

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 529**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/EP2011/054906**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11713216 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2553095**

54 Título: **Un procedimiento de purificación de proteínas dependientes de vitamina K, tales como el factor de coagulación IX**

30 Prioridad:

16.04.2010 US 282895 P
30.03.2010 EP 10158511

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GILLJAM, GUSTAV y
WINGE, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 610 529 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

Un procedimiento de purificación de proteínas dependientes de vitamina K, tales como el factor de coagulación IX.

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación del factor de coagulación IX (abreviado como FIX).

5 La hemofilia es un grupo de trastornos genéticos hereditarios que alteran la capacidad del cuerpo para controlar la coagulación de la sangre. En una de sus formas, la hemofilia B, falta el factor de coagulación IX (FIX). La hemofilia B aparece en aproximadamente 1 de cada 25.000 niños nacidos. El factor IX (o factor Christmas) es una de las serina proteasas del sistema de coagulación. Es una proteína plasmática dependiente de vitamina K que participa en la vía intrínseca de la coagulación de la sangre convirtiendo el factor X en su forma activa en presencia de iones Ca^{2+} , fosfolípidos y factor VIIIa. La proteína FIX es un factor fundamental en la coagulación sanguínea con propiedades multifuncionales.

15 El factor IX (FIX) es una glicoproteína monocatenaria que contiene 461 aminoácidos. Se sintetiza principalmente en el hígado y se segrega hacia el plasma. La molécula del factor IX consiste en varios dominios funcionales discretos, que incluyen un péptido señal, un propéptido, un dominio Gla, dos dominios similares al factor del crecimiento epidérmico (EGF), un péptido de activación y un dominio catalítico similar a tripsina (dominio de serina proteasa) (el polipéptido se rompe antes de su secreción para generar una molécula de FIX madura de 415 aa). La proteína vuelve a procesarse en una forma activa, hasta un heterodímero que consiste en una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un enlace disulfuro.

20 La deficiencia en FIX puede tratarse con concentrados derivados del plasma de FIX o con FIX producido de modo recombinante. El tratamiento con concentrados de FIX ha conseguido que los pacientes con hemofilia lleven una vida normal. Históricamente, la hemofilia B se ha tratado con FIX que se obtiene de plasma sanguíneo humano. En el plasma sanguíneo, bajo condiciones normales, la molécula de FIX circula en su forma nativa, mientras que se activa a través de un proceso complejo iniciado en la cascada sanguínea de las enzimas de coagulación.

25 Los productos de FIX derivados de plasma pueden encontrarse comercialmente con diferentes purezas, dependiendo del procedimiento de purificación aplicado. Los procedimientos empleados para purificar FIX normalmente son una combinación de diferentes etapas cromatográficas (principalmente etapas de afinidad e intercambio iónico para la purificación, y una o más etapas de ultrafiltración para la concentración/desalación del producto).

30 Harrison *et al.* (S. Harrison *et al.*, Sem. Hematol., 35 (supl. 2):4-10 (1998) divulgan el procedimiento de fabricación de un FIX recombinante (Benefix®) producido en células CHO. Las células se recolectan mediante microfiltración y después se concentran en una etapa de ultrafiltración/diafiltración en la que el tampón se cambia a tampón Tris para proporcionar un tampón uniforme para su carga en la primera columna de cromatografía. Se emplean cuatro etapas de cromatografía independientes para la purificación de rFIX, siendo la primera una etapa de intercambio aniónico (Q Sepharose FF) que se realiza en un modo de pseudoafinidad. La columna se eluye con cloruro de calcio 10 mM a pH 8,0. El cloruro de calcio induce un cambio conformacional en la molécula de FIX que hace que se desprenda de la columna.

40 A la etapa de Q Sepharose le sigue una purificación en una columna de sulfato de celulosa Matrex, que es un análogo de la heparina empleado para la purificación por afinidad de proteínas con dominios de unión a la heparina. También se comporta como una resina de intercambio catiónico debido a los grupos sulfatos cargados negativamente. La etapa de purificación con celulosa elimina los niveles bajos de HCP.

El eluato de celulosa se carga sobre una columna de cerámica-hidroxiapatito, que es una forma sintética del fosfato de calcio. Se emplea para separar proteínas de diversas cargas y proporciona la posibilidad de eliminar las formas de menor actividad específica de rFIX. La columna se eluye con una elución discontinua aumentando la concentración de fosfato hasta una concentración final de 0,5 M.

45 La etapa de purificación final en el procedimiento de fabricación de Benefix® es el quelado-EMD-Cu(II). Las proteínas interaccionan con los metales inmovilizados retenidos por la resina. El rFIX unido se eluye con imidazol como desplazador, y las trazas de contaminantes se eliminan en esta etapa de purificación, a la cual le sigue una etapa de filtración de virus (Viresolve-70) y, por último, una etapa de ultrafiltración/diafiltración en la que el rFIX se concentra y el tampón se cambia al tampón de formulación.

50 El procedimiento de fabricación de rFIX descrito anteriormente es uniforme; se han analizado 65 lotes y se descubrió que la actividad específica era de 276 ± 23 IU/mg. El contenido en Gla era de $11,4 \pm 0,1$ mol de Gla/mol de rFIX y se descubrió que las impurezas totales eran de $0,01 \pm 0,01\%$ y de $0,03 \pm 0,01\%$, determinado mediante RP-HPLC y HCP-ELISA, respectivamente.

Lindsay *et al.* (J. Chrom. A., 1026:149-157 (2004)) divulgan un procedimiento de purificación de rFIX a partir de leche de cerda transgénica. Se empleó heparina-Sepharose FF como primera etapa en el programa de purificación, seguida de una etapa de intercambio aniónico.

5 El dominio de unión a la heparina del factor IX está localizado en el extremo C-terminal de la molécula. Esta región carece de PTM y, por tanto, la etapa de cromatografía de heparina permite aislar la población completa de rFIX. La actividad específica del eluato era de 30-35 IU/mg, lo cual indica que una gran fracción es inactiva. Se separaron las subpoblaciones de rFIX activas de las inactivas durante una elución en gradiente de la columna ALEX.

10 Kaufman *et al.* (J.B.C., 261:9622-9628 (1986)) divulgan la expresión de rFIX en células CHO y la purificación de la proteína. El medio de cultivo celular que contiene rFIX se concentró mediante ultrafiltración y se dializó contra un tampón que contenía CaCl_2 3 mM, Tris-HCl 0,05 M y NaCl 0,5 M antes de la aplicación a una columna de inmunoafinidad con anticuerpos específicos de conformación (anticuerpos anti-FIX:Ca(II)). La columna después se eluyó con EDTA 10 mM, Tris-HCl 0,05 M y NaCl 0,15 M.

15 La presencia de CaCl_2 3 mM en el material de partida antes de la aplicación a la columna produjo una separación entre las especies activas e inactivas de FIX. Las especies inactivas no se unieron a la columna y el FIX activo puede eluirse de la columna con EDTA.

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

25 El documento EP-A-1 707 634 divulga un procedimiento para el aislamiento de proteínas producidas de modo recombinante, concretamente mediante diversos procedimientos, tales como una cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad, precipitación de proteínas, intercambios de tampones, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, medios de cromatografía de intercambio iónico/hidrófoba de modo mixto, cromatografía quelante, cromatografía de afinidad de heparina o lectina similar a la afinidad de carbohidratos, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, diálisis, diferentes agentes de precipitación, tales como polietilenglicol, sulfato de amonio, etanol, adsorción de hidroxapatito, adsorción de membrana de filtro, ligandos acoplados a partículas magnéticas, etc. Sin embargo, no identifica ninguna etapa de purificación cromatográfica concreta.

