tampón de equilibración a pH como se ha definido arriba. En una realización, se utilizan la misma sustancia tampón y concentración de sustancia tampón a todo lo largo del procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, el tampón de equilibración, el o los tampones de lavado y el tampón de elución pueden comprender todos

ellos la misma sustancia tampón a la misma concentración de sustancia tampón. La concentración de sustancia tampón debería ser suficiente para mantener la capacidad de tamponamiento y el pH constante durante el procedimiento de intercambio aniónico. Por ejemplo, la sustancia tampón y la concentración de sustancia tampón pueden seleccionarse para mantener un pH y capacidad de tamponamiento estables durante la aplicación de la muestra y durante la elución. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede estar comprendida, por ejemplo, entre 5 mM y 50 mM, tal como entre 20 mM y 40 mM. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede ser, por ejemplo, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o 25 mM.

Un tampón de equilibración puede comprender uno o más componentes adicionales. Un tampón de equilibración puede comprender un aditivo tal como etilenglicol, etanol, urea o un detergente utilizado para aumentar la solubilidad de una proteína. Un detergente utilizado en cromatografía de intercambio aniónico debería ser neutro o tener la misma carga que el material de intercambio aniónico. Detergentes no iónicos tales como Tween 80, Tween 20 o Triton X100 pueden utilizarse en una concentración de, por ejemplo, menor que 1%, menor que 0,5%, menor que 0,1%, o menor que 0,01%. Puede utilizarse una sal no-tampón, tal como NaCl para ajustar la fuerza iónica del tampón.

Una muestra que comprende el polipéptido de interés se carga en el material de intercambio aniónico. Esto se consigue por exposición de la muestra al material de intercambio aniónico en condiciones apropiadas (tales como conductividad y/o pH) de tal modo que el polipéptido está inmovilizado en o sobre el material de intercambio aniónico. Esta inmovilización o fijación se consigue por interacciones iónicas entre el polipéptido y grupos cargados del material de intercambio aniónico. Dicha fijación ocurre generalmente cuando la fuerza iónica de la fase móvil en contacto con el material de intercambio aniónico se reduce hasta el punto de que los grupos iónicos del polipéptido de interés comienzan a servir como los contraiones para los grupos cargados en el material de intercambio aniónico.

La muestra a purificar en un método de la invención puede ser cualquier muestra que comprenda un polipéptido como se describe anteriormente. Preferiblemente, la muestra comprende más de una especie diferente del mismo polipéptido en la que las especies varían en el grado y/o la localización de su gamma-carboxilación.

Como se ha mencionado arriba, el polipéptido de interés puede obtenerse utilizando cualesquiera procedimientos de rutina. Por ejemplo, el polipéptido puede obtenerse a partir de una fuente *in vivo*, por ejemplo a partir de un animal, o puede producirse *in vitro*, por ejemplo, en un tejido o célula. El polipéptido de interés puede producirse recombinantemente, por ejemplo por inducción de la expresión del polipéptido en una célula. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede producirse en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con un polinucleótido que codifica, y es susceptible de expresar, el polipéptido. Una célula hospedadora de este tipo puede cultivarse en condiciones que permiten la expresión del polipéptido. El polipéptido puede recuperarse luego del medio de cultivo o de las propias células hospedadoras.

Preferiblemente, el polipéptido se purifica antes de ser aplicado a la resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, el polipéptido puede someterse a uno o más pasos de purificación tales como precipitación, inmunoprecipitación, enfoque isoeléctrico, filtración, centrifugación o cromatografía tal como otra cromatografía de intercambio aniónico.

Dicha purificación puede utilizarse para eliminar, parcial o totalmente, uno o más contaminantes de la muestra y aumentar con ello el grado de pureza del polipéptido de interés. El contaminante puede ser cualquier molécula que no sea el polipéptido de interés. Por ejemplo, el contaminante puede ser un polipéptido diferente, un ácido nucleico o una endotoxina. El contaminante puede ser una variante del polipéptido de interés, tal como un polipéptido truncado o extendido, una forma desamidada del polipéptido, un polipéptido plegado incorrectamente o una forma del polipéptido que tenga glicosilación no deseada. El contaminante puede ser una molécula que podría interferir con la cromatografía de intercambio iónico.

Preferiblemente, el polipéptido de interés tiene una pureza de al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 90% o más. Muy preferiblemente, el polipéptido tiene una pureza de al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 97% o al menos 99%. La pureza debe entenderse que se refiere a la proporción del peso seco total que está constituida por el polipéptido de interés. La muestra puede comprender menos de 25% en peso de contaminantes como se ha descrito arriba, tal como menos de 25% en peso de proteínas distintas del polipéptido de interés, más preferiblemente menos de 20%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 3% o menos de 1%. La muestra puede ser una muestra pura o sustancialmente pura del polipéptido de interés. La muestra puede ser una muestra aislada o sustancialmente aislada del polipéptido de interés.

Una muestra de polipéptido de este tipo puede aplicarse al material de intercambio aniónico en una forma obtenida directamente por síntesis de polipéptidos, tal como en la forma de una muestra del medio de cultivo de células que producen recombinantemente el polipéptido o una muestra de células lisadas que expresan el polipéptido. Una muestra de polipéptido puede aplicarse al material de intercambio aniónico en una forma purificada o parcialmente purificada como se describe en esta memoria. Una muestra como se describe en esta memoria puede formularse ulteriormente antes de la aplicación al material de intercambio aniónico. Por ejemplo, cuando el polipéptido (o polipéptido purificado) se proporciona en forma sólida, el mismo puede formularse en una composición líquida para aplicación al material de intercambio aniónico. Por ejemplo, la misma puede formularse en agua, un tampón u otro disolvente. Preferiblemente, la composición líquida es acuosa. Cuando el polipéptido o polipéptido purificado se

proporciona en una forma líquida o acuosa, o cuando una muestra de polipéptido sólido se ha formulado en una forma líquida como se describe arriba, la formulación de la muestra puede ajustarse antes de aplicar la misma al material de intercambio aniónico.

- 5 Por ejemplo, la conductividad y/o el pH de la muestra o muestra formulada pueden ajustarse utilizando métodos de rutina. El pH de la muestra puede ajustarse de modo que sea el mismo que, o sustancialmente el mismo que, el de los tampones utilizados para equilibración del material de intercambio aniónico y/o lavado del material de intercambio aniónico. La conductividad de la muestra puede ajustarse de modo que sea la misma que, o sustancialmente la misma que, la de los tampones utilizados para equilibración del material de intercambio aniónico y/o lavado del material de intercambio aniónico. La muestra puede formularse con una sustancia tampón, tal como  
10 cualquiera de las sustancias tampón expuestas anteriormente en relación con la composición del tampón de equilibración. La muestra puede formularse en el mismo tampón utilizado para equilibración del material de intercambio aniónico y/o lavado del material de intercambio aniónico. La muestra puede formularse en la misma sustancia tampón y/o la misma concentración de sustancia tampón y/o el mismo pH y/o la misma conductividad que el tampón utilizado para equilibración del material de intercambio aniónico y/o lavado del material de intercambio  
15 aniónico. En una realización, se formula un polipéptido de interés para aplicación a un material de intercambio aniónico por adición del mismo a un tampón idéntico al tampón de equilibración que esté siendo utilizado.

El polipéptido se carga luego en el material de intercambio iónico por paso de la formulación relevante del polipéptido sobre o a través del material de intercambio aniónico en condiciones que permiten la fijación del polipéptido al material de intercambio aniónico. Tales métodos son rutinarios en la técnica.

- 20 Una vez que el polipéptido de interés se carga en la columna de intercambio aniónico, la columna puede someterse a uno o más lavados. El lavado se realiza haciendo pasar una solución apropiada a través de o sobre el material de intercambio aniónico. El propósito de tales lavados puede incluir la separación de cualquier polipéptido u otros componentes que no se fijan al material de intercambio aniónico; la separación de cualquier polipéptido u otros componentes que se fijan sólo débilmente al material de intercambio aniónico; la separación de impurezas que se fijan al material de intercambio aniónico con menor afinidad que el polipéptido de interés.  
25

- En una realización, después de la carga del polipéptido sobre el material de intercambio aniónico, el material de intercambio aniónico se lava con un tampón a fin de eliminar cualquier polipéptido no fijado, contaminantes o impurezas. Por ejemplo, el tampón de lavado puede ser idéntico, o sustancialmente idéntico, al tampón en el cual se formuló el polipéptido para carga sobre el material de intercambio aniónico. El tampón de lavado puede ser idéntico, o sustancialmente idéntico al tampón de equilibración. Por ejemplo, puede realizarse un lavado utilizando el mismo  
30 tampón que el tampón de equilibración o el mismo tampón utilizado para formular el polipéptido. Puede realizarse un lavado utilizando un tampón que tiene el mismo o sustancialmente el mismo pH y/o la misma o sustancialmente la misma conductividad que el tampón de equilibración o el tampón utilizado para formular el polipéptido. Puede realizarse un lavado utilizando un tampón que comprende la misma sustancia tampón a la misma o sustancialmente la misma concentración que la utilizada en el tampón de equilibración o para la formulación del polipéptido.  
35

- Pueden realizarse otros lavados alternativa o adicionalmente utilizando tampones que son diferentes del tampón de equilibración. Por ejemplo, puede ser posible eliminar contaminantes del material de intercambio aniónico que se fijan al material de intercambio aniónico menos fuertemente que el polipéptido de interés. Tales contaminantes se liberarán del material de intercambio aniónico más fácilmente que el polipéptido de interés. Por ejemplo, el material de intercambio aniónico puede lavarse con un tampón que tiene una conductividad o fuerza iónica mayor que el  
40 tampón de equilibración y/o la formulación en la cual se cargó el polipéptido. Por aumento de la fuerza iónica del tampón, puede conseguirse la elución de componentes del material de intercambio aniónico. Preferiblemente, el tampón de lavado se selecciona, o se utiliza en un volumen suficientemente pequeño tal que sustancialmente no se eluye cantidad alguna del polipéptido de interés del material de intercambio aniónico.

- 45 Los tampones para lavado pueden ser seleccionados por un especialista experto dependiendo de la naturaleza de la muestra particular y el polipéptido de interés. Por ejemplo, pueden seleccionarse tampones que tengan un pH o conductividad particulares para permitir la separación de polipéptidos o impurezas particulares que se fijarán a la resina menos fuertemente que el polipéptido de interés. Tales tampones pueden seleccionarse y optimizarse su uso por experimentos de rutina simples, por ejemplo por monitorización de la composición de la solución separada de la  
50 columna.

El pH de un tampón de lavado puede determinarse dependiendo del polipéptido particular a purificar. Por ejemplo, para cierto número de polipéptidos, tales como Factor IX, un pH de 9,0 o mayor no es óptimo, dado que puede observarse autoactivación y/o degradación del polipéptido a estos valores de pH.

