

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 458**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2013** **PCT/US2013/045496**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO2013188587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2013** **E 13732317 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016** **EP 2861614**

54 Título: **Procedimiento para purificación de derivados de factor Xa recombinante**

30 Prioridad:

14.06.2012 US 201261659821 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2017

73 Titular/es:

PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
270 East Grand Avenue, Suite 22
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es:

LU, GENMIN y
SINHA, UMA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 612 458 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para purificación de derivados de factor Xa recombinante.

5 ANTECEDENTES

Los anticoagulantes cubren una necesidad en el mercado en el tratamiento o la prevención de trombosis no deseada en pacientes con una tendencia a formar coágulos de sangre, tales como, por ejemplo, aquellos pacientes que tienen trastornos de coagulación, confinados a periodos de inmovilidad o que se están sometiendo a cirugías
10 médicas. Una de las principales limitaciones de la terapia anticoagulante, sin embargo, es el riesgo de hemorragia asociado con el tratamiento, y las limitaciones en la capacidad de revertir rápidamente la capacidad anticoagulante en caso de sobredosis o si se requiere un procedimiento quirúrgico urgente. Por lo tanto, antídotos específicos y eficaces para todas las formas de terapia anticoagulante son altamente deseables. Por consideraciones de seguridad, también es ventajoso tener un par anticoagulante-antídoto en el desarrollo de nuevos fármacos
15 anticoagulantes.

Derivados de proteínas del factor Xa (fXa) modificados descritos anteriormente son útiles como antídotos para anticoagulantes dirigidos a fXa, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos N° 8.153.390 y 8.268.783. Los derivados modificados de proteínas de fXa se unen a y/o neutralizan sustancialmente el
20 anticoagulante. Ciertas modificaciones introducidas en estos derivados de fXa, sin embargo, plantean varios desafíos para purificación, dado que procedimientos convencionales para purificación de factores de coagulación pueden no ser eficaces para estas proteínas de fXa modificadas.

RESUMEN

En el presente documento se describen procedimientos y kits para purificar una serina proteasa. Los procedimientos, en algunas realizaciones, conllevan cargar la serina proteasa en un cromatógrafo de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI), tal como una resina o una columna, y eluir el polipéptido con un tampón de elución. El tampón de elución comprende un agente competitivo, que interrumpe la interacción entre el STI y la serina proteasa que es
30 arginina. En algunas realizaciones, el tampón de elución comprende además una sal y/o un detergente.

En una realización, se proporciona un procedimiento de purificación de una serina proteasa que comprende cargar la serina proteasa en un cromatógrafo de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI), y eluir la serina proteasa con un tampón de elución que comprende serina que interrumpe la interacción entre el STI y la serina
35 proteasa.

En algunos aspectos, el tampón de elución comprende además una sal, un detergente y/o un agente caotrópico.

En algunos aspectos de la divulgación, el agente es un agente competitivo que puede seleccionarse de entre el
40 grupo que consiste en benzamidina, p-aminobenzamidina, arginina, un inhibidor de fXa de molécula pequeña, un inhibidor de fXa peptídico y un inhibidor de fXa peptidomimético. El agente competitivo es arginina.

En algunos aspectos, la serina proteasa es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2, o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con la SEQ
45 ID NO: 1 o 2, que tiene una delección de al menos parte del dominio Gla y una mutación en el sitio activo.

En algunos aspectos, la serina proteasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, que tiene una delección de al menos parte del dominio Gla y una mutación en el sitio activo. En algunos aspectos, la serina
50 proteasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En algunos aspectos, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,5. En algunos aspectos, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 5,0. En algunos aspectos, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 7,4.
55

En algunos aspectos, el tampón de elución comprende de arginina aproximadamente 250 mM a arginina aproximadamente 1000 mM. En algunos aspectos, el tampón de elución comprende arginina aproximadamente 500 mM. En algunos aspectos, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 5,0.

En algunos aspectos, el procedimiento comprende además someter a la serina proteasa eluida a purificación con una columna de intercambio iónico.

También se describen serina proteasas purificadas que se preparan mediante el procedimiento de la presente divulgación.

En una realización, se proporciona un kit que comprende un cromatógrafo de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI), y un tampón de elución que comprende arginina que interrumpe la interacción entre el STI y una serina proteasa.

En algunos aspectos, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,5. En algunos aspectos, el tampón de elución comprende de arginina aproximadamente 250 mM a arginina aproximadamente 1000 mM. En algunos aspectos, el kit comprende además un tampón de lavado que comprende NaCl aproximadamente 250 mM a un pH neutro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** muestra la SEQ ID NO: 1, un derivado de fXa (también denominado precursor de r-Antídoto) con el enlazador, -RKRRKR- (SEQ ID NO: 3) en los aminoácidos 106-111.

La **figura 2** muestra la SEQ ID NO: 2, un derivado de fXa (también denominado r-Antídoto) con el enlazador eliminado del precursor de r-Antídoto.

La **figura 3** muestra el perfil de carga usando r-Antídoto purificado en una resina de afinidad de Benzamidina-Agarosa, tal como se describe en el ejemplo 1.