30 El documento WO-A-2005-082483 divulga un procedimiento de purificación de anticuerpos de una o más impurezas en un líquido, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicho líquido con una primera resina de cromatografía que comprende un soporte al cual se han inmovilizados ligandos multimodales para adsorber los anticuerpos a la resina, en el que cada ligando multimodal comprende al menos un grupo de intercambio catiónico y al menos un sistema de anillos aromáticos o heteroaromáticos. Se añade un eluyente para liberar los anticuerpos de la resina, y el eluato se pone en contacto con una segunda resina de cromatografía.

35 El documento WO-A-2005/121163 divulga un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas de una disolución de proteínas. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar una disolución de proteínas que comprende una o más proteínas específicas y que tiene un pH preajustado y una fuerza iónica o conductividad preajustada, aplicar la disolución de proteínas a una columna de adsorción que comprende una partícula con al menos un núcleo no poroso de alta densidad rodeado por un material poroso, y el adsorbente comprende una densidad de partículas de al menos 1,5 g/ml y un promedio del diámetro del volumen de partícula de un máximo de 150 μm . La columna se lava opcionalmente antes de eluir la proteína o proteínas del adsorbente.

45 El documento WO-A-2009/156430A1 divulga un procedimiento de purificación de FVIII empleando una resina de modo mixto o multimodal. El procedimiento de purificación se basa en poner en contacto la proteína FVIII en una disolución que tiene una elevada fuerza iónica con una resina de modo mixto o multimodal que comprende ligandos que comprenden una parte hidrófoba y una parte cargada negativamente, y eluir dicha proteína FVIII con un tampón de elución que contiene al menos un aminoácido que está cargado positivamente a pH 6-8.

50 El documento EP 2 027 875 A1 divulga un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteína diana mediante una cromatografía, que comprende las etapas de poner en contacto una muestra potencialmente contaminada con PrP^{Sc} que comprende una proteína diana, con una resina multimodal, y ajustar las condiciones del tampón de modo que la proteína diana se una a la resina multimodal. Para mejorar los productos que contienen FIX se emplea una cromatografía de afinidad específica dirigida contra la molécula de FIX, que elimina, de modo eficaz, los contaminantes hasta un alto grado de pureza de FIX. La desventaja que presenta la cromatografía de inmunoafinidad, que se emplea a menudo, es que es relativamente cara y que los anticuerpos monoclonales empleados como ligandos de afinidad son de origen animal. A mediados de la década de los

ochenta se produjeron algunas transmisiones de virus asociadas con productos de FIX derivados de plasma. Aunque este problema se resolvió mediante la práctica de etapas de reducción de virus específicas, esto fue el punto de inicio del desarrollo de productos de FIX recombinantes (rFIX). En los años noventa se comercializó el primer producto de rFIX que, hasta la fecha, es el único.

5 Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento mediante el cual pueden evitarse los inconvenientes de los procesos de purificación de FIX de la técnica anterior. Se sabe de la técnica anterior que una desventaja de las resinas de cromatografía de intercambio iónico tradicionales (por ejemplo, las resinas de cromatografía de intercambio iónico SP-, CM-, Q- o DEAE Sepharose FF) es que la unión de la proteína a la resina solo puede realizarse en un pH y una concentración de sal (conductividad) relativamente pequeña, generalmente en el intervalo de 0,01-0,15 M de concentración de sal (NaCl, etc.). El intervalo de pH óptimo depende de si se utiliza un intercambiador catiónico o un intercambiador aniónico y del punto isoeléctrico del producto diana que se va a unir a la resina. En general, el intervalo de pH en el que una proteína diana se une a una resina de intercambio iónico generalmente es de aproximadamente una unidad de pH mayor o menor del punto isoeléctrico del producto diana.

10 En ciertas aplicaciones, se querría poder utilizar las condiciones de purificación relativamente suaves que una etapa de cromatografía de intercambio iónico ejerce sobre las proteínas, y también directamente (sin más dilución) una resina de cromatografía con una fuerza iónica algo mayor y a un pH fuera del intervalo normal, que no puede utilizarse en la cromatografía de intercambio iónico convencional.

15 La cromatografía multimodal (o de modo mixto) es una herramienta para purificar proteínas. Se divulga, por ejemplo, en el pliego de datos del fabricante GE Healthcare (11-0035-45AA) Capto Adhere, en el pliego de datos del fabricante GE Healthcare (28-9078-88AA) Capto MMC, y en el documento WO-A-2009/024620 "A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins" (Un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteínas diana exentas de proteínas priónicas). Una desventaja es que la elución a menudo incluye condiciones relativamente duras, como por ejemplo un pH por debajo o por encima del pH neutro, solo o en combinación con otros parámetros de elución, tales como, por ejemplo, etilenglicol y como, por ejemplo, se divulga en el documento WO-A-2009/007451.

20 Una mayor fuerza iónica puede ser una ventaja significativa para la estabilidad de la proteína en una disolución de proteínas, en especial en una preparación de proteínas bruta, tal como en la recolección de proteínas recombinantes o en productos derivados del plasma, en los que están presentes proteasas potenciales en la disolución que pueden afectar negativamente a la proteína diana.

25 Puesto que las proteasas a menudo funcionan mejor a condiciones fisiológicas (como es el caso en la mayoría de los sistemas celulares), es decir, a un pH de aproximadamente 7 y una concentración salina de aproximadamente 0,15 M, puede resultar ventajoso cambiar estas condiciones para minimizar los efectos de las proteasas. Estos cambios generalmente pueden realizarse mediante la adición de sales y/o el cambio en el pH. Ambos parámetros son críticos para la actuación de una etapa de cromatografía de intercambio iónico convencional y, así, a menudo no es posible realizarlos. Por tanto, otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento en el que este problema se ha resuelto y hace posible añadir sales y/o cambiar el pH en muestras de proteínas brutas que comprenden factores potencialmente proteolíticos, tales como proteasas, que pueden degradar la proteína diana. El procedimiento también podría procesar la disolución de proteínas con las menores medidas posibles y unir la proteína diana a una resina de cromatografía. Esto proporcionaría una etapa optimizada de concentración y purificación de la proteína diana a partir de una muestra bruta u otra purificación corriente abajo empleando, por ejemplo, otras etapas de cromatografía, tales como una cromatografía de afinidad.

30 Esta necesidad tiene una importancia específica, porque se evitaría la degradación de la proteína diana durante la purificación o al menos se disminuiría.

35 Esto permite eliminar las proteasas y otros contaminantes que podrían estar presentes en una recolección bruta antes de la elución de la proteína diana.

40 Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento de purificación del FIX, en particular comenzando a partir de una recolección de un cultivo celular de FIX recombinante.

Según la invención, el objeto se logra mediante un procedimiento de purificar el FIX en una secuencia de purificación que emplea cromatografía, en el que:

- 50
- al menos una cromatografía se realiza empleando una resina multimodal,
 - el FIX se une a la resina multimodal, y
 - el FIX eluye de la resina multimodal a un pH entre 6 a 9 en un tampón que comprende arginina.

Se sabe que siete glicoproteínas plasmáticas dependen de la vitamina K para su biosíntesis. Estas son la protrombina (factor II), factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S y proteína Z. El dominio Gla es una característica estructural común a todas estas proteínas dependientes de vitamina K e, inmediatamente después del dominio Gla, cada una de las proteínas (excepto la protrombina) tiene uno o más dominios similares a EGF. Las proteínas dependientes de la vitamina K requieren iones Ca^{2+} para expresar su función fisiológica, y los sitios de unión a calcio implican al menos al dominio Gla y a los dominios similares a EGF. La unión del calcio permite que estas proteínas se unan a fosfolípidos/membranas celulares y así expresar todas sus actividades biológicas.