- Un tampón de lavado adecuado para uso en la presente invención puede formularse a, por ejemplo, un pH de  
55 aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,5, tal como desde pH 5,0 a pH 8,5. El pH de un tampón de lavado puede ser mayor que aproximadamente 5,0, mayor que aproximadamente 5,5, mayor que aproximadamente 6,0, mayor que aproximadamente 6,5, mayor que aproximadamente 7,0, mayor que aproximadamente 7,5 o mayor que aproximadamente 8,0. El pH del tampón de lavado puede ser menor que aproximadamente 8,5, menor que aproximadamente 8,0, menor que aproximadamente 7,5, menor que aproximadamente 7,0, menor que

aproximadamente 6,5, menor que aproximadamente 6,0 o menor que aproximadamente 5,5. Cualquier combinación de tales puntos finales puede combinarse. Por ejemplo, el pH del tampón de lavado puede ser mayor que aproximadamente 7,0 y menor que aproximadamente 8,5. El pH puede ser, por ejemplo, aproximadamente pH 7,0, 7,5, 8,0 u 8,5.

- 5 Estos valores de pH pueden ser adecuados para el lavado de materiales de intercambio aniónico para la purificación de polipéptidos como se describen en esta memoria, tales como Factor IX, Factor VII o Factor X.

Componentes adecuados para un tampón de lavado pueden incluir una sustancia tampón, v.g. Tris, fosfato, MES, Hepes o carbonato. Para un método de cromatografía de intercambio aniónico, se prefiere un ion de tamponamiento positivo tal como Tris. Puede utilizarse una sustancia tampón de este tipo para mantener el tampón de lavado a un pH como se define anteriormente. Una concentración adecuada de sustancia tampón puede ser, por ejemplo, entre 5 mM y 50 mM, tal como entre 10 mM y 40 mM. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede ser, por ejemplo, entre 5 mM y 50 mM, tal como entre 10 mM y 40 mM. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede ser, por ejemplo, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o 25 mM.

- 10

Un tampón de lavado puede comprender uno o más componentes adicionales. Un tampón de lavado puede comprender un aditivo tal como etilenglicol, etanol, urea o un detergente utilizado para aumentar la solubilidad de una proteína. Un detergente utilizado en cromatografía de intercambio aniónico debería ser neutro o tener la misma carga que el material de intercambio aniónico. Detergentes no iónicos tales como Tween 80, Tween 20 o Triton X100 pueden utilizarse en una concentración de, por ejemplo, menor que 1%, menor que 0,5%, menor que 0,1% o menor que 0,01%. Una sal no tamponizante, tal como NaCl puede utilizarse para ajustar la fuerza iónica del tampón.

- 15

La elución de una molécula de un material de intercambio aniónico significa separación de la molécula del material de intercambio aniónico. Esto se consigue generalmente por alteración de la fuerza iónica del tampón que rodea el material de intercambio aniónico de tal manera que el tampón compite con la molécula por los grupos cargados del material de intercambio aniónico. La fuerza de fijación de la molécula para el material de intercambio aniónico disminuye por tanto y se desprende la misma. La elución de un material de intercambio aniónico puede conseguirse también en algunos casos por utilización de una molécula que altera la conformación del polipéptido de interés, reduciendo así la fuerza de fijación y causando la liberación del polipéptido del material de intercambio aniónico.

- 20

El pH del tampón de elución puede determinarse dependiendo del polipéptido particular a purificar. Por ejemplo, para cierto número de polipéptidos tales como Factor IX, no es óptimo un pH de 9,0 o mayor, dado que puede observarse autoactivación y/o degradación del polipéptido a estos valores de pH.

- 25

Un tampón de elución adecuado para uso en la presente invención puede formularse a, por ejemplo, un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,5, tal como desde pH 5,0 a pH 8,5. El pH de un tampón de elución puede ser mayor que aproximadamente 5,0, mayor que aproximadamente 5,5, mayor que aproximadamente 6,0, mayor que aproximadamente 6,5, mayor que aproximadamente 7,0, mayor que aproximadamente 7,5 o mayor que aproximadamente 8,0. El pH del tampón de elución puede ser menor que aproximadamente 8,5, menor que aproximadamente 8,0, menor que aproximadamente 7,5, menor que aproximadamente 7,0, menor que aproximadamente 6,5, menor que aproximadamente 6,0 o menor que aproximadamente 5,5. Cualquier combinación de tales puntos finales puede combinarse. Por ejemplo, el pH del tampón de elución puede ser mayor que aproximadamente 7,0 y menor que aproximadamente 8,5. El pH puede ser, por ejemplo, aproximadamente pH 7,0, 7,5, 8,0 u 8,5.

- 30

Estos valores de pH pueden ser adecuados para la elución de materiales de intercambio aniónico para la purificación de polipéptidos como se describen en esta memoria, tales como Factor IX, Factor VII o Factor X.

- 40

Componentes adecuados para un tampón de elución pueden incluir una sustancia tampón, v.g., Tris, fosfato, MES, Hepes o carbonato. Para un método de cromatografía de intercambio aniónico, se prefiere un ion de tamponamiento positivo tal como Tris. Puede utilizarse una sustancia tampón de este tipo para mantener el tampón de elución a un pH como se ha definido arriba. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede ser, por ejemplo, entre 5 mM y 50 mM, tal como entre 10 mM y 40 mM. Una concentración de sustancia tampón adecuada puede ser, por ejemplo, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o 25 mM.

- 45

Un tampón de elución puede comprender uno o más componentes adicionales. Un tampón de elución puede comprender un aditivo tal como etilenglicol, urea o un detergente utilizado para aumentar la solubilidad de una proteína. Un detergente utilizado en cromatografía de intercambio aniónico debería ser neutro o tener la misma carga que el material de intercambio aniónico. Detergentes no iónicos tales como Tween 80, Tween 20 o Triton X100 pueden utilizarse en una concentración de, por ejemplo, menor que 1%, menor que 0,5%, menor que 0,1% o menor que 0,01%. Una sal no tamponizante, tal como NaCl, puede utilizarse para ajustar la fuerza iónica del tampón.

- 50

Para uso de acuerdo con la presente invención, el tampón de elución comprenderá preferiblemente una o más sales caotrópicas, tales como una o más sales seleccionadas de acetato de amonio, cloruro de amonio y acetato de sodio. La sal caotrópica tal como acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio puede estar presente en el

- 55

tampón de elución a una concentración de al menos 0,1 M, al menos 0,2 M, al menos 0,5 M, al menos 1,0 M o al menos 1,5 M. La sal caotrópica tal como acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio puede estar presente en una concentración de hasta 2,0 M, hasta 1,9 M, hasta 1,5 M o hasta 1,0 M. Uno cualquiera de estos puntos finales inferiores puede combinarse con uno cualquiera de estos puntos finales superiores para formar un intervalo de concentración adecuado. La sal caotrópica tal como acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio puede estar presente a cualquier concentración hasta aproximadamente 2,0 M. Por ejemplo, la sal caotrópica tal como acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio puede estar presente en una concentración de hasta aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9 o aproximadamente 2,0 M, muy preferiblemente en una concentración de aproximadamente 0,6 M.

En una realización, el tampón de elución tiene la misma composición que un tampón de lavado y/o el tampón de equilibración, excepto que el tampón de elución comprende adicionalmente sal caotrópica. Una sal caotrópica preferida es una o más de acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio como se ha descrito arriba. Así, el tampón de elución puede tener cualquier composición descrita en esta memoria para un tampón de lavado o tampón de equilibración, pero puede comprender adicionalmente acetato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de sodio.

En una realización, el tampón de equilibración y el tampón de lavado son idénticos y el tampón de elución difiere de ellos únicamente en que el tampón de elución comprende también acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio.

La elución puede realizarse utilizando un gradiente isocrático o lineal de la sal caotrópica, tal como un gradiente isocrático o lineal de acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio. La elución puede realizarse utilizando un cambio gradual en la concentración de la sal caotrópica en el tampón. La adición puede realizarse por cualquier combinación de estos enfoques de elución. Por ejemplo, la elución isocrática a una concentración dada de sal caotrópica puede ir seguida por un aumento de la concentración de la sal sea en la forma de un gradiente o en uno o más pasos.

En cualquier método de elución de este tipo, los diferentes componentes se liberarán del material de intercambio aniónico en tiempos diferentes, dependiendo de la fuerza de su unión. Los componentes que se fijan menos fuertemente tenderán a liberarse antes o a una conductividad menor del tampón tal como una concentración menor de sal. Los componentes que se fijan más fuertemente tenderán a quedar retenidos en el material de intercambio aniónico durante más tiempo o hasta una concentración mayor de sal. El eluyente que ha pasado a través de o por el material de intercambio aniónico puede monitorizarse para identificar cuándo se eluyen los componentes particulares. El eluyente puede acumularse en diferentes momentos y cada acumulación analizarse para determinar qué componentes están presentes en cualesquiera acumulaciones. Pueden seleccionarse luego acumulaciones particulares que tengan la formulación deseada, por ejemplo concentraciones mayores de especies polipeptídicas particulares o concentraciones menores de otras especies de polipéptidos.

La elución isocrática como se describe en esta memoria utiliza una concentración fija o constante de la sal. Se utiliza un tampón de elución que comprende dicha concentración de la sal, tal como cualquiera de las concentraciones expuestas anteriormente. El tampón de elución se hace pasar a través de o por el material de intercambio aniónico, y el eluyente se monitoriza para identificar en qué momento ocurre la elución. Utilizando elución isocrática, los componentes que tienen menor afinidad de fijación para el material de intercambio aniónico se liberarán más pronto, cuando se ha utilizado un volumen menor de tampón de elución, que los componentes que tienen una mayor afinidad de fijación, los cuales pueden requerir mayores volúmenes de tampón de elución para pasar a través de o por el material de intercambio aniónico. Por selección de acumulaciones o lotes particulares de eluyente obtenidos en diferentes momentos, pueden obtenerse muestras que tienen composiciones diferentes de especies polipeptídicas.

La elución en gradiente puede conseguirse por aumento de la concentración de la sal en el tampón hasta una concentración final máxima, tal como una concentración como la expuesta anteriormente en esta memoria. Por ejemplo, un gradiente lineal puede utilizar desde 0% a 100% de la concentración final de la sal caotrópica. Este gradiente puede aplicarse al material de intercambio aniónico a lo largo de un periodo de tiempo, tal como más de 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150 o más volúmenes de columna. Utilizando dicha elución en gradiente, los componentes que tienen menor afinidad de fijación para el material de intercambio aniónico se liberarán más pronto, a una concentración de sal menor, que los componentes que tienen una afinidad de fijación mayor, los cuales pueden requerir una concentración mayor de sal para que tenga lugar la elución. Por selección de acumulaciones o lotes particulares de eluyente obtenidos en diferentes momentos, pueden obtenerse muestras que tienen diferentes composiciones de especies polipeptídicas.

En lugar de utilizar un gradiente gradual para aumentar la concentración de la sal caotrópica, puede utilizarse un aumento escalonado. Es decir, la concentración de la sal puede aumentarse hasta una concentración final máxima en uno o más pasos discretos. Esto puede utilizarse para reflejar los efectos de una reacción en gradiente, en donde

los diferentes componentes se liberan a concentraciones diferentes y por tanto en pasos diferentes. La elución escalonada puede combinarse alternativamente con la elución isocrática. Por ejemplo, un aumento escalonado en concentración de sal puede mantenerse para cierto número de volúmenes de columna del tampón de elución, de tal modo que puede tener lugar una elución isocrática a dicha concentración, eluyéndose los diferentes componentes a medida que se utilizan volúmenes crecientes del tampón. Pueden utilizarse también pasos adicionales subsiguientes en concentración de sal.