La **figura 4** muestra el perfil de carga usando r-Antídoto purificado en una resina de afinidad de L-Lisina-Agarosa, tal como se describe en el ejemplo 1.

La **figura 5** muestra el perfil de carga usando r-Antídoto purificado en una resina de afinidad de Aprotinina-Agarosa, tal como se describe en el ejemplo 1.

La **figura 6** muestra el perfil de carga usando r-Antídoto purificado en una resina de afinidad de STI-Agarosa, tal como se describe en el ejemplo 1.

La **figura 7** muestra el perfil de carga de STI-Agarosa usando medios acondicionados recogidos del cultivo celular (fluido de cultivo celular recogido), que demuestra que la proteína funcional es capturada por la resina STI (tal como se describe en el ejemplo 2).

La **figura 8** muestra el perfil de carga usando fluido de cultivo celular recogido en una precolumna HQ-Sepharose (en modo de flujo pasante), tal como se describe en el ejemplo 2.

La **figura 9** muestra el perfil de carga de fracciones de pulo pasante (FT) de HQ-sepharose cargadas en STI-Agarosa que demuestra que la proteína funcional es capturada por resina STI.

Las **figuras 10A-B** muestran que las proteínas unidas se eluyen con benzamidina 1 M, tal como se describe en el ejemplo 2. El perfil de elución que usa benzamidina 1 M se muestra en la figura 10A, y un Western blot con el STI eluido y fracciones combinadas se muestra en la figura 10B. El marcador molecular se carga en los carriles 1 y 1A; FXa se carga en los carriles 2 y 2B; y el r-Antídoto eluido a partir de la columna de STI-agarosa se carga en los carriles 4 y 4B de la figura 10B.

La **figura 11** muestra el perfil de elución con un gradiente de benzamidina, tal como se describe en el ejemplo 2.

La **figura 12** muestra el perfil de elución del procedimiento de incremento a escala descrito en el ejemplo 2.

La **figura 13** muestra el esquema de purificación de r-Antídoto para 25 l de medio (bolsas Wave). UF = Ultrafiltración; MWCO = Valor de corte de peso molecular; UF/DF = Ultrafiltración/Diafiltración.

La **figura 14** representa una SDS-PAGE del r-Antídoto purificado, tal como se describe en el ejemplo 2.

La **figura 15** muestra el perfil de elución de una columna de afinidad de STI usando un tampón de elución de arginina, tal como se describe en el ejemplo 3.

- 5 La **figura 16** representa un gel teñido con plata reducido con eluyente cargado de diversas columnas de afinidad de STI con diferentes resinas de STI (A-E), tal como se describe en el ejemplo 3. La elución con tampón de arginina produjo un perfil de producto similar a la elución con benzamida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10

Definiciones

La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro
15 del alcance de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición; Ausubel y col., eds. (1987) *Current Protocols In Molecular Biology*; MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Harlow and Lane, eds. (1999) *Using Antibodies, a Laboratory Manual*; y R.I. Freshney, ed. (1987) *Animal Cell Culture*.

20

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa, generalmente, el valor indicado más o menos un intervalo del 10% de ese valor.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el” incluyen
25 referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan de forma intercambiable y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto o dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede
30 estar enlazada mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación al número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de una proteína o un péptido. Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos, tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Los “peptidomiméticos” son pequeñas cadenas similares a
35 proteínas diseñadas para imitar a un péptido. Éstas pueden prepararse a partir de modificación de un péptido existente, o diseñando sistemas similares que imitan a péptidos, tales como peptoides y β -péptidos.

El término “aislado” o “recombinante”, tal como se usan en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN. El término “aislado” también se usa
40 en el presente documento para referirse a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que se aíslan de otras proteínas celulares y pretende abarcar polipéptidos tanto purificados como recombinantes. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada de tejido o células de fenotipo o genotipo distinto. Un polinucleótido aislado está separado de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que está normalmente asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Tal como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido,
45 polipéptido, proteína, anticuerpo o uno o más fragmentos del mismo no de origen natural, no requiere “aislamiento” para distinguirlo de su contrapartida de origen natural.

La expresión “equivalente biológico de” una proteína, péptido o polinucleótido se refiere a uno que tiene al menos aproximadamente el 80% de homología o identidad de secuencia y, como alternativa, al menos aproximadamente el
50 85%, o como alternativa al menos aproximadamente el 90%, o como alternativa al menos aproximadamente el 95%, o como alternativa el 98% de porcentaje de homología o identidad de secuencia, y muestra actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia.

“Hibridación” se refiere a reacciones de hibridación que pueden realizarse en condiciones de diferente “astringencia”.
55 Las condiciones que incrementan la astringencia de una reacción de hibridación se conocen ampliamente y están publicadas en la técnica: véase, por ejemplo, Sambrook, y col., más adelante. Los ejemplos de condiciones relevantes incluyen (con el fin de incrementar la astringencia): temperaturas de incubación de 25°C, 37°C, 50°C y 68°C; concentraciones de tampón de 10 X SSC, 6 X SSC, 1 X SSC, 0,1 X SSC (donde SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM) y su equivalente usando otros sistemas tampón; concentraciones de formamida del 0%, 25%,

50% y 75%; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas y lavados de duración creciente, frecuencia creciente o concentraciones de tampón decrecientes.