La presente invención, mediante el empleo de una resina multimodal como etapa de purificación de captura, permite ajustar la concentración salina y el pH a valores que minimizan el riesgo que suponen las proteasas activas en la disolución de proteínas durante la unión de la proteína diana en la etapa de cromatografía multimodal.

Una ventaja del procedimiento de la invención es la posibilidad de aplicar además una etapa de lavado antes de la elución de la proteína diana después de la unión de la proteína diana a la resina multimodal empleada, por ejemplo, como etapa de captura en un procedimiento recombinante. Esto se logra, empleando la resina multimodal, mediante un lavado de la resina seleccionando un tampón de lavado adecuado para eliminar las proteasas y otros contaminantes que se adhieren a la resina multimodal antes de eluir la proteína diana. El tampón de lavado adecuado preferiblemente contendrá un componente de sal o de aminoácido o de tampón, o sus mezclas, a un pH adecuado para seguir inhibiendo la actividad proteasa durante la etapa de eliminación con lavado.

El procedimiento de la invención permite eluir la proteína diana, unida a la resina multimodal, en un entorno de elución suave con propiedades de elución diferenciadas (concretamente, en el menor volumen posible). Esto se logra empleando un pH mayor o una concentración salina mayor o mediante la adición de un aminoácido o sus combinaciones. El procedimiento de la invención proporciona ventajas tales como la inhibición de agregados, la conservación de la estructura molecular nativa y el suministro de un volumen pequeño para el posterior procesamiento corriente abajo.

La presente invención también facilita un procedimiento de purificación sin la adición de aditivos estabilizantes derivados de seres humanos o animales, y el uso de un proceso completo que no los contiene (resinas de inmunoafinidad basadas en anticuerpos monoclonales). El uso de la resina multimodal, en particular como etapa de captura, facilita además una mayor capacidad de unión en comparación con los intercambiadores iónicos convencionales, y produce un producto de eluato de la columna más concentrado, que puede ser una ventaja para la estabilidad del producto.

Según una realización de la invención, la cromatografía multimodal puede realizarse en una columna cromatográfica. Esto puede considerarse como una primera etapa de captura. El procedimiento de la invención también puede realizarse de modo discontinuo.

En una realización de la invención, la cromatografía con resinas multimodales se combina con una cromatografía con una resina que contiene un ligando de afinidad derivado de levadura, empleando una pureza de >90% después de la elución de la proteína FIX.

En otra realización de la invención, la etapa de la resina multimodal y la etapa de la cromatografía de ligando de afinidad derivado de levadura se combina con otra etapa de purificación con cromatografía para lograr una pureza mayor que 99% en la proteína FIX final.

Por tanto, también se describe una composición de materia que comprende un FIX que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención (sin la adición o el uso de ningún aditivo humano o animal, tal como albúmina o ligandos de inmunoafinidad basados en anticuerpos monoclonales).

En otra realización de la invención, la resina multimodal comprende restos unidos a una matriz, y los restos son capaces de interactuar con FIX en una mezcla mediante interacciones iónicas y otros tipos de interacciones, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y tiofilicas.

En otra realización de la invención, el ligando de afinidad es un fragmento F_{ab} derivado de levadura dirigido contra FIX.

En otra realización de la invención, la etapa de la resina multimodal se realiza para capturar el FIX de una disolución de proteínas bruta, en la que, después del procesamiento, en el eluato de la resina de cromatografía multimodal resultante en la etapa de cromatografía de ligando de afinidad derivado de levadura y después de la elución de FIX de dicha etapa de cromatografía de afinidad, se obtiene una pureza mayor que 90% con relación a las proteínas y ADN.

- Otra realización de la invención se caracteriza porque la pureza del producto final es mayor que 99%, si la etapa de la resina multimodal se realiza para capturar el FIX de una disolución de proteínas bruta, en la que, después del procesamiento, el eluato de la resina de cromatografía multimodal resultante se vuelve a procesar en una o más etapas de cromatografía adicionales, seleccionadas de una cromatografía de exclusión por tamaño, de intercambio aniónico, de intercambio catiónico, de interacción hidrófoba y de afinidad de metal inmovilizado, y un ligando de afinidad derivado de levadura.
- En otra realización de la invención, la mezcla que comprende FIX está presente en una disolución.
- En otra realización de la invención, FIX está en una disolución de proteínas bruta que incluye proteasas que potencialmente pueden degradar el producto.
- Puede resultar ventajoso aplicar el tampón de lavado a la resina multimodal para lavar los contaminantes (proteasas, ADN, etc.) y retener el FIX, antes de liberarlo.
- En otra realización de la invención, la resina multimodal se lava con un tampón de lavado a un pH entre 6-9, antes de eluir el FIX.
- En otra realización de la invención, la elución se realiza con arginina como agente de elución. Según la invención, el agente de elución puede combinarse con una mayor concentración salina en la que la sal se selecciona de la serie de Hofmeister. Según la invención, la elución puede realizarse con arginina sola o en combinación con una mayor concentración salina o solo con una mayor concentración salina, todo esto dentro de un intervalo de pH entre 6-9, preferiblemente a pH 7,0.
- Según la invención, se prefieren NaCl y KCl con respecto a la sal incluida en la serie de Hofmeister que está formada, por ejemplo, por sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, bario, acetato, fosfato y sulfato.
- Según la invención, la concentración de arginina está, en particular, en el intervalo de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 2 M y de 0,1 M a 4 M para una sal según la serie de Hofmeister; en particular, en el intervalo de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 1,5 M para la arginina y de 0,6 M a 2 M para la sal según la serie de Hofmeister, o en el intervalo de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 0,7 M para la arginina y de 0,8 M a 1,2 M para la sal según la serie de Hofmeister.
- Según otra realización de la invención, el FIX se une a la resina multimodal a un pH entre 6-9, preferiblemente a pH 7,0.
- En otra realización de la invención se emplea una sustancia tamponante que comprende preferiblemente al menos una de las sustancias seleccionadas del grupo que consiste en citrato de sodio, histidina, ácido 2-(4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinil)etansulfónico (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico (MES), base Tris y acetato de sodio en particular en un intervalo de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9.
- En el procedimiento de la invención puede estar presente un detergente no iónico en cualquiera de los tampones utilizados, y dicho detergente no iónico se selecciona, en particular, del grupo que consiste en polisorbatos (polisorbato 20, 40, 60, 80) y Pluronic F68.
- En el tampón de elución con un pH 6-9, preferiblemente a pH 7,0, la cantidad de arginina generalmente está en el intervalo de 0,1 a 2 M, en particular 0,5 M.
- En el tampón de elución con un pH 6-9, preferiblemente a pH 7,0, el cloruro de sodio se incluye en un intervalo de 0,1-4 M, en particular en un intervalo de 0,05 a 0,3 M.
- En el tampón de elución con un pH 6-9, preferiblemente a pH 7,0, la arginina y el cloruro de sodio se incluyen en un intervalo de 0,1-0,5 M, en particular en un intervalo de 0,3 a 0,7 M.
- En el tampón de lavado con un pH 6-9, preferiblemente a pH 7,0, el cloruro de sodio se incluye en un intervalo de 0,01-0,3 M, en particular en un intervalo de 0,05 a 0,15 M.
- La cantidad de detergente no iónico generalmente está en el intervalo de 0,001 a 1%, en particular en los tampones para la cromatografía multimodal, al 0,02%.
- La resina de cromatografía multimodal que puede emplearse según la invención puede contener al menos uno de los siguientes restos:
- un ligando de N-bencil-N-metiletanolamina cargado positivamente,
 - un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente,

- c. un ligando de fenilpropilo,
- d. un ligando de N-hexilo,
- e. un ligando de 4-mercaptoetilpiridina,
- f. un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)amino)fenil)amino)benzoico, o sus combinaciones.