En las realizaciones en que el tampón de elución difiere del tampón de lavado únicamente en la presencia de una sal tal como acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio en el tampón de elución, puede obtenerse un tampón de elución para elución isocrática por adición de una cantidad de la sal al tampón de lavado, puede realizarse elución en gradiente por adición gradual de la sal a la solución de tampón de lavado y puede conseguirse una elución escalonada por adición de cantidades de la sal al tampón de lavado a fin de aumentar la concentración de la sal en el tampón en pasos discretos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de actividad de diferentes especies de FIX gamma-carboxiladas

Se produjo Factor IX (FIX) humano recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). Se midió la actividad específica del FIX, encontrándose un valor de aproximadamente 50%.

Se fraccionaron especies individuales de FIX con predominio de #1-8-, #1-9-, #1-10-, #1-11- y #1-12-Gla.

Se utilizó un ensayo de coagulación para medir el tiempo dependiente de la actividad de FIX hasta la formación del coágulo de fibrina. Un activador de contacto (ácido eláxico en el reactivo APTT) para estimular la producción de FXIIa y se cebó luego por re-calcificación y adición de fosfolípidos. Las actividades se midieron contra BeneFIX y plasma humano acumulado normal, que se calibró contra un estándar WHO de FIX humano.

Se utilizó un kit de ensayo disponible comercialmente conocido como 'Hyphen BioMed Chromogenic Factor IX kit' (Aniara) para evaluar el nivel de actividad de rhFIX. En este ensayo, el Factor XIa activa el Factor IX a Factor IXa, que junto con el Factor VIII:C activado, fosfolípidos y  $Ca^{2+}$ , activa el Factor X a Factor Xa. La cantidad de Factor Xa generada se midió a 405 nm por la cantidad de pNA liberada del sustrato cromogénico específico SXA-11 del Factor Xa.

Se encontró que las especies #1-11- y #1-12-Gla eran plenamente activas en los ensayos de actividad y de coagulación y de la etapa 2. Las especies #1-8-, #1-9- y #1-10-Gla disminuían en actividad hasta aproximadamente 2-5%, 14-22% y 27-36%, respectivamente, dependiendo del ensayo utilizado.

Ejemplo 2: Purificación y análisis de diferentes especies de FIX gamma-carboxiladas

Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas para Factor IX humano recombinante (rhFIX). El método utilizó una columna SOURCE 15Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 6 ml, un caudal de 3 ml/min y una temperatura de 4°C.

La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de rhFIX. Se cargó un total de aproximadamente 13 mg. La muestra de carga se ajustó a pH 8,0 utilizando NaOH 0,1 M.

Los tampones utilizados eran como sigue:

Tampón de equilibración: Tris/NaOH 20 mM, pH 8,0, 0,01% Tween 80.

Tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, acetato de amonio 1,5 M, pH 8,0, 0,01% Tween 80.

CIP: NaOH 1M.

El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico era como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	10	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	5	20 % (isocrática)

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Elución	Tampón de elución	20	20-40% (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	65% (isocrática)
Elución	Tampón de elución	5	100% (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	20	0%

El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestran en las Figuras 2 y 3.

Se seleccionó una acumulación de la fracción C12-D3, que producía 9,6 mg/74%. El contenido de Gla de esta acumulación se comparó con el de la muestra original utilizada para cargar la muestra anterior.

- 5 Se realizaron análisis del contenido de Gla de fracciones individuales utilizando un sistema HPLC Agilent. Los análisis del contenido de Gla basados en el método HPLC estaban correlacionados con los análisis de contenido de Gla obtenidos utilizando análisis de secuenciación N-terminal e hidrólisis de aminoácidos básicos. La HPLC utilizó una columna MiniQ PC3.2/3 (GE Healthcare cat. No. 17:0686-01) a un caudal de 0,18 ml/min. Los tampones utilizados en este sistema eran:

A-Tampón: Tris/NaOH 20 mM, pH 9,0

- 10 B-Tampón: Tris/HCl 20 mM, pH 9,0, acetato de amonio 1,5 M

Las señales medidas en este sistema eran UV280 y la señal de fluorescencia (ex: 280 nm / em: 340 nm).

El procedimiento HPLC fue como sigue:

0 - 5 min.	0 - 30 % B
5 - 55 min.	30 - 55 % B
55 - 65 min.	55 - 100 % B

- 15 Una comparación de la distribución de Gla antes y después de la separación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se ha descrito arriba se muestra en la Figura 4. Estos resultados pueden presentarse también como sigue:

%-#Gla	Antes	Después	BeneFIX®, incl. para comparación
%-#1-8	1,6	0	0
%-#1-9	3,3	0	3
%-#1-10	13,6	6,7	10
%-#1-11	36,0	40,7	27
%-#1-12	45,6	52,6	60

La purificación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se ha indicado arriba condujo así a la separación de la totalidad de #1-8- y #1-9-Gla detectables de la muestra FIX original. Había también una disminución en la presencia de #1-10-Gla y un aumento consiguiente en las proporciones de #1-11- y #1-12-Gla.

- 20 En el conjunto purificado final, la actividad específica aumentaba también a aprox. 110% comparada con Benefix (ensayo de actividad en dos etapas, cálculos de los datos no presentados).

**EJEMPLO 3: Purificación y análisis de diferentes especies de FIX gamma-carboxiladas**

Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas para FIX humano recombinante. El método utilizó una columna SOURCE 30Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 6 ml, un caudal de 2 ml/min y una temperatura de 4°C.

- 5 La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de FIX. Se cargaron un total de aprox. 2,5 mg. La muestra de carga se ajustó a pH 8,0 utilizando NaOH 0,1 M.

Los tampones utilizados eran como sigue:

Tampón de equilibración: Tris/NaOH 20 mM, pH 8,0, 0,01% Tween 80.

Tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, acetato de amonio 1,5 M, pH 8,0, 0,01% Tween 80.

- 10 CIP: NaOH 1M.

El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico era como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	10	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	5	25 % (isocrática)
Elución	Tampón de elución	20	25-45% (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	100% (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	20	0%

El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestra en las Figuras 5 y 6.

Se seleccionó un conjunto de la fracción C12-D13, que produjo aproximadamente 1,75 mg/70%. El contenido de Gla de este conjunto se comparó con el de la muestra original utilizada para la muestra de carga arriba indicada. Los análisis del contenido de Gla de fracciones individuales se realizaron utilizando un sistema HPLC Agilent como se describe en el Ejemplo 2.

- 15

Una comparación de la distribución de Gla antes y después de la separación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se ha descrito arriba se muestra en la tabla siguiente.

%-#Gla	Antes	Después	BeneFIX®, incl. para comparación
%-#1-8	1,0	0	0
%-#1-9	3,3	0	3
%-#1-10	12,7	2,3	10
%-#1-11	32,2	25,7	27
%-#1-12	50,8	72,0	60

La purificación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se muestra anteriormente condujo así a la separación de la totalidad de #1-8- y #1-9-Gla detectable de la muestra FIX original. Se apreciaba también una disminución en la presencia de #1-10-Gla y un aumento consiguiente en las proporciones de #1-11- y #1-12-Gla.

EJEMPLO 4: Purificación y análisis de diferentes especies de FVII gamma-carboxiladas

- 5 Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas para Factor VIIa humano recombinante (FVII). El método utilizó una columna SOURCE 15Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 1,7 ml, un caudal de 0,75 ml/min y una temperatura de 4°C.

- 10 La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de FVII producido en células CHO. Se cargó un total de aproximadamente 1,8 mg. Se añadió a la muestra de carga EDTA 50 mM procedente de una solución stock 1 M y se ajustó a pH 8,0 utilizando NaOH 0,1 M.

Los tampones utilizados eran como sigue:

Tampón de equilibración: Tris/NaOH 20 mM, pH 8,0

Tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, acetato de amonio 1,5 M, pH 8,0

CIP: NaOH 1M.

- 15 El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico fue como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	5	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	100	0-100 % (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	100 % (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	10	0%

El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestra en las Figuras 7 y 8.

Se realizaron análisis del contenido de Gla de fracciones individuales (22 a 27) utilizando un sistema HPLC Agilent como se describe en el Ejemplo 2.

- 20 Una comparación de la distribución de las especies Gla FVII separadas utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se ha descrito arriba se muestra en la Tabla siguiente:

Especie Gla* (%)	Fracciones						Antes de la separación (muestra de carga)
	22	23	24	25	26	27	
%-#1-8	100,0	100,0	11,0	-	-	-	< 1 %
%-#1-9	-	-	89,0	100,0	69,2	36,7	65
%-#1-10	-	-	-	-	30,8	63,3	34

\* Obsérvese que FVII contiene sólo 10 Gla residuos Gla en total.

La purificación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se ha indicado arriba condujo a una separación clara de especies Gla de FVIIa. Así, puede prepararse una composición de especies Gla FVII de una manera preferida por el investigador.

EJEMPLO 5: Purificación y análisis de diferentes especies de FIX gamma-carboxiladas

- 5 Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas para FIX humano recombinante. El método utilizó una columna SOURCE 15Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 1,7 ml, un caudal de 0,75 ml/min y una temperatura de 4°C.

La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de FIX. Se cargaron un total de aprox. 2 mg. La muestra de carga se ajustó a pH 8,5 utilizando NaOH 0,1 M.

- 10 Los tampones utilizados fueron como sigue:

Tampón de equilibración: Tris/NaOH 20 mM, pH 8,5

Tampón de elución: Tris/NaOH 20 mM, cloruro de amonio 1,0 M, pH 8,5

CIP: NaOH 1M.

El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico fue como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	5	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	100	0-100% (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	100% (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	10	0%

- 15 El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestra en las Figuras 9 y 10.

Se realizaron análisis del contenido de Gla de fracciones individuales (E7 a F12) utilizando un sistema HPLC Agilent como se describe en el Ejemplo 2.

Una comparación de la distribución de las especies Gla FIX separadas utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se describe arriba se muestra en la tabla siguiente.

Especie Gla (%)	Antes de la separación (muestra de carga)	Fracciones							Benefix®
		E7	E8	E9	E10	E11	E12	F12	
Gla#8	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Gla#9	3,3	-	-	-	-	-	-	-	3
Gla#10	12,7	18,9	-	-	-	-	-	-	10
Gla#11	32,2	81,1	73,7	46,3	22,6	13,4	10,4	7,1	27

Especie Gla (%)	Antes de la separación (muestra de carga)	Fracciones							Benefix®
		E7	E8	E9	E10	E11	E12	F12	
<b>Gla#12</b>	50,8	-	26,3	53,7	77,4	86,6	89,6	92,9	60

La purificación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se muestra anteriormente condujo a una separación clara de las especies Gla FIX. Así pues, puede prepararse una composición de especies Gla FIX de una manera preferida por el investigador.

EJEMPLO 6: Purificación y análisis de diferentes especies de FIX gamma-carboxiladas

- 5 Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas para FIX humana recombinante. El método utilizó una columna SOURCE 15Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 1,7 ml, un caudal de 0,75 ml/min y una temperatura de 4°C.

La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de FIX. Se cargó un total de aprox. 2 mg. La muestra de carga se ajustó a pH 8,0 utilizando NaOH 0,1 M.