Un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) que tiene cierto porcentaje (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. El alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento preferido es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; valor de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificadas por = ALTA PUNTUACIÓN; Bases de datos = non redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede estar alineada para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias está en función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte, por ejemplo, menos del 40% de identidad, o como alternativa menos del 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

El término "fracción", cuando se usa en el contexto del aislamiento de proteínas, se refiere a una colección de material separado basándose en una propiedad específica. La propiedad específica puede incluir, a modo de ejemplo no limitante, tamaño, masa, punto isoeléctrico, carga y similares.

"Factor Xa" o "fXa" o "proteína fXa" se refiere a una serina proteasa en la ruta de coagulación sanguínea, que es producida a partir del factor X (fX) inactivo. El factor Xa es activado por el factor IXa con su cofactor, el factor VIIIa, en un complejo conocido como Xasa intrínseca, o el factor VIIa con su cofactor, el factor tisular, en un complejo conocido como Xasa extrínseca. fXa forma un complejo protrombina unido a la membrana con el factor Va y es el componente activo en el complejo protrombina que cataliza la conversión de protrombina en trombina. La trombina es la enzima que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina, que, en última instancia, causa la formación del coágulo sanguíneo.

Tal como se usa en el presente documento, un "derivado de fXa" se refiere a una proteína de fXa modificada que no compite con fXa en el ensamblaje en el complejo protrombina y que aún se une y/o neutraliza sustancialmente un anticoagulante, tal como un inhibidor de fXa. En algunas realizaciones, el derivado de fXa tiene actividad procoagulante reducida o ninguna. Un ejemplo de un derivado de fXa se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 2 (**figura 2**) o un equivalente biológico de la misma.

La expresión "sitio activo" se refiere a la parte de una enzima o anticuerpo donde se produce una reacción química. Un "sitio activo modificado" es un sitio activo que ha sido modificado estructuralmente para dotar al sitio activo de reactividad o especificidad química incrementada o reducida. Los ejemplos de sitios activos incluyen, aunque sin limitarse a, el dominio catalítico del factor X humano que comprende los 235-488 residuos de aminoácidos, y el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los 195-448 residuos de aminoácidos de fXa. Los ejemplos del sitio activo modificado incluyen, aunque sin limitarse a, el dominio catalítico del factor Xa humano con al menos una sustitución de aminoácidos en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 o Arg424.

Tal como se ha indicado anteriormente, los derivados de la invención pueden tener dominios Gla modificados o tener todo el dominio Gla eliminado. El dominio Gla del fXa se refiere a los residuos de aminoácidos 1-45 de la proteína fXa de tipo silvestre. En algunas realizaciones, los derivados tienen una delección completa (1-45) o parcial del dominio Gla (por ejemplo, 1-44, 1-39 o 6-39).

"Precursor de r-Antídoto" se refiere a un derivado de fXa representado por la SEQ ID NO: 1, que contiene tres mutaciones con respecto a fXa de tipo silvestre humano. La primera mutación es una delección en el dominio Gla de la proteína fX de tipo silvestre en la posición 6-39. La segunda mutación es sustituir la secuencia peptídica de activación de los aminoácidos 143-194 con -RKR-. Esto produce un enlazador -RKRRKR- (SEQ ID NO: 3) que

conecta la cadena ligera y la cadena pesada. En el momento de la secreción, este enlazador se escinde en CHO dando como resultado un polipéptido bicatenario escindido. La expresión “polipéptido bicatenario escindido” se refiere a un polipéptido de la SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene el 80% de identidad con la SEQ ID NO: 2, que tiene dos cadenas y que están enlazadas entre sí mediante un puente disulfuro. La cadena N-terminal consiste en los aminoácidos 1-105 de la SEQ ID NO: 2 y la cadena C-terminal consiste en los aminoácidos 106-359 de la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la cadena LC puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos del enlazador. Dichos residuos adicionales resultan de la eliminación incompleta del polipéptido enlazador. La tercera mutación es una mutación del residuo del sitio activo S379 a un residuo Ala (numeración de aminoácidos basada en la secuencia de fX humano secretado). Esta sustitución de aminoácidos corresponde al aminoácido 296 y 290 de las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.

El término “r-Antídoto” puede referirse al polipéptido antes de la eliminación del enlazador (SEQ ID NO: 1) o después de la eliminación del enlazador (SEQ ID NO: 2). La solicitud de Estados Unidos 13/766.652, describe procedimientos y células para el procesamiento mejorado o potenciado del precursor de r-Antídoto monocatenario a la proteína r-Antídoto bicatenario escindido que actúa como un antídoto para los inhibidores de fXa.