5 En particular, una resina de cromatografía multimodal para su uso según la presente invención se selecciona de las siguientes resinas disponibles comercialmente: HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

10 En otra realización del procedimiento de la invención, la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa cromatográfica de afinidad de FIX, en la que la afinidad es proporcionada por un ligando de proteína, tal como un fragmento de anticuerpo que se expresa, por ejemplo, en levaduras.

15 En otra realización de la presente invención, la secuencia de purificación puede comprender además etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación con base química, una etapa de eliminación basada en el tamaño, etapas de cromatografía o sus combinaciones, y estas etapas se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno que se va a eliminar. Un ejemplo de una etapa de inactivación de patógenos muy bien descrita en la bibliografía es el procedimiento de detergente disolvente con base química, por ejemplo, con una base de fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100, que desestabiliza a todos los virus con una envuelta de lípidos, divulgado en el documento EP-A-131 740. Un ejemplo de una etapa de eliminación de patógenos basada en el tamaño es, por ejemplo, un nanofiltro con un promedio de tamaño de poro de aproximadamente 20 nm, tal como un filtro Planova 20. Otro ejemplo de eliminación de patógenos se basa en una cromatografía. Por ejemplo, se sabe que la cromatografía de afinidad ejerce unas propiedades de eliminación de patógenos en general, por ejemplo, una resina de cromatografía de ligandos de afinidad de FIX derivados de levadura.

20

En una realización particular del procedimiento según la presente invención, la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:

- 25 1. una resina multimodal catiónica, tal como Capto MMC;
- 2. una etapa de inactivación con base química para virus con envuelta de lípidos, en particular la inactivación con disolvente/detergente que emplea el fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100, según se divulga en el documento EP-A-131 740;
- 3. una resina de afinidad basada en un ligando expresado en levaduras;
- 30 4. un intercambiador catiónico, tal como SP Sepharose o Resource S;
- 5. una etapa de eliminación de patógenos con filtración con un promedio de tamaño de poro de aproximadamente 20 nm, tal como Planova 20N;
- 6. una etapa de intercambio de tampón y/o de concentración, tal como una ultrafiltración con un límite de exclusión aproximado de 10 kDa;
- 35 7. una resina de cromatografía de exclusión por tamaño, tal como Superdex 200.

En una realización particular, el procedimiento de la invención puede comprender las siguientes etapas:

- Una resina multimodal Capto MMC™ se carga en una columna y se equilibra con un tampón que comprende citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02% a pH 7,0.
- 40 - La muestra que contiene FIX bruta se aplica y comprende aproximadamente las mismas condiciones que el anterior tampón de equilibrio, y la proteína diana y algunas otras impurezas de proteína se unen a la columna.
- Se aplica una etapa de lavado, según la invención, empleando el tampón de equilibrio, a la columna para inhibir la actividad proteolítica y para eliminar las proteasas, el ADN y otros contaminantes, mientras que el FIX continúa unido a la columna.
- 45 - Se eluye el FIX, según la invención, empleando el tampón de equilibrio al que se añade arginina 0,5 M y se ajusta a pH 7,0, para lograr una fracción de FIX no agregado estable en un volumen pequeño.

La cromatografía multimodal (o de modo mixto) es una herramienta para purificar proteínas. Se divulga, por

ejemplo, en el pliego de datos del fabricante GE Health Care (11-0035-45AA) Capto Adhere, en el pliego de datos del fabricante GE Health Care (28-9078-88AA) Capto MMC, y en la solicitud de patente WO-A-2009/024620 "A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins" (Un procedimiento para el aislamiento y la purificación de una proteínas diana exentas de proteínas priónicas).

5 La desventaja de la cromatografía multimodal mencionada anteriormente se evita mediante condiciones de elución suaves en un intervalo de pH aproximadamente neutro que conserva la actividad de la molécula de FIX y facilita el uso de la cromatografía multimodal en combinación con los efectos estabilizantes de la mayor concentración salina, divulgado, por ejemplo, en el documento EP-A-1 707634.

10 Según una realización de la invención, la cromatografía multimodal puede realizarse en una columna cromatográfica. Esto puede considerarse como una primera etapa de captura. El procedimiento de la invención también puede realizarse de modo discontinuo. La presente invención también facilita un procedimiento de purificación sin la adición de aditivos estabilizantes derivados de seres humanos o animales, y el uso de un proceso completo que no los contiene (resinas de inmutafinidad basadas en anticuerpos monoclonales). El uso de la resina multimodal, en particular como etapa de captura, facilita además una mayor capacidad de unión en comparación con los intercambiadores iónicos convencionales, y produce un producto de eluato de la etapa más concentrado, que es una ventaja para la estabilidad del producto.

El procedimiento de la invención está relacionado generalmente con la purificación de FIX recombinante (rFIX).

20 En otra realización del procedimiento de la invención, la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa cromatográfica de afinidad de FIX, en la que la afinidad es proporcionada por un ligando de proteína, tal como un fragmento de anticuerpo que se expresa en levaduras.

Por tanto, también se describe una composición de materia que comprende un FIX recombinante purificado que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención (sin la adición o el uso de ningún aditivo humano o animal, tal como albúmina o ligandos de inmutafinidad basados en anticuerpos monoclonales).

La invención se describe más a fondo mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

25 Ejemplos

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Análisis de la actividad biológica - Factor IX (el ensayo de coagulación de una etapa)

30 Se midió la actividad biológica del factor IX con un ensayo de coagulación de una etapa, y la unidad del factor IX se expresó en unidades internacionales (IU) definidas en la actual normativa de concentrados del factor IX de la OMS.

35 El ensayo de coagulación de una etapa es el procedimiento prescrito en la Farmacopea Europea. El principio del ensayo se basa en la capacidad de una muestra que contiene el factor IX para corregir el tiempo de coagulación de un plasma deficiente en factor IX en presencia de fosfolípidos, un activador de contacto e iones calcio. El momento de aparición de un coágulo de fibrina se mide en una etapa. La actividad del factor IX es inversamente proporcional al tiempo de coagulación. El procedimiento se realizó en un instrumento Siemens BCS XP.

SDS-PAGE (distribución del peso molecular)

40 La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas basándose en su tamaño. Este procedimiento describe la SDS-PAGE de proteínas, que se realiza bajo condiciones reducidas. Mediante el calentamiento de la muestra bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, las proteínas se despliegan y se revisten con el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS), adquiriendo una alta carga neta negativa que es proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica. Cuando se carga en una matriz de gel de poliacrilamida y se coloca en un campo eléctrico, las moléculas de proteínas cargadas negativamente migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan por un efecto de tamiz molecular, es decir, por sus pesos moleculares. Los geles de poliacrilamida frenan a las moléculas más grandes, que no migran con tanta rapidez como las moléculas más pequeñas. Debido a que la proporción de carga a masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de las proteínas depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración relativa de una proteína (R_f) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si se ensayan proteínas de masa conocida al mismo tiempo que las proteínas desconocidas, puede representarse gráficamente la relación entre R_f y la masa, y pueden calcularse las masas de proteínas desconocidas. Las bandas de proteínas separadas mediante electroforesis se visualizan mediante tinción con plata. La evaluación se realiza de modo visual juzgando el aspecto de los patrones, la referencia (muestra control) y las muestras analizadas.