- 10 Los tampones utilizados fueron los siguientes:

Tampón de equilibración: Tris/NaOH 20 mM, pH 8,0

Tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, acetato de sodio 1,0 M, pH 8,0

CIP: NaOH 1 M.

El procedimiento de la cromatografía de intercambio aniónico fue como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	10	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	5	10% (isocrática)
Elución	Tampón de elución	40	10-60% (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	100% (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	10	0%

- 15 El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestra en las Figuras 11 y 12.

Los análisis del contenido de Gla de las fracciones individuales (E5 a E1) se realizaron utilizando un sistema HPLC Agilent como se describe en el Ejemplo 2.

Una comparación de la distribución de las especies Gla FIX separadas utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se describe arriba se muestra en la tabla siguiente.

Especie Gla (%)	Antes de la separación (Aplicación)	Fracciones						Benefix®
		D5	D4	D3	D2	D1	E1	
Gla#8	1,1	-	-	-	-	-	-	-
Gla#9	2,7	16,5	3,1	-	-	-	-	3
Gla#10	12,5	49,8	27,8	6,0	5,1	4,4	5,0	10
Gla#11	26,1	12,2	42,4	26,8	18,5	19,1	18,7	27
Gla#12	57,5	21,5	26,8	67,2	76,4	76,5	76,4	60

La purificación utilizando cromatografía de intercambio aniónico como se muestra arriba condujo a cierta separación de las especies Gla FIX. Así pues, puede prepararse una composición de especies Gla FIX de una manera preferida por el investigador.

EJEMPLO 7: Purificación y análisis de diferentes especies de FX gamma-carboxiladas

5 Se utilizó cromatografía de intercambio aniónico para la separación de diferentes formas gamma-carboxiladas de un constructo de FX humano recombinante en el cual el péptido de activación de FX ha sido cambiado por un péptido de activación del fibrinopéptido A (DFLAEGGVR) y se ha añadido una etiqueta HPC4 al término C (DQVDPRLIDGK). El método utilizaba una columna SOURCE 15Q (GE Healthcare) con un volumen de lecho de 1,7 ml, un caudal de 0,75 ml/min y una temperatura de 4°C.

10 La muestra cargada a la columna ("muestra de carga") era de dicho constructo FX. Se cargó un total de aproximadamente 2,5 mg. La muestra de carga se ajustó a pH 8,0 utilizando NaOH 0,1 M.

Los tampones utilizados fueron los siguientes:

Tampón de equilibración: Tris 20 mM, pH 8,0

Tampón de elución: Tris/HCl 20 mM, acetato de amonio 1,5 M, pH 8,0

15 CIP: NaOH 1 M.

El procedimiento de cromatografía de intercambio aniónico fue como sigue:

Paso	Tampón	CV	%-tampón de elución
Equilibración	Tampón de equilibración	5	0%
Aplicación			
Lavado	Tampón de equilibración	5	0%
Elución	Tampón de elución	100	0-100% (gradiente)
Elución	Tampón de elución	5	100% (isocrática)
CIP1	NaOH	5	0%
CIP2	Tampón de elución	10	100% (isocrática)
Reequilibración	Tampón de equilibración	10	0%

El resultado de esta cromatografía de intercambio aniónico se muestra en la Figura 13.

Se realizaron análisis del contenido de Gla de fracciones individuales utilizando un sistema HPLC Agilent como se describe en el ejemplo 2.

## ES 2 576 109 T3

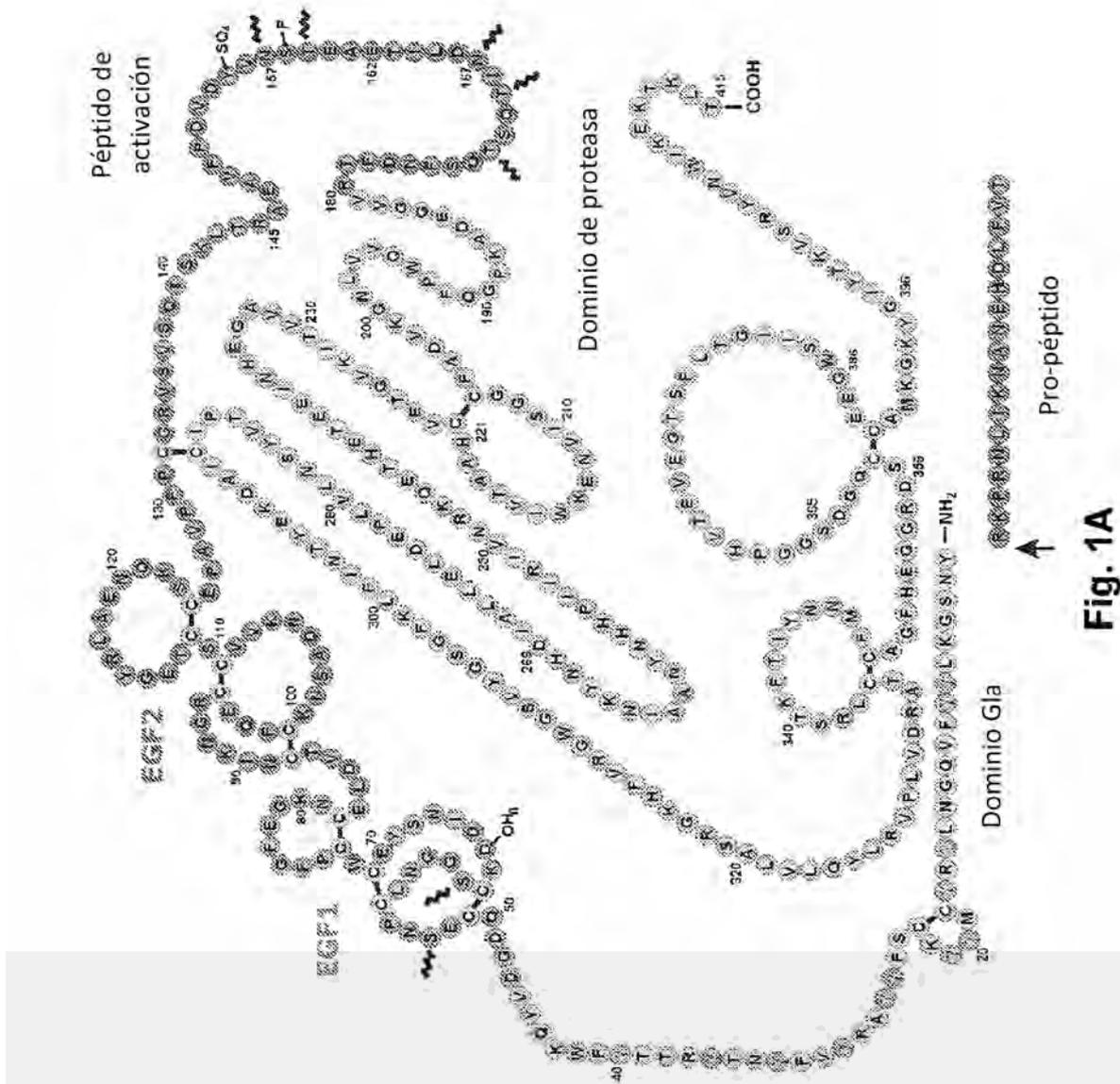
Basándose en el análisis de las fracciones, se muestra en la tabla siguiente una comparación de la distribución de las especies Gla FX separadas antes y después de la utilización de la cromatografía de intercambio aniónico como se ha descrito arriba.

<b>Especie Gla (%)</b>	<b>Antes de la separación (muestra de carga)</b>	<b>Después de la separación</b>	<b>pdFX</b>
<b>Gla#8 y menores</b>	3	-	-
<b>Gla#9</b>	30	-	-
<b>Gla#10</b>	42	59	40
<b>Gla#11</b>	25	41	43

De este modo, se preparó una composición del constructo FX con una cantidad incrementada de Gla #10 y Gla #11.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para purificación de un polipéptido que tiene un contenido deseado de ácido gamma-carboxiglutámico a partir de una muestra que comprende una mezcla de especies de dicho polipéptido que tienen contenidos diferentes de ácido gamma-carboxiglutámico, comprendiendo dicho método los pasos de:
- 5 a) cargar dicha muestra sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico;
- (b) eluir dicho polipéptido utilizando una solución con un pH comprendido entre 5,0 y 8,5 que comprende al menos una sal seleccionada del grupo constituido por acetato de amonio, cloruro de amonio y acetato de sodio; y
- (c) seleccionar una fracción obtenida por dicha elución, que tiene un aumento en la proporción de formas #1-10-Gla y/o #1-11-Gla de Factor VII o Factor VIIa comparada con la proporción de formas #1-10-Gla y/o #1-11-Gla de Factor VII o Factor VIIa en la muestra que se purifica.
- 10 2. Un método para purificación de un polipéptido que tiene un contenido deseado de ácido gamma-carboxiglutámico a partir de una muestra que comprende una mezcla de especies de dicho polipéptido que tienen contenidos diferentes de ácido gamma-carboxiglutámico, comprendiendo dicho método los pasos de:
- a) cargar dicha muestra sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico;
- 15 (b) eluir dicho polipéptido utilizando una solución con un pH comprendido entre 5,0 y 8,5 que comprende al menos una sal seleccionada del grupo constituido por acetato de amonio, cloruro de amonio y acetato de sodio; y
- (c) seleccionar una fracción obtenida por dicha elución, que tiene un aumento en la proporción de formas #1-11-Gla y/o #1-12-Gla de Factor IX comparada con la proporción de formas #1-11-Gla y/o #1-12-Gla de Factor IX en la muestra que se purifica.
- 20 3. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual está presente acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio en el tampón de elución en una concentración comprendida entre 0,1 M y 2,0 M.
4. Un método conforme a la reivindicación 3, en el cual está presente acetato de amonio, cloruro de amonio o acetato de sodio en el tampón de elución en una concentración aproximada 0,6 M.
- 25 5. Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual dicha cromatografía de intercambio aniónico utiliza un tampón de equilibración a un pH comprendido entre 5,0 y 8,5.