“STI” o “Inhibidor de tripsina de soja”, se refiere a inhibidores de tripsina aislados a partir de semillas de soja, o sus equivalentes biológicos. Los inhibidores de tripsina son de aproximadamente 20 kDa de tamaño y reducen la actividad de tripsina (una enzima proteolítica) así como calicreína plasmática, factor Xa y plasmina. Los STI están disponibles en el mercado de proveedores tales como Life Technologies (Grand Island, NY). Un ejemplo de STI es el inhibidor de tripsina KTI3 Kunitz, de Glycine max (soja), que tiene un número de acceso al GenBank NP_001238611.

La expresión “agente competitivo” es una molécula que puede ayudar a la elución de la serina proteasa de la columna de afinidad de STI mediante interrupción de una interacción carga-carga entre el STI y la serina proteasa o compitiendo con STI por la unión a la serina proteasa. Los ejemplos no limitantes incluyen benzamidina, p-aminobenzamidina, arginina, un inhibidor de fXa de molécula pequeña, un inhibidor de fXa peptídico y un inhibidor de fXa peptidomimético.

La expresión “inhibidores del factor Xa” o “inhibidores de factor Xa” se refieren a compuestos, péptidos, peptidomiméticos, que pueden inhibir, directa o indirectamente, la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de protrombina en trombina *in vitro* y/o *in vivo*. Los ejemplos de inhibidores de fXa conocidos incluyen, sin limitación, fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmina, NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a (tal como se describe en, por ejemplo, Herbert, J.M., y col, J Pharmacol Exp Ther. 1996 276(3): 1030-8), YM-60828 (tal como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., y col, Thromb Haemost. 1998 79(3): 543-8), YM-150 (tal como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B.I. y col., Blood 2005; 106(11), Resumen 1865), apixaban, rivaroxaban, PD-348292 (tal como se describe en, por ejemplo, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), otamixaban, razaxaban (DPC906), BAY 59-7939 (tal como se describe en, por ejemplo, Turpie, A.G., y col, J. Thromb. Haemost. 2005, 3(11): 2479-86), DU-176b (tal como se describe en, por ejemplo, Hylek EM, Curr Opin Invest Drugs 2007 8(9): 778-783), LY517717 (tal como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., y col, J. Thromb. Haemost. 2007 5(4): 746-53), GSK913893, betrixaban (tal como se describe a continuación) y derivados de los mismos. La heparina de bajo peso molecular (“LMWH”) también se considera un inhibidor del factor Xa.

La expresión “agente caotrópico” pretende significar una sustancia que rompe la estructura de, y desnaturaliza, macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Los agentes caotrópicos incluyen, por ejemplo, butanol, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, cloruro de magnesio, fenol, propanol, dodecil sulfato sódico, tiourea y urea.

Procedimientos

La presente divulgación describe procedimientos para purificar serina proteasas en forma activa a partir de una muestra que contiene las serinas proteasas. Estos procedimientos son superiores a procedimientos convencionales para la purificación de serina proteasas. Además, los procedimientos son eficaces en la purificación de serinas proteasas incluso modificadas, modificaciones, tales como aquellas en r-Antídoto en comparación con el fXa de tipo silvestre, que afectan a la unión y/o las actividades enzimáticas de las proteasas.

Se ha demostrado que el factor Xa y otras serina proteasas pueden purificarse usando un cromatógrafo de afinidad de benzamidina-Sepharose. Los ensayos iniciales (véase, por ejemplo, el ejemplo 1) indican que ciertos derivados de fXa que carecen del dominio Gla tienen baja afinidad con respecto a cromatografos de intercambio iónico

convencionales tales como Q-Sepharose debido a la delección del dominio Gla. Sorprendentemente, el r-Antídoto no se une al cromatógrafo de afinidad benzamidina-Sepharose, u otro cromatógrafo de afinidad disponible en el mercado similar de ligandos pequeños. La presente divulgación describe la purificación de serina proteasas usando un cromatógrafo de afinidad basado en STI y una etapa de elución con un agente competitivo que es arginina, y 5 opcionalmente una sal y un detergente.

La serina proteasa puede producirse de forma recombinante tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en el documento 13/766.652, o mediante otros procedimientos de producción de proteínas recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden clonarse en una construcción de ADN (es decir plásmidos, vectores 10 virales, cósmidos, vectores de expresión, fagémidos, fósmidos, y cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, y cromosomas artificiales humanos) e introducirse en una célula huésped adecuada mediante técnicas de transferencia de genes tales como transfección de base química, tal como transfección y polifección con fosfato cálcico, y transfección no de base química tal como electroporación, transfección óptica, y electrotransferencia de genes. Las células huésped adecuadas incluyen 15 células procariotas y eucariotas, que incluyen, aunque sin limitarse a células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células animales, células de mamífero, células murinas, células de rata, células de oveja, células de simio y células humanas. Las células que pueden lisarse a continuación mediante técnicas físicas tales como sonicación o congelación-descongelación o mediante el uso de detergentes o tampones de lisis tales como tampón RIPA (ensayo de radioinmunoprecipitación) que contiene NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 al 1,0%, desoxicolato 20 sódico al 0,5%, SDS al 0,1% y Tris 50 mM, pH 8,0, o mediante separación física, tal como centrifugado o filtración, para obtener el fluido de cultivo recogido clarificado de cultivos celulares de mamífero. El extracto de proteínas soluble resultante puede usarse a continuación en los procedimientos de purificación descritos en el presente documento.