Factor IX derivado de plasma

El material utilizado en estos experimentos proviene del producto disponible comercialmente Nanotiv®, que es un concentrado de factor IX nanofiltrado y tratado con SD de alta pureza.

Factor IX recombinante

5 Producción de una suspensión celular que contiene FIX.

Células

La línea celular utilizada es un derivado de la línea de células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293), que está adaptada para un crecimiento sin suero. Este hospedante, HEK 293F, se transfectó de modo estable con un módulo de expresión que porta la secuencia codificadora de ADNc para el FIX humano y la furina humana (PACE).
 10 Se empleó el mismo promotor fuerte para ambos módulos. El procedimiento general también se divulga en el documento EP-A-1 739 179 (Schröder *et al.*).

Procedimiento de cultivo

Las células se cultivaron en un medio sin suero con un equipo general y según procedimientos generales muy conocidos en la técnica, por ejemplo, cultivos agitados o removidos en matraces t, matraces de agitación y
 15 biorreactores (sistemas desechables y tanques de agitación convencionales) que funcionan con cultivos de quimiostato discontinuos, de alimentación discontinua, de perfusión o continuos (Freshney, R. I. (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4ª ed, Wiley-Liss; Spier, R. E. ed. (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, Nueva York; Enfors, S.-O. y Häggström, L. (2000), Bioprocess technology: fundamentals and applications, Högskoletyckeriet, Royal Institute of Technology, Estocolmo; Vinci, V. A. y Parekh, S. R. (2003),
 20 Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, EEUU). Generalmente, se emplea la perfusión del medio para aumentar el número de células y las titulaciones del producto por encima de los niveles de cultivo discontinuo convencionales. El rendimiento del producto y la cantidad de proteínas de la célula hospedante difieren dependiendo del modo de cultivo:

- la titulación del producto generalmente aumenta con el número de células,
- 25 • el contenido total en proteínas y en ADN generalmente aumenta con el número de células,
- el contenido total en proteínas y en ADN también puede aumentar con la longevidad del cultivo,
- los cultivos discontinuos acumulan proteínas y ADN; nada se añade externamente y nada se retira,
- los procedimientos de perfusión enjuagan a los cultivos celulares de metabolitos, proteínas, ADN y otras impurezas; los filtros o centrifugas de células se emplean generalmente para la retención de células.
- 30 El producto recombinante se libera de las células y la suspensión celular o el sobrenadante de la suspensión celular sería la recolección. Las propiedades de la recolección (titulaciones del producto e impurezas, tal como se mencionó anteriormente) difieren dependiendo del modo de cultivo utilizado.

La suspensión celular se ha utilizado en algunos de los ejemplos de FIX descritos a continuación.

Purificación de FIX empleando la resina Capto MMC como etapa de captura

35 **Ejemplo 1**

Material de partida

Se empleó FIX derivado de plasma (pdFIX, Nanotiv®). Se disolvió y diluyó Nanotiv liofilizado en tampón de equilibrio antes de ser cargado en una columna Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

40 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 15,7 cm. El volumen de la columna (CV) era de 3,1 ml.

Tampones

45 Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0

Tampón de lavado de baja salinidad: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,5

Tampón de lavado de alta salinidad: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,7 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,5

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,5

5 Configuración experimental

La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. El pdFIX se une a la resina Capto MMC durante estas condiciones de tampón. Tal como puede observarse en la tabla 1, no se encontró pdFIX en la corriente. Después la resina se sometió a diferentes condiciones de lavado, tal como se describe en la tabla 1, y no se detectó pdFIX en ninguno de los tampones de lavado ensayados. Mediante la adición de arginina 0,5 M al tampón, el FIX eluye de la resina y se obtiene un rendimiento del 85%.

Tabla 1

Muestra	Volumen, ml	FIX:C, IU/ml	FIX:C total, IU	Rendimiento, %
Material de partida	10	25,4	254	100
Corriente y lavado de equilibrio	40	0	0	0
Lavado de baja salinidad	3	0	0	0
Lavado de alta salinidad	3	0	0	0
Eluato	6	36	216	85

Conclusión

15 El FIX derivado de plasma (pdFIX, Nanotiv) se une a Capto MMC a pH 7 y puede lavarse con tampón NaCl al menos 0,7 M sin que se eluya de la resina.

Mediante la adición de monohidrocloruro de arginina 0,5 M al tampón, el pdFIX se eluye de la columna.

Ejemplo 2

Material de partida

20 FIX humana recombinante (rhFIX) producida en células HEK 293 Las células se retiraron y el sobrenadante sin células constituyó el material de partida cargado en la columna de Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

25 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna XK 26 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 15 cm. El volumen de la columna (CV) era de 80 ml.

Tampones

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0

Tampón de lavado de alta salinidad: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,7 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,5

30 Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,5

Configuración experimental

35 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 26 ml/min. El rhFIX se une a la resina Capto MMC durante estas condiciones de tampón. Tal como puede observarse en la tabla 2, no se encontró rhFIX en la corriente. El lavado de alta salinidad no eluye ninguna cantidad de rhFIX

de la columna. Mediante la adición de arginina 0,5 M al tampón, el rhFIX eluye de la resina y se obtiene un rendimiento del 92%.

Tabla 2

Muestra	Volumen, ml	FIX:C, IU/ml	FIX:C total, IU	Rendimiento, %
Material de partida	1600	1,27	2032	100
Corriente y lavado de equilibrio	2400	0	0	0
Lavado de alta salinidad	400	0	0	0
Eluato	60	31,1	1866	92

5 Conclusión

El FIX recombinante (rhFIX) se une a Capto MMC a pH 7 y puede lavarse con tampón NaCl al menos 0,7 M sin que se eluya de la resina.

Mediante la adición de monohidrocloreto de arginina 0,5 M al tampón, el rhFIX se eluye de la columna.

10 Los tampones utilizados contenían polisorbato 80 al 0,02% (un detergente no iónico) que no produjo ningún efecto negativo. Probablemente es una ventaja utilizar el polisorbato 80 en los tampones; compárese con los resultados obtenidos en el siguiente experimento (ejemplo 3), en el que no se añadió polisorbato 80 a los tampones utilizados.

Ejemplo 3

Material de partida

15 Se produjo FIX humana recombinante (rhFIX) en células HEK 293. Las células se retiraron y el sobrenadante sin células constituyó el material de partida cargado en la columna de Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

20 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna XK 26 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 15 cm. El volumen de la columna (CV) era de 80 ml.

Tampones

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0

Tampón de lavado de alta salinidad: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,7 M, pH 6,5

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, monohidrocloreto de arginina 0,5 M, pH 6,5

25 Configuración experimental y resultados

30 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 26 ml/min. El rhFIX se une a la resina Capto MMC durante estas condiciones de tampón. Tal como puede observarse en la tabla 3, en la corriente se encontró una cantidad baja de rhFIX cargado en la columna. Después, la resina se lavó con un tampón con una concentración de NaCl bastante alta, 0,7 M. Tal como se describe en la tabla 3, se detectó menos del 1% de rhFIX en este lavado. Mediante la adición de arginina 0,8 M al tampón, el rhFIX eluye de la resina y se obtiene un rendimiento del 84%. El tampón utilizado en este experimento no contenía polisorbato 80, comparado con el experimento 2 y el experimento 5.

Tabla 3

Muestra	Volumen, ml	FIX:C, IU/ml	FIX:C total, IU	Rendimiento, %
Material de partida	750	1,27	2032	100

ES 2 610 529 T3

Corriente y lavado de equilibrio	1550	0	0	4
Lavado de baja salinidad	400	0	0	0
Eluato	60	31,1	1866	84

Conclusión

La FIX humana recombinante (rhFIX) se une a Capto MMC a pH 7 y puede lavarse con tampón NaCl al menos 0,7 M sin que se eluya de la resina.