**Fig. 1A**

Factor VII	ANA-FL**LRPGSL*R*CK**QCSF**AR*IFKDA*RTKLFWISY
Factor IX	YNSGKL**FVQGNL*R*CM**KCSF**AR*VF*NT*RTT*FWKQY
Factor X	ANS-FL**MKKGHL*R*CM**TCSY**AR*VF*DSDKTN*FWNKY

**Fig. 1B**

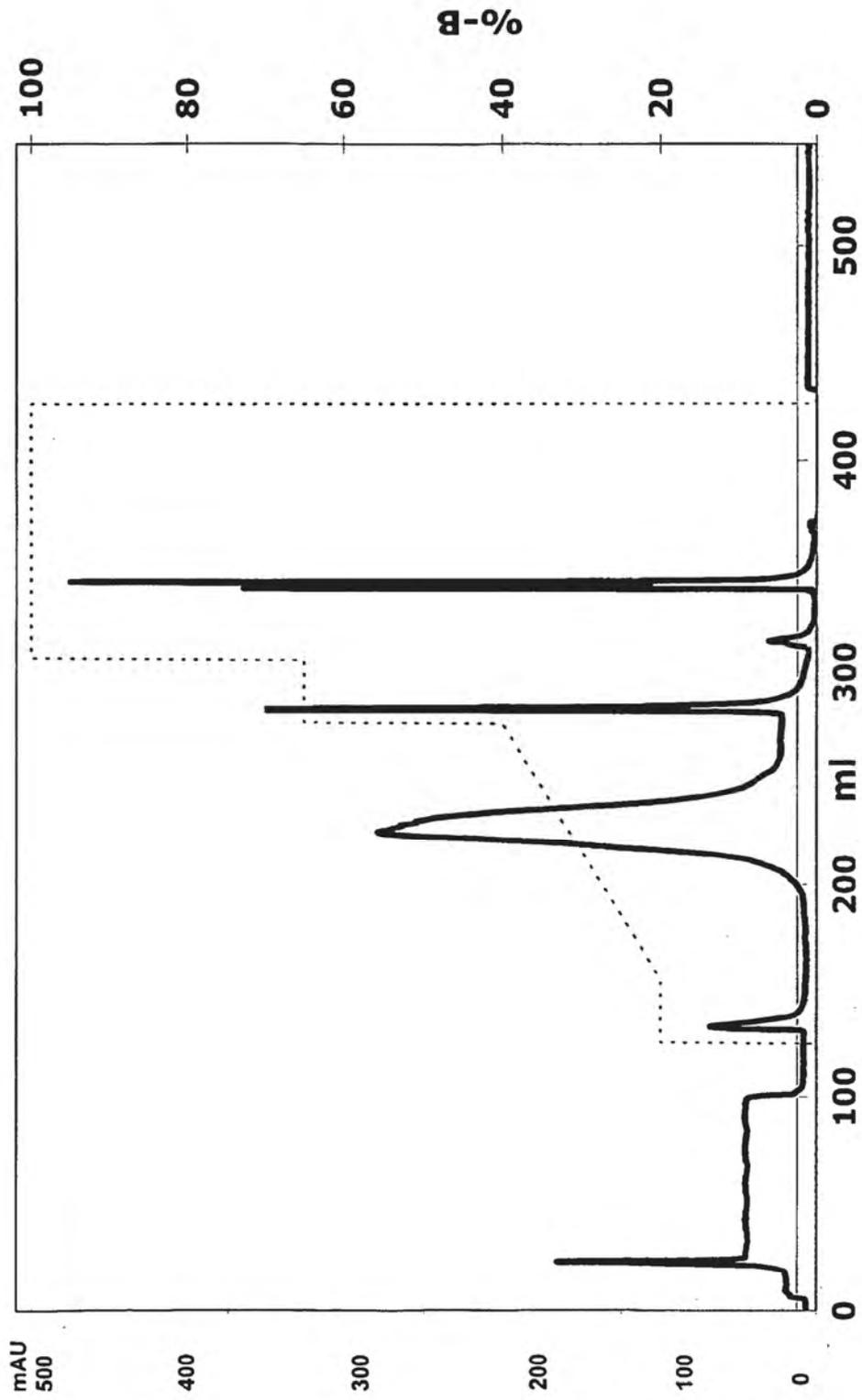


Fig. 2