El extracto de proteínas se aplica a cromatógrafos de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI). El inhibidor de tripsina de soja es una proteína de 20 kDa y puede inmovilizarse sobre una resina de soporte sólido para la purificación de ciertas proteínas. Además del Inhibidor de tripsina de soja, también pueden usarse otras proteínas inhibidoras de tripsina tales como aquellas aisladas a partir de suero, judías de lima, páncreas bovino u ovomucoide, o las formas modificadas de las mismas. También está contemplado que ciertos inhibidores de 25 proteasa, en particular inhibidores de serina proteasa, puedan usarse para preparar resina de afinidad con el fin de purificar el r-Antídoto, serina proteasas u otros derivados del Factor Xa. La identificación de adecuados de estos inhibidores de proteasa puede llevarse a cabo con procedimientos descritos en el presente documento.

La serina proteasa puede eluirse a continuación con un tampón de elución que comprende un agente competitivo, 35 una sal, un detergente o un agente caotrópico. El agente competitivo interrumpe la interacción entre el STI y la serina proteasa o compitiendo con STI por la unión a la serina proteasa. Los ejemplos no limitantes de agentes competitivos incluyen benzamidina, arginina, inhibidores de fXa de molécula pequeña, inhibidores de fXa peptídicos, o inhibidores de fXa peptidomiméticos. Los inhibidores del factor Xa directos incluyen NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la ruta del factor tisular, DX-9065a, YM-60828, YM-150, apixaban, rivaroxaban, TAK-442, PD-348292, otamixaban, 40 edoxaban, LY517717, GSK913893, razaxaban, betrixaban o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los inhibidores peptídicos de fXa incluyen el tripéptido cetotiazol y el aldehído correspondiente tal como se describe en Betz y col., "Inhibition of Factor Xa by a Peptidyl- α -ketothiazole Involves Two Steps. Evidence for a Stabilizing Conformational Change", *Biochemistry* (1999), 38, 14582-14591.

El agente competitivo es arginina. La elución con arginina es ventajosa debido a que es un a excipiente GRAS (reconocido en general como seguro) y no es necesario eliminarlo de la proteína purificada. Un beneficio adicional de la arginina es que realmente mejora la solubilidad de una serina proteasa (por ejemplo, r-Antídoto) y puede usarse como excipiente en la formulación final.

La concentración de arginina empleada en el tampón de elución puede ser de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 1000 mM. En una realización, la concentración de arginina en el tampón de elución es aproximadamente 500 mM. En realizaciones adicionales, la concentración es aproximadamente 250 mM, o aproximadamente 300 mM, o aproximadamente 350 mM, o aproximadamente 400 mM, o aproximadamente 450 mM, o aproximadamente 550 mM, o aproximadamente 600 mM, o aproximadamente 650 mM, o aproximadamente 700 mM, o aproximadamente 750 mM, o aproximadamente 800 mM, o aproximadamente 850 mM, o 50 aproximadamente 900 mM, o aproximadamente 1 M. El tampón de elución opcionalmente comprende además una sal, un detergente, o un agente caotrópico. Las sales útiles en el tampón de elución de los procedimientos y kits descritos en el presente documento incluyen cloruro sódico, cloruro de amonio, citrato sódico, citrato potásico, cloruro potásico, cloruro de magnesio, cloruro cálcico, fosfato sódico, cloruro cálcico, fosfato de amonio, fosfato de

magnesio, fosfato potásico, sulfato sódico, sulfato de amonio, sulfato potásico, sulfato de magnesio, sulfato cálcico, etc. Los detergentes útiles en el tampón de elución de los procedimientos y kits descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, polisorbato 80, urea, guanidina, etc.

- 5 El pH del tampón de elución en los procedimientos y kits descritos en el presente documento es uno que permite la elución eficaz de una proteína serina proteasa adsorbida sobre la resina sin causar inactivación y/o precipitación de la serina proteasa. Ciertos derivados de fXa tales como r-Antídoto se inactivan o precipitan a pH bajo. En ciertas realizaciones, el pH del tampón de elución es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,5. En otra realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente pH 5,0. En otra realización, el pH del tampón de elución es
- 10 aproximadamente pH 7,4. Como alternativa, el pH del tampón de elución es al menos aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5 o al menos aproximadamente 10. En otra realización, el pH del tampón de elución no es mayor de aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0,
- 15 aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 o no mayor de aproximadamente 10,5. En una realización, el pH del tampón de elución es aproximadamente pH 5,0 cuando se usa arginina como agente competitivo.