- 5 Mediante la adición de monohidrocloreto de arginina 0,8 M al tampón, el rhFIX se eluye de la columna.

No se añadió detergente a los tampones, lo cual puede indicar una recuperación algo menor del rhFIX en la fracción de elución.

Ejemplo 4 (Ejemplo 4A y Ejemplo 4B)

Material de partida

- 10 Se empleó FIX derivado de plasma (pdFIX, Nanotiv®). Se disolvió y diluyó Nanotiv liofilizado en tampón de equilibrio antes de ser cargado en una columna Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

- 15 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 15 cm. El volumen de la columna (CV) era de 3 ml.

Tampones

Para el experimento del ejemplo 4A:

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0

- 20 Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monohidrocloreto de arginina 0,5 M, pH 7,0

Para el experimento del ejemplo 4B:

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monohidrocloreto de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0

- 25 Configuración experimental

Se compara la purificación de pdFIX en una columna de Capto MMC con tampones con o sin polisorbato 80 y a un pH ajustado a 7,0. La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. El pdFIX se une a la resina Capto MMC durante estas condiciones de tampón. Tal como puede observarse en la tabla 4, no se encontró pdFIX en la corriente ni en la fracción de lavado de equilibrio.

- 30 Tabla 4

Muestra	Volumen, ml	FIX:C, IU/ml	FIX:C total, IU	Rendimiento, %
Ejemplo 4A (sin polisorbato 80)				
Material de partida	18	22,3	401	100
Corriente y lavado de equilibrio	15	0	0	0
Eluato	9	42,25	380	95
Ejemplo 4B (con polisorbato 80)				

Material de partida	18,45	25,9	478	100
Corriente y lavado de equilibrio	42	0	0	0
Eluato	9	52,85	476	99,5

Conclusión

5 Se eluyó un aumento del 5% del FIX derivado de plasma cuando se incluyó polisorbato 80 en los tampones, comparado con el caso en que no se encuentra polisorbato 80 en los tampones. La diferencia es pequeña, pero los resultados apuntan hacia un beneficio en la utilización de polisorbato 80 en los tampones. El rendimiento del pdFIX fue alto en ambos experimentos. Esto demuestra que el pH 7,0 en los tampones utilizados produce unos datos buenos, con relación a la unión y a la elución de pdFIX de la resina MMC.

Ejemplo 5 (Ejemplo 5A y Ejemplo 5B)

Material de partida

10 Se empleó FIX derivado de plasma (Nanotiv). Se disolvió y diluyó Nanotiv liofilizado en tampón de equilibrio antes de ser cargado en una columna Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

15 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna Tricorn 5/150 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 15 cm. El volumen de la columna (CV) era de 3 ml.

Tampones

Para el experimento del ejemplo 5A:

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 8,0

20 Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monohidrocloreuro de arginina 0,5 M, pH 8,0

Para el experimento del ejemplo 5B:

Tampón de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 6,0

Tampón de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 0,1 M, monohidrocloreuro de arginina 0,5 M, pH 6,0

Configuración experimental

25 Se compara la purificación de pdFIX en una columna de Capto MMC con tampones con dos pH diferentes, 8,0 y 6,0, empleados ambos en los tampones de unión y de elución. La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 1 ml/min. El pdFIX se une a la resina Capto MMC durante estas condiciones de tampón. Tal como puede observarse en la tabla 5, no se encontró pdFIX en la corriente. El rendimiento de pdFIX fue igualmente elevado en la fracción de elución para ambos pH ensayados.

30 **Tabla 5**

Muestra	Volumen, ml	FIX:C, IU/ml	FIX:C total, IU	Rendimiento, %
Ejemplo 5A (pH 8,0)				
Material de partida	18,83	22,9	431	100
Corriente y lavado de equilibrio	42	0	0	0
Eluato	9	38,8	349	81
Ejemplo 5B (pH 6,0)				
Material de partida	17,87	14	250	100

ES 2 610 529 T3

Corriente y lavado de equilibrio	42	0	0	0
Eluato	15	13,6	204	81

Conclusión

Estos experimentos demuestran que el FIX derivado de plasma puede unirse a la resina Capto MMC en tampones con un pH de 8,0 y 6,0, y que ambos pH también pueden utilizarse en el tampón de elución.

5 Ejemplo 6 (Ejemplo 6A-6K)

Objetivo

El objetivo de estos experimentos es estudiar la captura y elución del FIX humano recombinante (rhFIX) en una resina Capto MMC a tres pH diferentes: 6,0, 7,0 y 8,0. También se investigó la ventaja de incluir polisorbato 80 al 0,02% en estos tampones con respecto a la unión y la elución de rhFIX.

10 Material de partida

FIX humana recombinante producida en células HEK 293 Las células se retiraron y el sobrenadante sin células constituyó el material de partida cargado en la columna de Capto MMC.

Resina y columna cromatográfica

15 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna XK 16 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 13,5 cm. El volumen de la columna (CV) era de 27 ml.

Tampones

Ejemplo 6A

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 7,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 7,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, monohidrocloreuro de arginina 0,5 M, pH 7,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%
WFI: agua para inyección	

20

Ejemplo 6B

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 6,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 6,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, monohidrocloreuro de arginina 0,5 M, pH 6,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Ejemplo 6C

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, pH 8,0
----------------------	---------------------------------

ES 2 610 529 T3

Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, pH 8,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, pH 8,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Ejemplo 6D

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 7,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Ejemplo 6E

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, polisorbato 80 al 0,02%, pH 6,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

5

Ejemplo 6F

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, pH 8,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, pH 8,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, HEPES 20 mM, monohidrocloruro de arginina 0,5 M, pH 8,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Configuración experimental y resultados

10 La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 9 ml/min. La columna después se lavó con tampón de equilibrio, seguido de la elución del rhFIX unido de la columna de Capto MMC. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6

Ejemplo n.º de exp.	pH	P80 al 0,02%	FIX en la corriente, %	FIX en el eluato, %
Ejemplo 6A	7,0	no	0	89
Ejemplo 6D	7,0	sí	0	94

Ejemplo 6B	6,0	no	0	77
Ejemplo 6E	6,0	sí	0	86
Ejemplo 6C	8,0	no	0	80
Ejemplo 6F	8,0	sí	0	78

5 Los datos presentados en la tabla 6 demuestran que el rhFIX se une a Capto MMC a pH 6, pH 7 y pH 8. No se encontró rhFIX en la corriente. El rhFIX unido también puede eluirse de la resina Capto MMC a esos pH con una recuperación del >75%. La mejor recuperación se obtuvo con un tampón de elución a pH 7. La adición de polisorbato 80 al tampón de equilibrio y de elución produjo un aumento de al menos 5% cuando se emplea el pH 7 o 6. No se obtiene ningún beneficio del polisorbato 80 cuando se emplean tampones de pH 8.

Estos datos y los datos obtenidos en el experimento 5 indican un efecto positivo del polisorbato 80 en la recuperación de rhFIX y pdFIX en una resina Capto MMC.

Conclusión

10 La FIX humana recombinante puede unirse a Capto MMC en un intervalo de pH de al menos 6-8. Las moléculas de rhFIX se eluyen de la resina Capto MMC mediante la adición de monohidrocloreto de arginina 0,5 M a los tampones, independientemente de que se emplee cualquiera de los tres pH ensayos. Pero los resultados obtenidos demuestran que el pH 7 produce un rendimiento de rhFIX mayor. La adición del detergente polisorbato 80 indica un aumento en la recuperación de rhFIX cuando se emplea el pH 7 o 6.