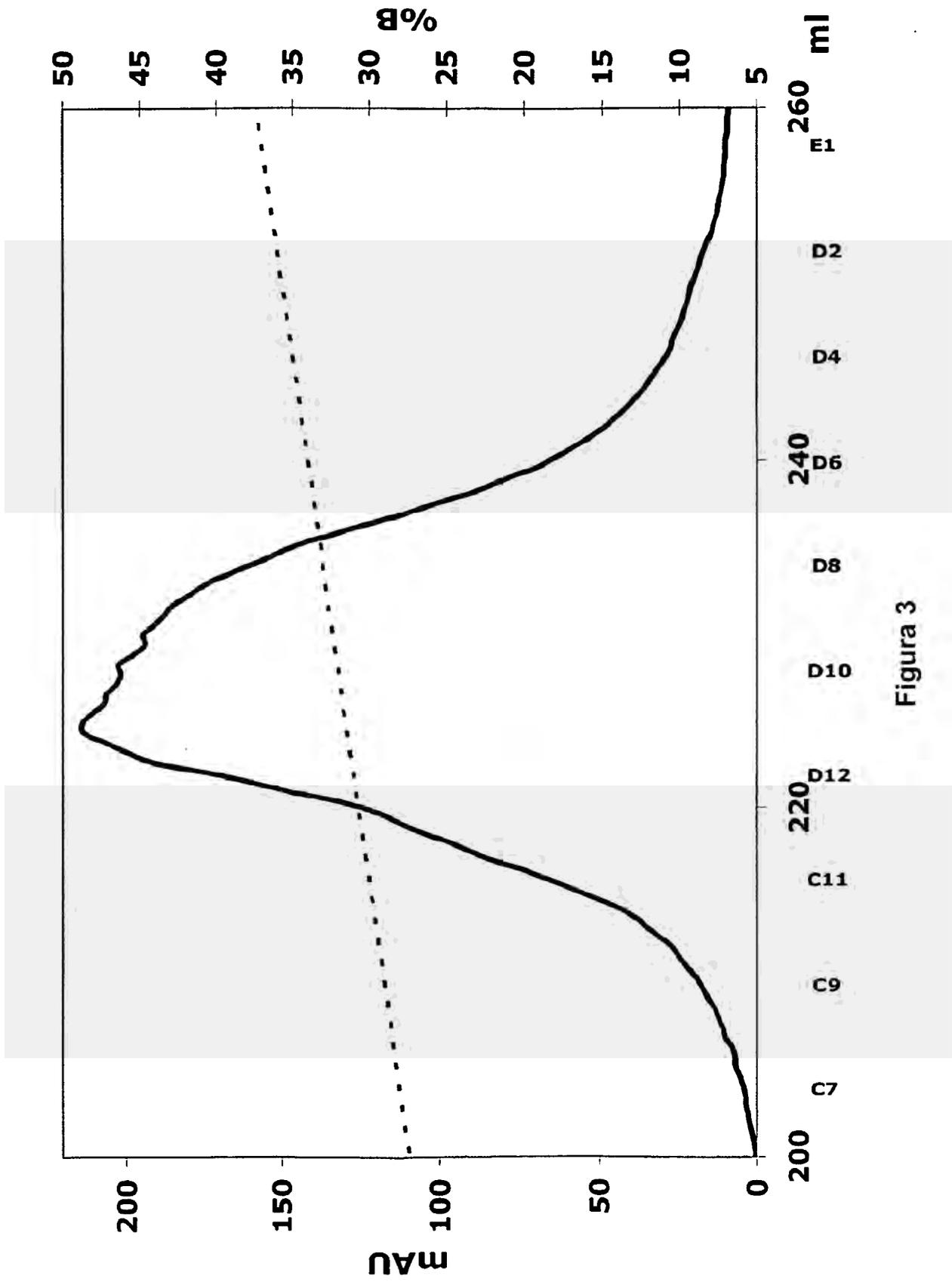


Figura 3

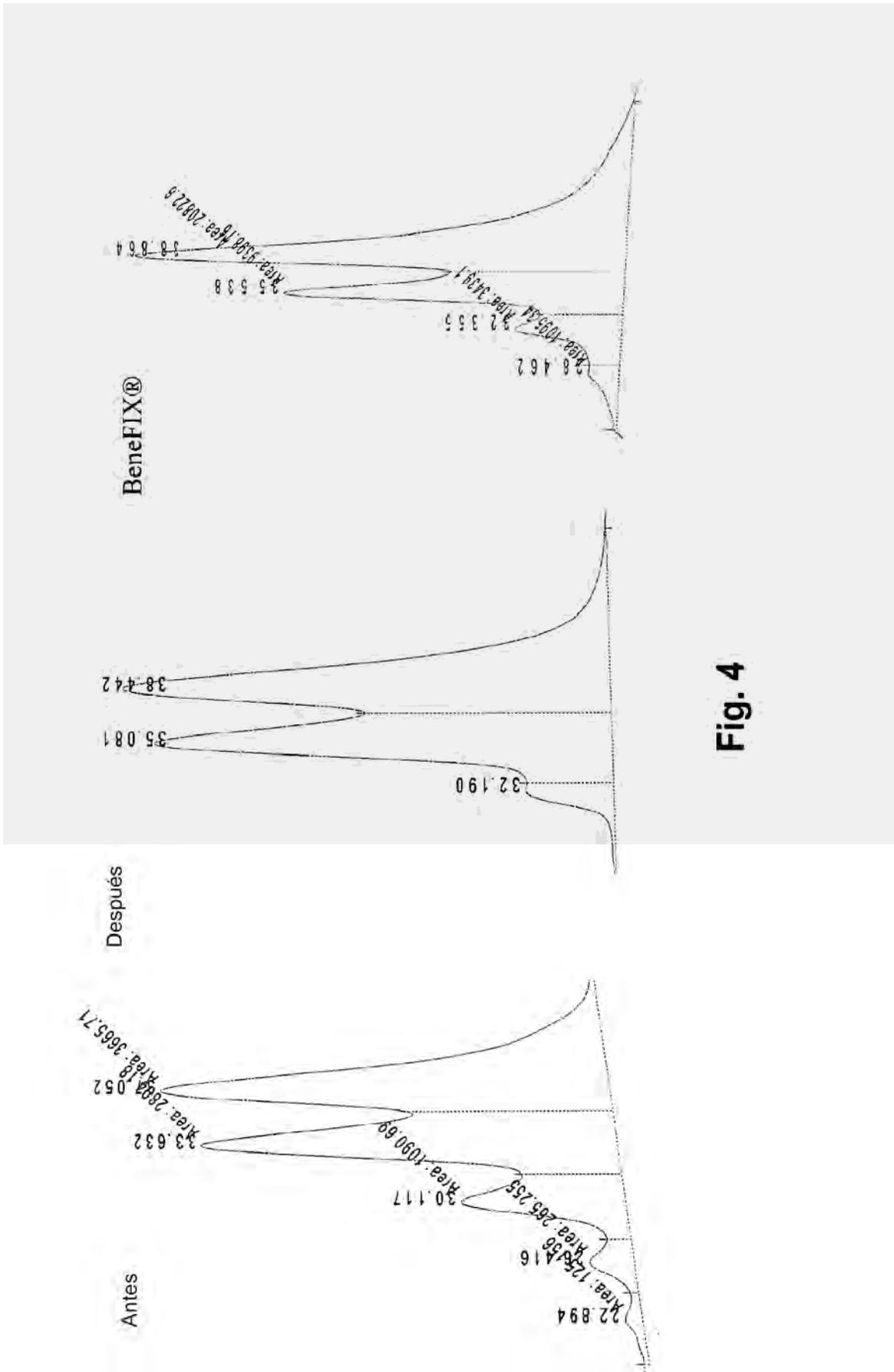


Fig. 4

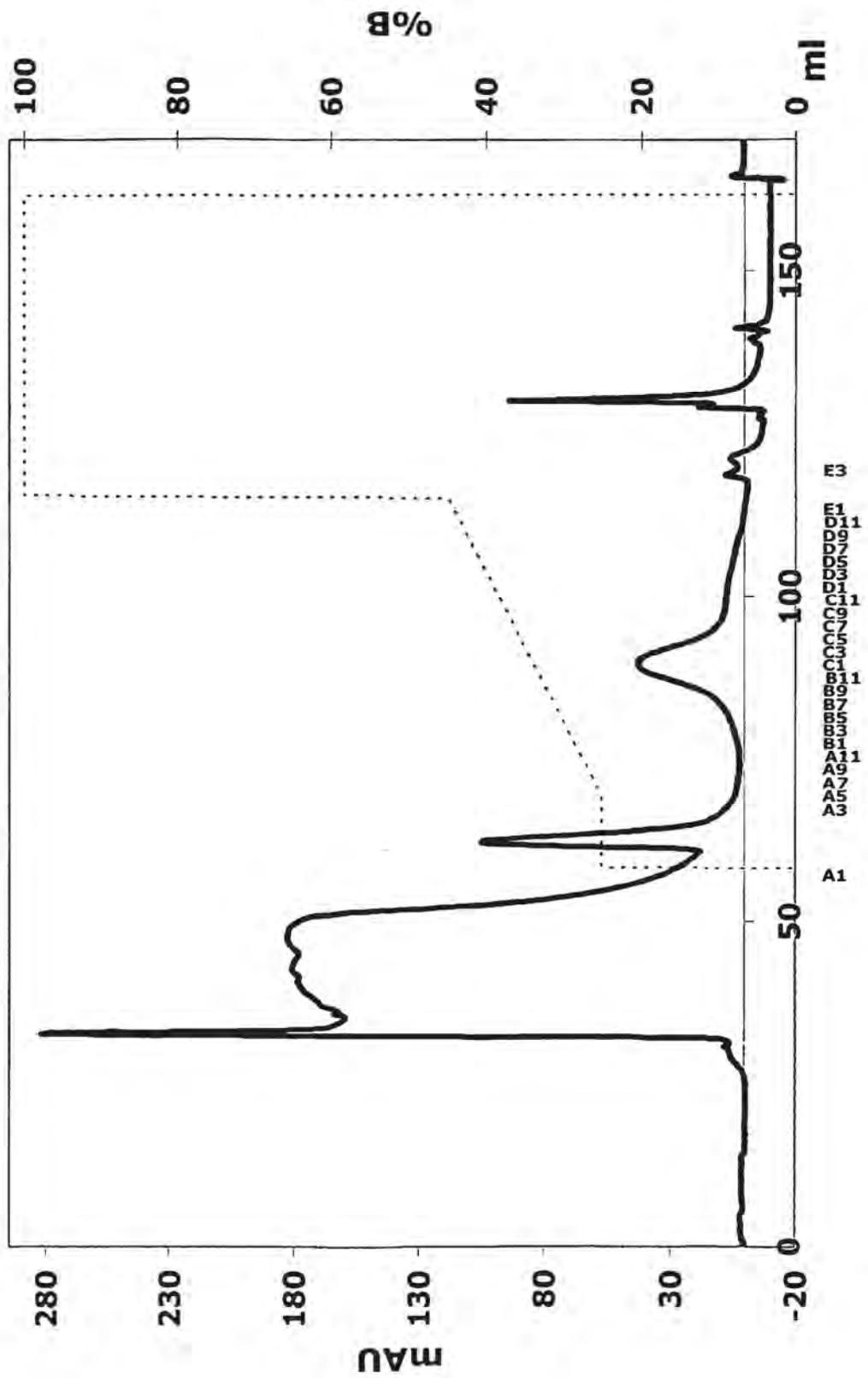
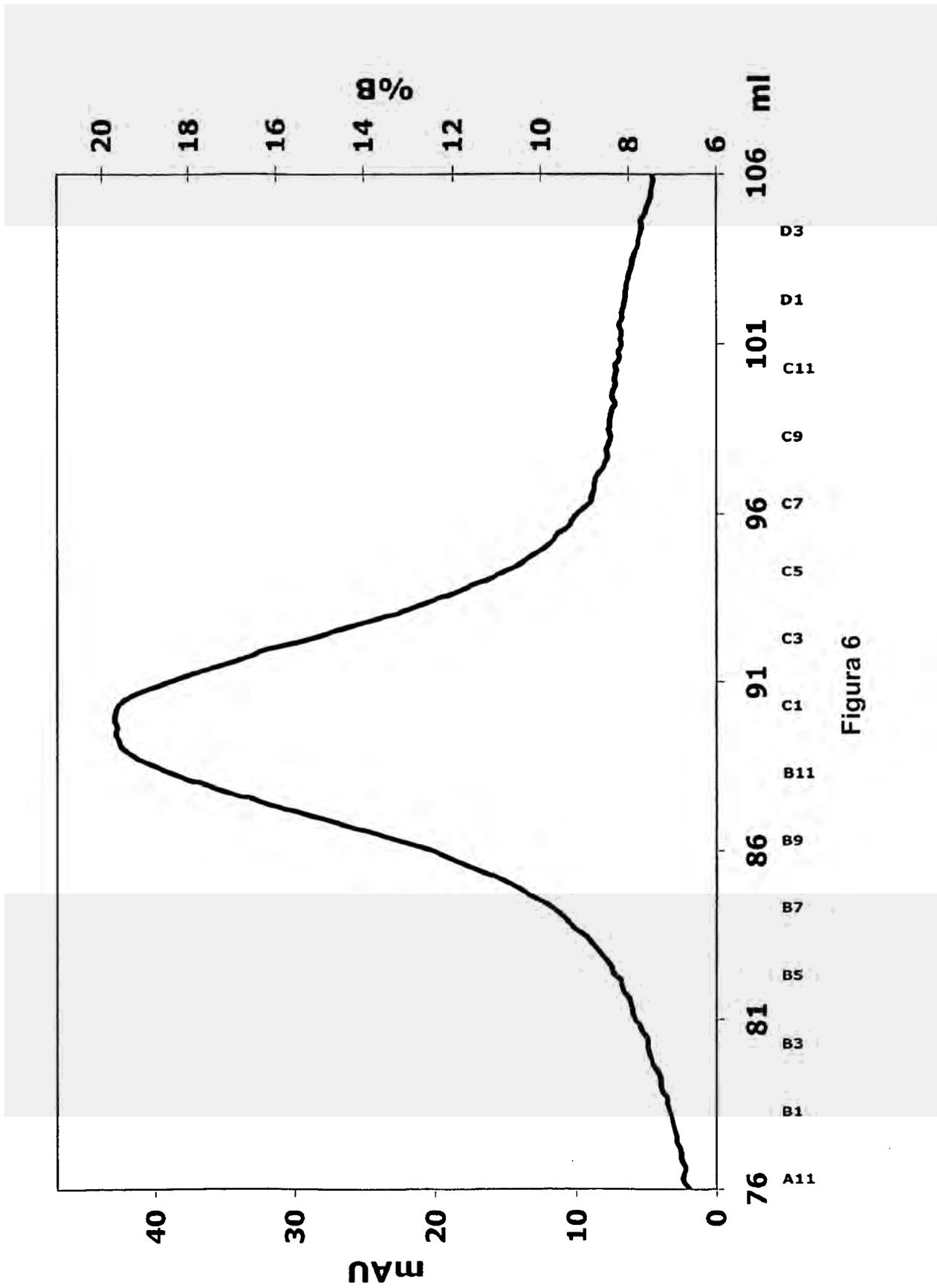


Fig. 5



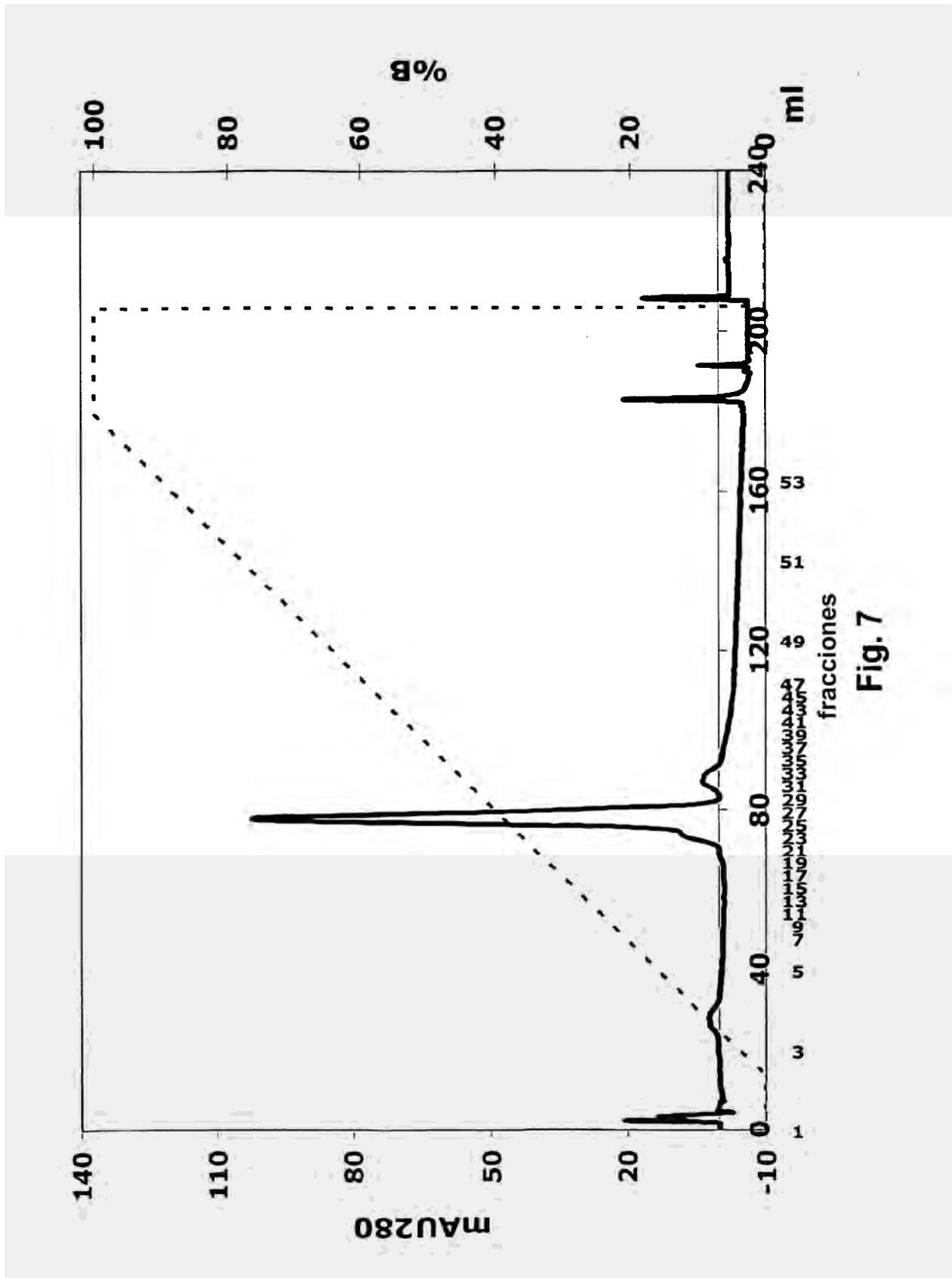
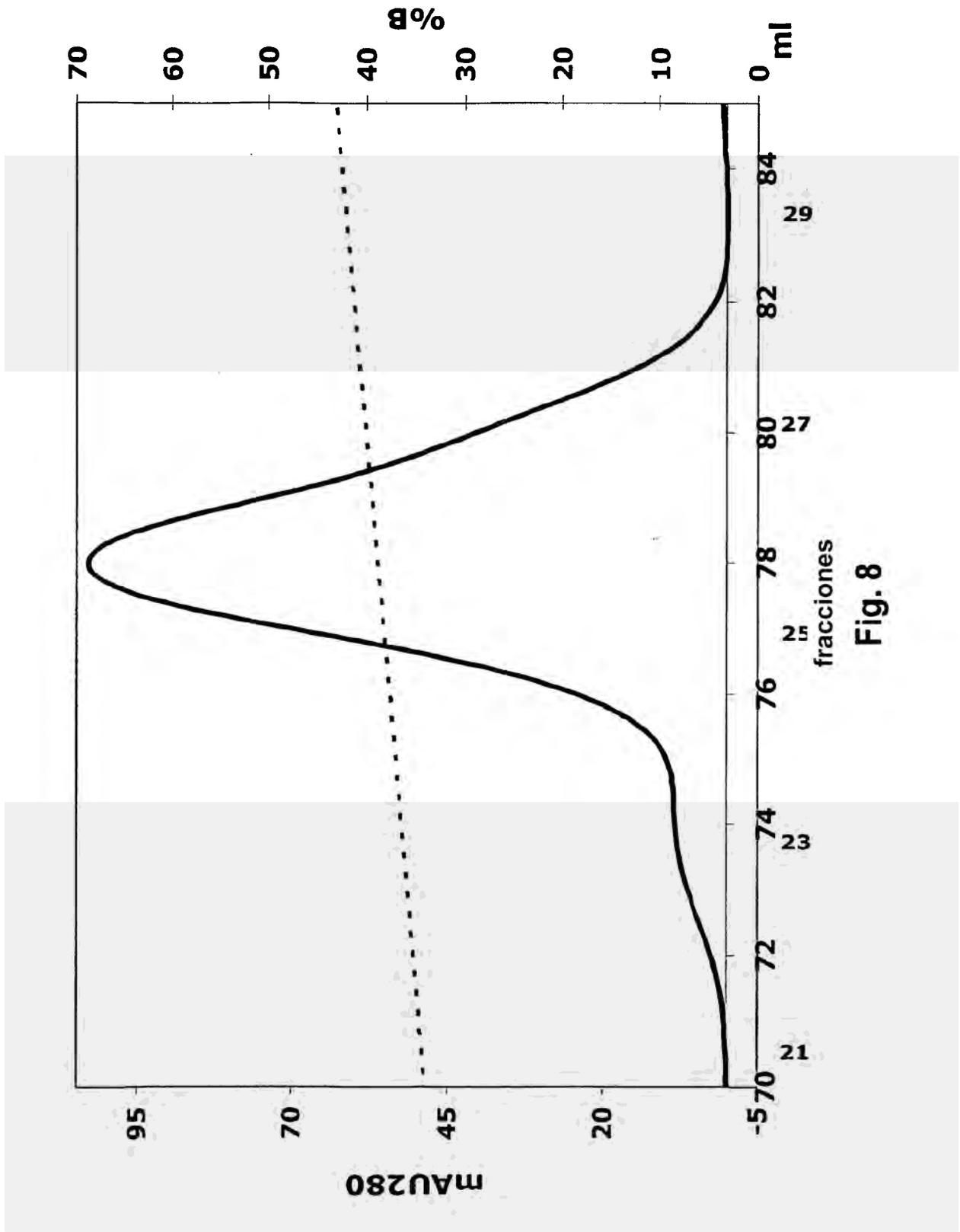