- En ciertas realizaciones, la serina proteasa es un derivado de fXa que, por ejemplo, es un polipéptido que
- 20 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2. En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2 tiene sustancialmente la misma actividad que la SEQ ID NO: 1 o 2. El derivado de fXa representado por la SEQ ID NO: 1 contiene tres mutaciones con respecto a fXa. La primera mutación es la delección en el dominio Gla de FX en la
- 25 posición 6-39 en la proteína de tipo silvestre. La segunda mutación sustituye la secuencia peptídica de activación de los aa 143-194 con -RKR-. Esto produjo un enlazador - RKRRKR- (SEQ ID NO: 3) que conecta la cadena ligera y la cadena pesada. En el momento de la secreción, este enlazador se escinde en CHO dando como resultado una molécula de fXa bicatenaria (SEQ ID NO: 2). La tercera mutación es la mutación del residuo del sitio activo S379 a un residuo Ala (basada en la secuencia de aminoácidos de FX secretado humano). Esta sustitución de aminoácidos
- 30 corresponde al aminoácido en la posición 296 y la posición 290 de las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. El derivado de fXa no compite con fXa en el ensamblaje en el complejo protrombinasa, sino que, en su lugar, se une a y/o neutraliza sustancialmente los anticoagulantes, tales como inhibidores de fXa. Los derivados útiles como antídotos están modificados para reducir o eliminar actividades procoagulantes y anticoagulantes intrínsecas, mientras conservan la capacidad de unirse a los inhibidores. Estructuralmente, los derivados están modificados para
- 35 proporcionar ninguna actividad procoagulante o actividad procoagulante reducida. "Actividad procoagulante" se denomina, en el presente documento, la capacidad de un agente de causar coagulación sanguínea o formación de coágulos. La actividad procoagulante reducida significa que la actividad procoagulante ha sido reducida en al menos aproximadamente el 50%, o más de aproximadamente el 90%, o más de aproximadamente el 95% en comparación con fXa de tipo silvestre. En una realización relacionada, la secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de
- 40 identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 tiene actividad procoagulante reducida en comparación con factor Xa de tipo silvestre. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 no se ensambla en un complejo protrombinasa.

- En una realización, la serina proteasa puede añadirse (cargarse) en la columna en condiciones que permiten la
- 45 adsorción de la serina proteasa sobre la columna, y la columna puede lavarse con un tampón de lavado que permite la adsorción continuada de la serina proteasa a la columna y las proteínas o moléculas contaminantes en el flujo pasante. En una realización, el tampón de lavado puede comprender una sal y estar a un pH neutro. La expresión "pH neutro" pretende significar un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. En ciertas realizaciones, el tampón de lavado comprende NaCl de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mM a un pH neutro. En otras
- 50 realizaciones, el pH es aproximadamente 6, o aproximadamente 7 o aproximadamente 8.

- Los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender además otras etapas de purificación y cromatográficas tales como, por ejemplo, filtración, cromatografía de intercambio iónico, resinas de modo mixto, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel de poli(acrilamida), cromatografía de afinidad, o enfoque isoelectrico.
- 55 En una realización, el procedimiento comprende además aplicar la solución que contiene el polipéptido a una columna de intercambio iónico.

Las resinas de intercambio catiónico adecuadas incluyen una amplia variedad de materiales conocidos en la técnica, que incluyen aquellos capaces de unirse a polipéptidos en un amplio intervalo de pH. Por ejemplo, se prefieren

particularmente matrices carboximetiladas, sulfonadas, basadas en agarosa, o poliméricas de poliestireno/divinilbenceno de intercambio catiónico. Otros materiales de matriz útiles incluyen, aunque sin limitarse a, matrices de celulosa, tales como matrices fibrosas, microgranulares, y en forma de perlas; matrices de dextrano, poliácido, polivinilo, poliestireno, sílice, y poliéter; y materiales compuestos. Otros materiales adecuados para uso en cromatografía de intercambio catiónico están dentro del conocimiento de los expertos en la materia.

La cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo usando medios apropiados para ella, tal como se conoce en la técnica. Los medios adecuados incluyen, por ejemplo, resinas poliméricas de poliestireno/divinilbenceno y resinas a base de agarosa, así como perlas de agarosa, perlas de dextrano, perlas de poliestireno, medios que comprenden un soporte particulado insoluble, derivatizado con grupos amino terciario o cuaternario, y soportes derivatizados con grupos trimetilaminoetilo. Ejemplos de medios de este tipo adecuados incluyen DE92 (dietilaminoetilcelulosa, Whatman); DEAE CELLULOSE (Sigma), BAKERBOND ABX 40 mu (J. T. Baker, Inc.); resinas de DEAE tales como FRACTOGEL EMD DEAE-650 (EM Separations), FRACTOGEL EMD TMAE-650 (S) TM (EM Science, Gibbstown, NJ), TSK gel DEAE-SPW (Tosohas), DEAE-SEPHAROSE CL-6BT y SEPHAROSE quelante (Amersham Pharmacia Biotech AB), DEAE MERE SEP. IOOOTM (Millipore), y DEAE SPHERODEX (Sepracor); RESOURCE QTM y Q SEPHAROSE (QSFF) (Amersham Pharmacia Biotech AB); MACRO-PEP QTM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); Q-HYPERD (BioSeptra, Inc., Marlborough, Mass); y similares. Otros materiales adecuados para cromatografía de intercambio aniónico, así como la selección y el uso de estos materiales para la presente solicitud, son convencionales en la técnica.