15 **Ejemplo 7**

Objetivo

20 El objetivo de este ensayo es purificar el FIX humano recombinante del medio de cultivo para obtener un producto puro. Esto incluye tres etapas: una etapa de captura, una etapa de afinidad y una etapa de concentración e intercambio de tampón. Se empleó una resina Capto MMC como etapa de captura y se empleó una etapa de ligando de afinidad de FIX no derivado de animal como la principal etapa de purificación. Como etapa final se empleó un sistema de ultrafiltración con un límite de exclusión de 10 kDa, primero para concentrar la molécula y después para cambiar el tampón a un entorno de tampón fisiológico.

Material de partida para la etapa de captura

25 FIX humana recombinante producida en células HEK 293 Las células se retiraron y el sobrenadante sin células constituyó el material de partida cargado en la columna de Capto MMC.

Etapa de captura (Ejemplo 7A-C)

30 Se empleó Capto MMC, una resina de modo mixto de GE Healthcare (n.º de catálogo 17-5317), como etapa de captura para la molécula de FIX. Capto MMC es una resina catiónica débil con interacciones hidrófobas y tiofílicas y enlaces de hidrógeno. Una columna XK 50 se cargó con la resina Capto MMC hasta una altura del lecho de 16,5 cm. El volumen de la columna (CV) era de 324 ml.

Tampón de equilibrio	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 7,0
Tampón de lavado	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, pH 7,0
Tampón de elución	NaCl 0,1 M, citrato de sodio 20 mM, monohidrocloreto de arginina 0,5 M, pH 7,0
CIP	Triton X-100 al 1%/NaCl 0,5 M, NaOH 1 M, WFI, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Configuración experimental y resultados

La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 75 ml/min. La columna después se lavó con tampón de equilibrio, seguido de la elución del rhFIX unido de la columna

de Capto MMC. Los resultados se presentan en la tabla 7. La purificación del rhFIX se realizó en tres ensayos diferentes empleando la misma configuración experimental y el mismo tipo de tampones. Estas purificaciones de captura se realizaron a pH 7,0.

Tabla 7

Experimento	FIX en la corriente, %	FIX en el eluato, %
Ejemplo 7A	0	84,5
Ejemplo 7B	2	93,5
Ejemplo 7C	0	100

5

Los datos presentados en la tabla 7 demuestran que el rhFIX se une a Capto MMC a pH 7. No se encontró rhFIX en la corriente o se encontró muy poco. El rhFIX unido también puede eluirse de la resina Capto MMC a pH 7,0 mediante la adición de HCl de arginina hasta una concentración final de 0,5 M. El promedio de recuperación de estas tres capturas de rhFIX fue de 92%.

10 Etapa de afinidad de FIX (Ejemplo 7D-E)

Como etapa de afinidad se empleó un ligando de afinidad de FIX no derivado de animal (fragmento Fab) producido en levadura (desarrollado en cooperación con BAC BV, the Bio Affinity Company). Este ligando se acopló a una resina Capto MP (GE Healthcare) según técnicas de acoplamiento convencionales y se denomina la "resina de afinidad de FIX".

15 Una columna XK 26 se cargó con la resina de afinidad de FIX hasta una altura del lecho de 7,5 cm. El volumen de la columna (CV) era de 40 ml.

Tampón de equilibrio	NaCl 0,15 M, citrato de sodio 10 mM, pH 7,0
Tampón de lavado	NaCl 0,15 M, citrato de sodio 10 mM, pH 7,0
Tampón de elución	MgCl ₂ 2 M, base Tris 20 mM, pH 7,4
CIP	HAc 0,1 M, NaCl 2 M, etanol al 20%
Tampón de conservación	etanol al 20%

Configuración experimental y resultados

20 Se reunieron los eluatos de las tres etapas de captura y se emplearon como material de partida en la columna de afinidad. La columna se equilibró con tampón de equilibrio, seguido de la carga del material de partida a un caudal de 10 ml/min. La columna después se lavó con tampón de equilibrio, seguido de la elución del rhFIX unido de la columna de afinidad. Los resultados se presentan en la tabla 8. La purificación del rhFIX se realizó en dos ensayos diferentes empleando la misma configuración experimental y el mismo tipo de tampones

. Tabla 8

Experimento	FIX en la corriente, %	FIX en el eluato, %
Ejemplo 7D	50	47
Ejemplo 7E	15	80

25

Los datos presentados en la tabla 8 demuestran que el rhFIX se une a la resina de afinidad de FIX a pH 7. La corriente obtenida fue un efecto de la capacidad de unión de la cantidad de resina utilizada. Aproximadamente 100% del rhFIX usado en ambos experimentos pudo detectarse. El rhFIX unido puede eluirse de la resina de afinidad de FIX empleando un tampón que contenga MgCl₂ 2 M.

30 Etapa de concentración e intercambio de tampón (Ejemplo 7F)

Mediante la utilización de un sistema de UF se concentró el rhFIX en el eluato de la columna de afinidad y después el tampón se intercambi6 mediante una diafiltraci6n empleando el mismo filtro de UF.

Filtro de UF

Se emple6 un filtro Pellicon 3 con un l6mite de exclusi6n de 10 kDa montado en un sistema Pellicon 2.

Tamp6n de diafiltraci6n	NaCl 0,15 M, citrato de sodio 20 mM, pH 7,0, conductividad 18,4 mS/cm a 25 °C
-------------------------	---

5

Configuraci6n experimental y resultados

Mediante el bombeo de la muestra en un flujo tangencial y permitiendo que una peque6a parte del volumen pase continuamente a trav6s del filtro Pellicon 3, el volumen disminuy6. Debido al tama6o de poro empleado en el filtro, la mol6cula de rhFIX se encuentra contenida en la fracci6n de recirculaci6n. El peso molecular del rhFIX es de aproximadamente 55 kDa y es retenido cuando se emplea un filtro con un tama6o de poro de 10 kDa.

10

Se concentr6 un volumen de 310 ml de eluato de afinidad hasta aproximadamente 60 ml. Este volumen se diafiltr6 mediante la adici6n continua de tamp6n de diafiltraci6n a la misma velocidad a la que se filtra a trav6s del filtro Pellicon 3. El tamp6n en este concentrado de 60 ml se cambi6 aproximadamente 18 veces. La conductividad de este concentrado cambi6 de 123 mS/cm a 18,6 mS/cm a 25 °C.

15

La recuperaci6n del rhFIX en esta etapa de concentraci6n e intercambio de tamp6n fue del 86%. Se realiz6 una etapa de lavado del filtro de UF con el tamp6n de di6lisis para recuperar tanto rhFIX como fuera posible.

20

La figura 1 muestra el patr6n de pureza de SDS-PAGE despu6s de la purificaci6n de la resina de afinidad de FIX. El carril 1 es un marcador molecular disponible comercialmente, el carril 2 es un producto de FIX derivado de plasma de alta pureza disponible comercialmente, el carril 3 es un producto de FIX recombinante de alta pureza disponible comercialmente, los carriles 4 y 5 son muestras despu6s de la purificaci6n por afinidad de FIX de la invenci6n seg6n se describe en el ejemplo 7D y 7E, los carriles 6 y 7 son muestras despu6s de la purificaci6n por afinidad y concentraci6n con ultrafiltraci6n/desalaci6n de FIX seg6n se describe en el ejemplo 7F. Como puede observarse a partir de los carriles 4-7, la pureza del producto de FIX producido seg6n la invenci6n no muestra impurezas de peso molecular menor o mayor, comparado con el carril 2 o 3.