Fig. 7



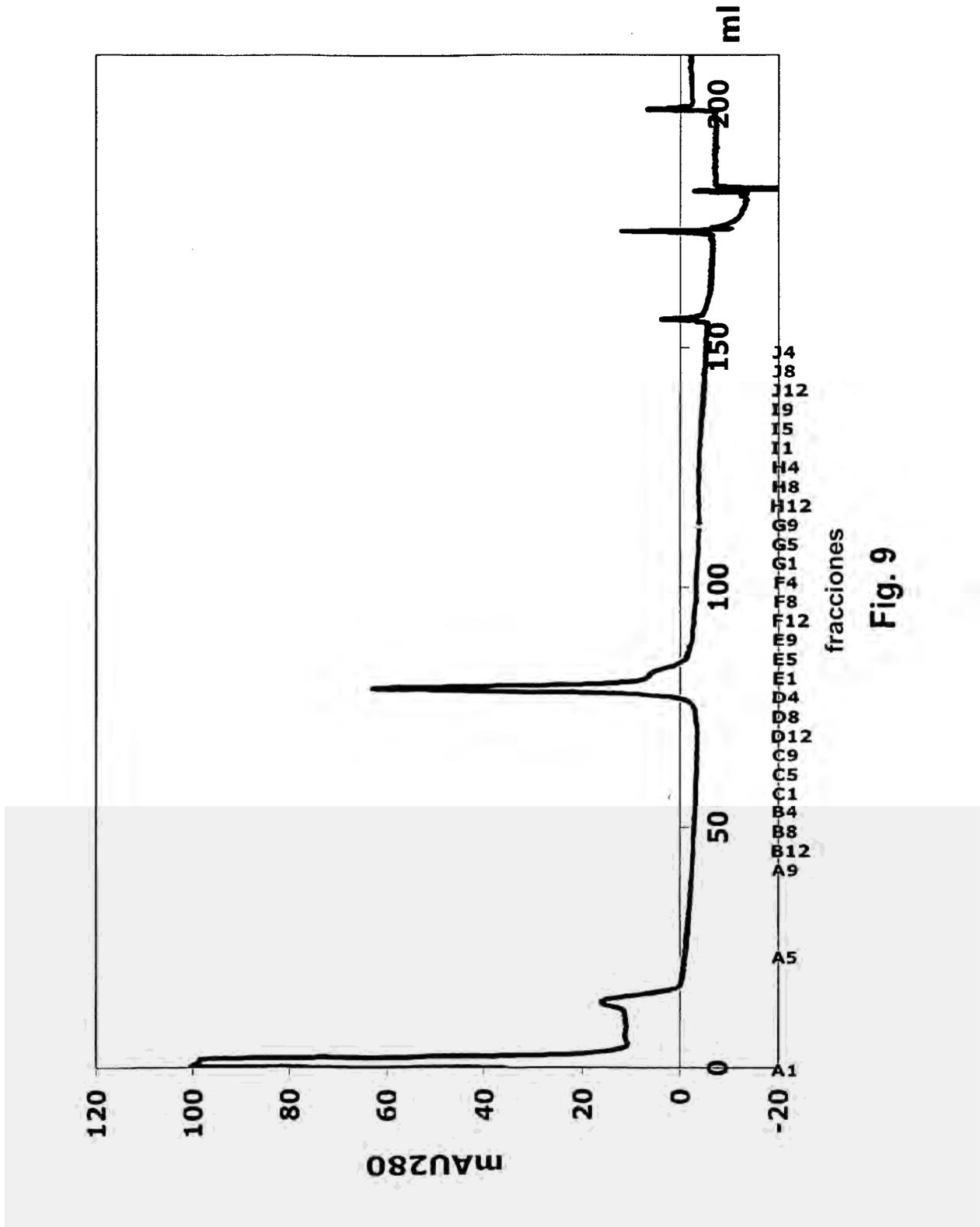


Fig. 9

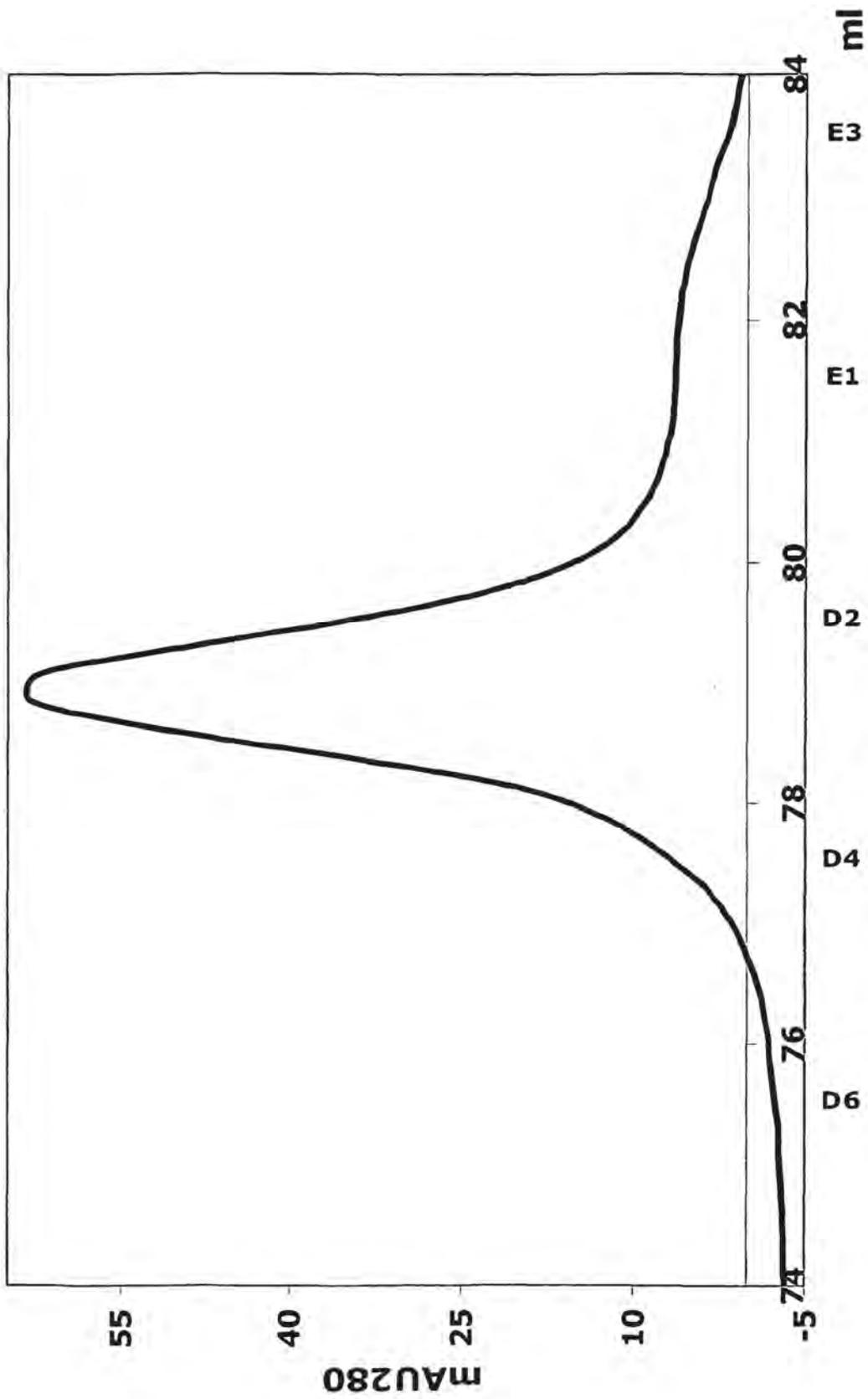


Fig. 10

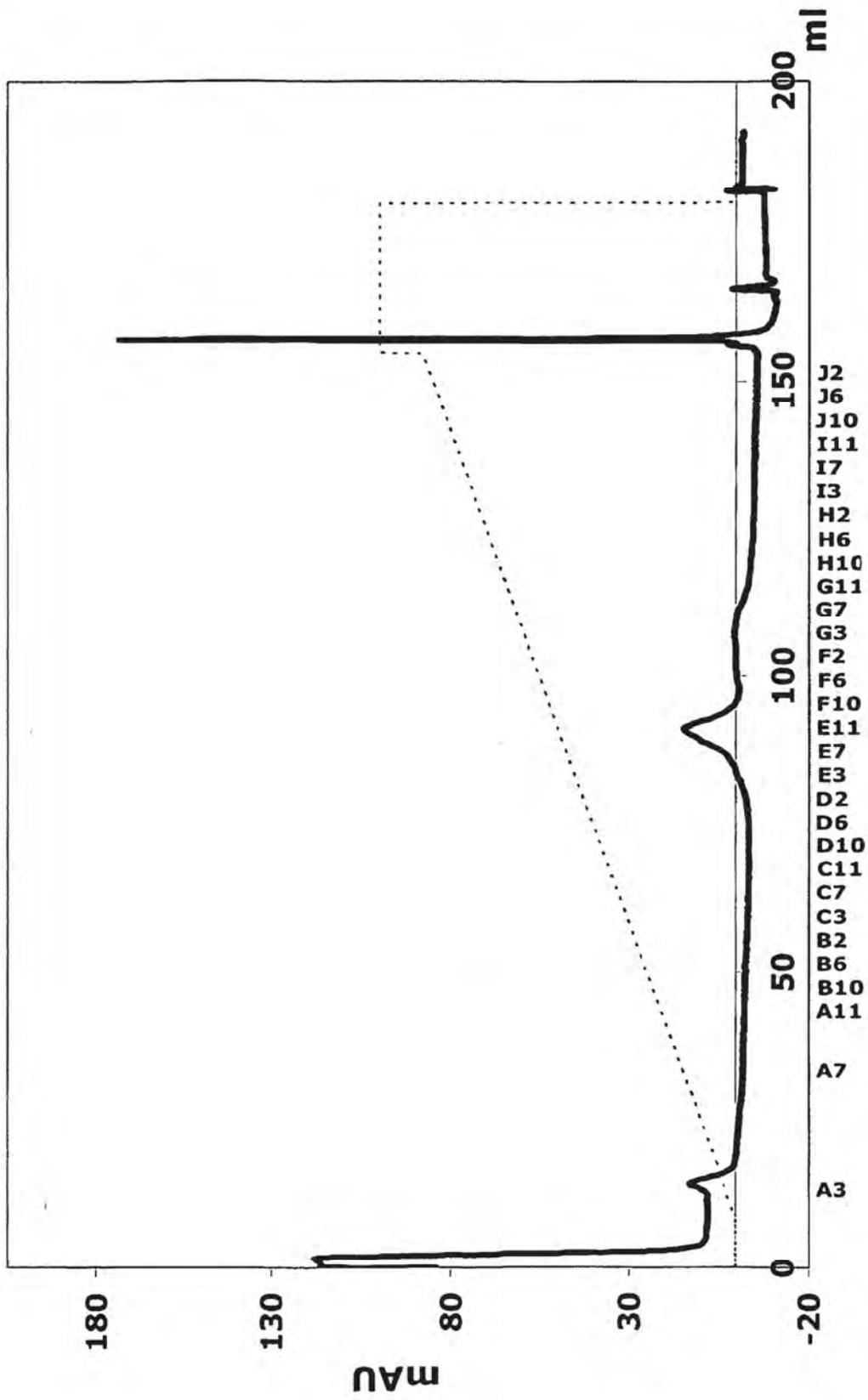