La etapa de cromatografía de intercambio iónico, filtración, nanofiltración, o purificación adicional puede ser anterior a o después de la cromatografía de afinidad por STI. Etapas adicionales también pueden incluir etapas de inactivación viral mediante, por ejemplo, tratamiento con disolvente y detergente del extracto de proteína o a través de nanofiltración.

Generalmente, "purificación" se refiere a incrementar la concentración y/o la pureza de una proteína o péptido en una muestra. En algunas realizaciones, el proceso de purificación somete a la muestra a fraccionamiento para eliminar diversos otros componentes, durante el cual la proteína o péptido conserva sustancialmente su actividad biológica. Una proteína o péptido sustancialmente purificado en una composición forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o más de las proteínas en los componentes secos de una solución de muestra.

Diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o péptido serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial, y calcular, de este modo, el grado de pureza, evaluado en el presente documento mediante "número de veces de purificación". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerá, por supuesto, de la técnica de ensayo particular seleccionada para realizar el seguimiento de la purificación y de si la proteína o péptido expresado muestra o no una actividad detectable.

Diversas técnicas adecuadas para uso en la purificación de proteínas serán bien conocidas por los expertos en la materia. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG (polietilenglicol), anticuerpos y similares o mediante desnaturalización por calor, seguida por centrifugado; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, de fase inversa, en hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoelectrónico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas.

Un aspecto adicional descrito en el presente documento se refiere a una serina proteasa purificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2 o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2 donde el polipéptido se produce mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido que tiene identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2 tiene sustancialmente la misma actividad que la SEQ ID NO: 1 o 2.

La presente solicitud también describe un kit que comprende una resina de afinidad de inhibidor de tripsina de soja; un tampón de elución que comprende arginina; e instrucciones de uso. En una realización, el kit comprende además

un tampón de lavado. En una realización relacionada, el tampón de lavado comprende NaCl aproximadamente 250 mM a un pH neutro.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

5

La divulgación se entiende adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la divulgación.

A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas están en grados Celsius. Además, en estos ejemplos y en cualquier otra parte, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

- h = hora
- cm = centímetro
- l = litro
- 15 M = molar
- mg = miligramo
- mg/kg = miligramo/kilogramo
- mg/ml = miligramo/mililitro
- min = minuto
- 20 ml = mililitro
- μl o ul = microlitro
- μM = micromolar
- fX = factor X
- fXa = factor Xa
- 25 HC = cadena pesada
- LC = cadena ligera
- MTX = metotrexato
- PBS = solución salina tamponada con fosfato
- STI = inhibidor de tripsina de soja

30

EJEMPLO 1

Cribado de resinas de afinidad disponibles en el mercado

- 35 Se cribaron resinas de afinidad disponibles en el mercado por su eficacia en la purificación de r-Antídoto. Diversas resinas de afinidad se empaquetaron en una columna (tal como una columna Tricorn, GE) con 1 ml de resina. Después de la desinfección de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, la columna se equilibró con Tris 20 mM/NaCl 150 mM a pH 7,4, seguido por ensayar su capacidad para unirse a r-Antídoto en el mismo tampón. Se cargó r-Antídoto a una concentración de 0,145 mg/ml en PBS (solución salina tamponada con fosfato) en la columna
- 40 a un caudal de 1 ml/min mediante inyección (1 ml). Sorprendentemente, no se observó unión de r-Antídoto a las columnas de afinidad de Benzamidina-Agarosa (nº de catálogo A7155, Sigma) (figura 3), L-Lisina-Agarosa (Nº de catálogo L5631) (figura 4) y Aprotinina-Agarosa (nº de catálogo A2268) (figura 5). En contraste, se descubrió que el r-Antídoto se une a la resina de afinidad de STI (figura 6).

45 EJEMPLO 2

Purificación de r-Antídoto mediante la resina de afinidad de STI con tampón de elución que contiene Benzamidina

- 50 El medio acondicionado de cultivo celular recogido que contenía el r-Antídoto se hizo pasar en primer lugar a través de una pre-columna de Q-Sepharose de flujo rápido (nº de catálogo 17-0510-01, GE Healthcare) tamponada en una solución de Tris 20 mM y NaCl 250 mM a pH 7,4. El flujo pasante desde la pre-columna que contenía el r-Antídoto se aplicó a continuación a una columna de STI-Agarosa (Sigma, T-0635) en condiciones que permitieron la adsorción del r-Antídoto a la columna. La columna se lavó con una solución que contenía Tris 20 mM y NaCl 250 mM a pH 7,4
- 55 (1X Q-BF). El r-Antídoto se eluyó a continuación con un tampón de elución que contenía Tris 20 mM, NaCl 150 mM, a pH 7,4 con benzamida 0,5 M o 1,0 M. La capacidad de STI-Agarosa basada en el folleto comercial es 1-3 mg/ml de tripsina.