25

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de fabricación de una proteína dependiente de vitamina K exenta de priones en una secuencia de purificación que emplea cromatografía, **caracterizado porque:**

- al menos una etapa de cromatografía se realiza empleando una resina multimodal;

5 - se proporciona una fracción que contiene una proteína dependiente de vitamina K en una disolución acuosa;

- se pone en contacto la fracción que contiene la proteína dependiente de vitamina K con una resina multimodal a un pH entre 6-9;

10 - opcionalmente se lava la resina multimodal que tiene la proteína dependiente de vitamina K adsorbida con un tampón de lavado acuoso para lavar los contaminantes y retener a la proteína dependiente de vitamina K, antes de eluir la proteína dependiente de vitamina K;

- la proteína dependiente de vitamina K se eluye de la resina multimodal a un pH entre 6 a 9 en un tampón que comprende arginina; y

- opcionalmente se recogen las fracciones que contienen la proteína dependiente de vitamina K en forma purificada o enriquecida;

15 en el que la proteína dependiente de vitamina K es FIX derivado de plasma o FIX producido de modo recombinante.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la resina multimodal comprende restos unidos a una matriz, y los restos son capaces de interactuar con la proteína dependiente de vitamina K en un entorno acuoso a través de interacciones iónicas y otros tipos de interacciones, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y tiofílicas.

3.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** la disolución acuosa comprende la proteína dependiente de vitamina K en una disolución salina que se corresponde con una conductividad de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C y/o el tampón de elución se corresponde con una conductividad de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 mS/cm a 25 °C.

25 4.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la arginina está presente a unas concentraciones de 0,1-0,3 M y 0,7-1 M, en particular de 0,3-0,7 M.

5.- El procedimiento de la reivindicación 4 **caracterizado porque** la proteína dependiente de vitamina K se eluye con un tampón que tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, en particular un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 o a pH 7.

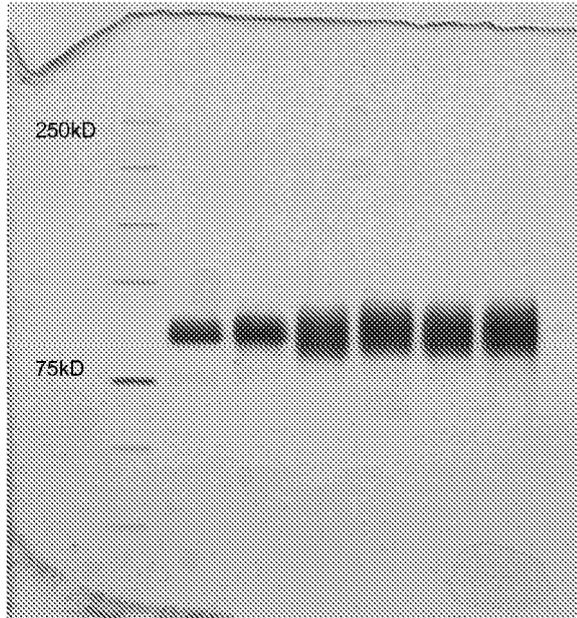
30 6.- El procedimiento de al menos una de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado porque** el tampón de elución comprende además agentes seleccionados del grupo que consiste en al menos un compuesto orgánico que contiene un grupo hidroxilo, tal como un alcohol, al menos un compuesto orgánico que contiene un grupo amino, tal como un aminoácido, al menos un compuesto para regular la fuerza iónica del tampón, tal como sales inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en cloruro de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, sulfato de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de bario, sulfato de bario, sulfato de amonio, al menos un detergente no iónico, al menos una sustancia tamponante para regular el pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, en particular a aproximadamente un valor neutro, o sus combinaciones.

40 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, **caracterizado porque** el alcohol se selecciona del grupo que consiste en metanol, propanol, etilenglicol y propilenglicol; la sal inorgánica se selecciona del grupo que consiste en KCl y NaCl; el detergente no iónico se selecciona del grupo que consiste en Tween 20, Tween 80 y Pluronic F68; la sustancia tamponante se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, histidina, HEPES, MES, base Tris y acetato de sodio a un pH entre 6-9, citrato de sodio para el ajuste del pH a 6-7,5 y base Tris para el ajuste del pH a 7,5-9.

45 8.- El procedimiento de al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína dependiente de vitamina K se eluye con una combinación de NaCl/etilenglicol o una combinación de arginina/NaCl, o una combinación de arginina/etilenglicol.

9.- El procedimiento de al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** la resina de cromatografía "multimodal" contiene al menos uno de los siguientes restos:

- a. un ligando de N-bencil-N-metiletanolamina cargado positivamente,
 - b. un ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanoico cargado negativamente,
 - c. un ligando de fenilpropilo,
 - d. un ligando de N-hexilo,
 - 5 e. un ligando de 4-mercaptoetilpiridina,
 - f. un ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)amino)fenil)amino)benzoico, o sus combinaciones.
- 10.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** la resina de cromatografía "multimodal" se selecciona de las siguientes resinas disponibles comercialmente: HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC; MEP Hypercel™.
- 10 11.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad de proteína dependiente de vitamina K, en el que la afinidad es proporcionada por un ligando que se basa en una proteína expresada en levaduras, y la pureza del eluato resultante es mayor que 90%.
- 15 12.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** la secuencia de purificación comprende además etapas de eliminación/inactivación de patógenos que comprenden una etapa de inactivación con base química, ultra-filtración, etapas de cromatografía o sus combinaciones, etapas que se basan en diferentes propiedades fisiológicas dirigidas al patógeno a eliminar.
- 13.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** la secuencia de purificación comprende además las siguientes etapas:
- 20 i. una resina multimodal catiónica, tal como Capto MMC;
- ii. una etapa de inactivación con base química para virus con envuelta de lípidos, en particular la inactivación con disolvente/detergente que emplea el fosfato de tri-n-butilo y Triton X-100;
- iii. una resina de afinidad basada en un ligando de proteína, tal como un ligando que consiste en un fragmento de anticuerpo de proteína dependiente de vitamina K expresado en levaduras;
- 25 iv. una etapa de eliminación de patógenos con filtración con un promedio de tamaño de poro de aproximadamente 20 nm, tal como Planova 20N;
- v. una resina de intercambio aniónico, tal como Q Sepharose FF o Capto Q;
- vi. una etapa de ultrafiltración, tal como Pellicon 3 con un límite de exclusión de 10 kDa.
- 30 14.- El procedimiento de la reivindicación 13, **caracterizado porque** la etapa de cromatografía multimodal se combina con una etapa de cromatografía de afinidad, en el que la afinidad es proporcionada por un ligando que se basa en una proteína expresada en levaduras, y la pureza del producto resultante de la resina de cromatografía de afinidad es mayor que 95%.
- 35 15.- El procedimiento de la reivindicación 14, **caracterizado porque** se realiza una etapa o etapas de cromatografía adicionales seleccionadas de cromatografía de exclusión por tamaño, de intercambio aniónico, de intercambio catiónico, de interacción hidrófoba y de afinidad de metal inmovilizado, **caracterizado porque** la pureza del producto final es mayor que 99%.



1. Marcador molecular, Biorad Precision plus
2. Producto de FIX plasmático Nanotiv®
3. FIX recombinante Benefix®
4. Eluato de afinidad de FIX (ejemplo 7D)
5. Eluato de afinidad de FIX (ejemplo 7E)
6. Conc. de UF (ejemplo 7F)
7. Lavado de conc. de UF (ejemplo 7F)

Carril 1 2 3 4 5 6 7

FIG. 1