Fig. 11

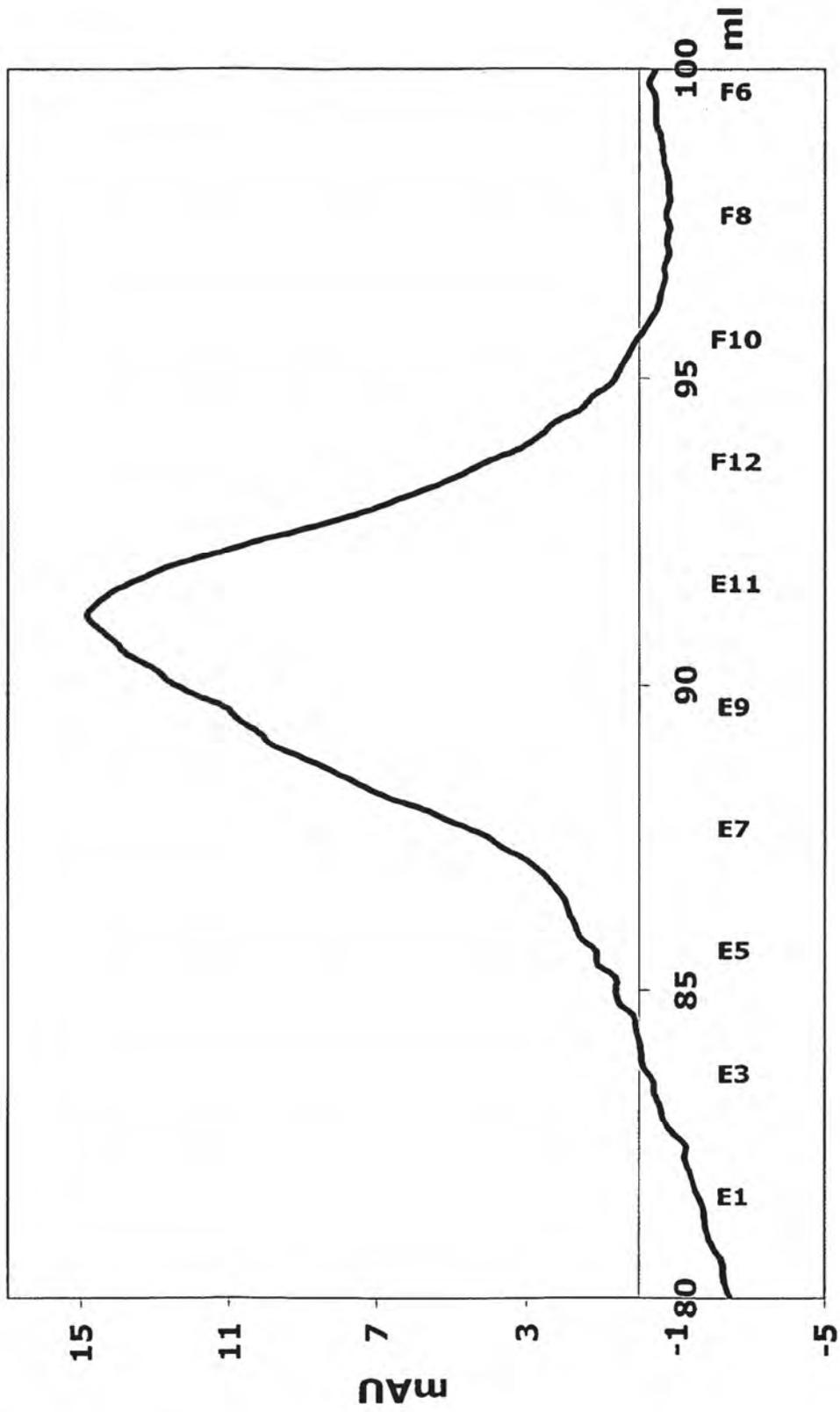


Fig. 12

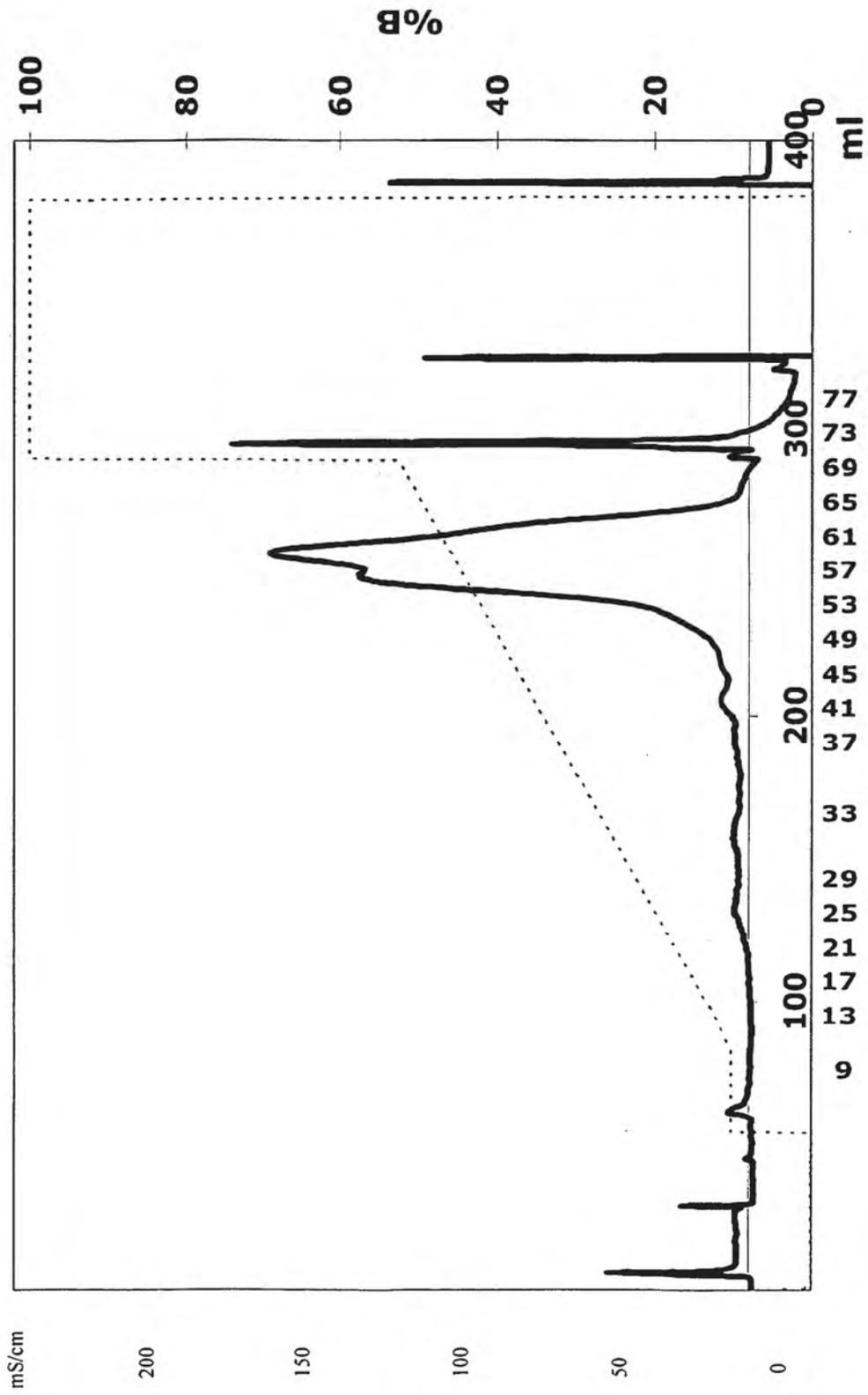


Fig. 13