El medio de cultivo celular usado en los diversos ensayos descritos en este ejemplo se produjo a partir de un clon

CHO-DUXB 11 (designado como 1C2) que se seleccionó en metotrexato (MTX) 50 nM. Antes de la carga en la columna de STI-agarosa, el medio de cultivo celular se dializó en el mismo tampón usado para la pre-columna de Q-Sepharose (Tris 20 mM y NaCl 250 mM a pH 7,4).

- 5 Cuando se cargaron 50 ml de medio de cultivo celular dializado directamente en la columna de afinidad de STI-Agarosa, el r-Antídoto funcional fue capturado por la resina de STI (figura 7). No se detectó r-Antídoto funcional en las fracciones de flujo pasante (NOTA: se necesita la descripción del ensayo de actividad cromógena de fXa. Puede coparse de la aplicación de r-Antídoto). La función del r-Antídoto se detectó usando un ensayo de actividad cromógena de fXa en presencia de un inhibidor de fXa. El r-Antídoto es capaz de unirse al inhibidor y, de este modo, reduce su actividad inhibitoria. La actividad de FXa (%) se calculó mediante:

$$\text{Actividad de FXa (\%)} = \text{actividad de fXa (con inhibidor)} / \text{actividad de fXa (sin inhibidor)} \times 100.$$

- 15 A diferencia de la resina de STI-Agarosa que se acaba de describir anteriormente (figura 7), cuando el mismo medio de cultivo celular dializado (50 ml) se cargó en una precolumna HQ-Sepharose (125 ml), la proteína diana está, sin embargo, en las fracciones de flujo pasante (figura 8). La pre-columna de HQ-Sepharose se lavó con 1X Q-BF hasta la fracción 25. El tampón de lavado se cambió a Tris 20 mM, NaCl 1 M a pH 7,4 en la fracción 25. Las fracciones de flujo pasante de HQ-Sepharose se combinaron basándose en el ensayo de actividad funcional de fXa (total 475 ml). Este resultado demuestra que podría usarse HQ-Sepharose en un modo de flujo pasante para la purificación de r-Antídoto, como una pre-columna usada antes de la columna de afinidad de STI-Agarosa o como una etapa subsiguiente después de la columna de afinidad de STI-Agarosa.

- 25 Las fracciones combinadas a partir de las fracciones de flujo pasante de HQ-Sepharose se cargaron en una resina de afinidad de STI-Agarosa (10 ml), y la resina se lavó a continuación con 1X Q-BF. La figura 9 demuestra que el r-Antídoto se adsorbió sobre la columna de afinidad de STI. Las proteínas unidas se eluyeron a continuación con un tampón de elución de Tris 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,4, y benzamidina 1 M. la figura 10A muestra el perfil de elución con el tampón de elución de benzamidina. Dado que la benzamidina en el tampón de elución interfiere en el ensayo de actividad funcional de fXa, el r-Antídoto en las fracciones de elución se cuantificó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con un fX/fXa humano de reconocimiento de anticuerpos emparejados disponible en el mercado (FX-EIA, Enzyme Research Laboratories Inc.). Las fracciones que contienen r-Antídoto se combinaron y la benzamidina se eliminó mediante diálisis con PBS.

- 35 El r-Antídoto purificado por afinidad se analizó mediante Western blot (figura 10B) usando anticuerpos que reconocen específicamente la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de fX/fXa humano (Enzyme Research Laboratories Inc.). La figura 10B muestra que el r-Antídoto se eluye con benzamidina.

- 40 Con el fin de determinar con más detalle la concentración de benzamidina que se requiere para eluir el r-Antídoto de la resina de STI-Agarosa, la elución del r-Antídoto a partir de la columna de STI-agarosa también se realizó usando un gradiente de benzamidina (figura 11).

- 45 El medio de cultivo celular se cargó en primer lugar en una columna de STI-Agarosa de 1 ml y se lavó tal como se ha descrito anteriormente (figura 7), el r-Antídoto unido se eluyó mediante un gradiente que comprende 10 volúmenes de columna (CV) de tampón A y tampón B. El tampón A (Tris 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,4), y el tampón B consistían en Tris 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,4 y benzamidina 1 M. La concentración de benzamidina (gradiente) se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm en cada fracción y el r-Antídoto se analizó mediante ELISA, el pico de elución de la proteína diana estaba a benzamidina aproximadamente 250 mM y la elución de proteína diana finalizó a benzamidina aproximadamente 500 mM (figura 11). Por lo tanto, la concentración de benzamidina óptima en el tampón de elución es de aproximadamente 500 mM.

- 50 El procedimiento de purificación puede incrementarse a escala para adquirir mayores cantidades de producto. Por ejemplo, con el fin de purificar el r-Antídoto a partir de 10 l de fluido de cultivo celular recogido, pueden usarse en primer lugar 500 ml de una columna de HQ-Sepharose, seguidos por 200 ml de STI-Agarosa. La elución en el procedimiento de incremento a escala se realizó con benzamidina 1 M en 1X tampón Q (figura 12).

- 55 Por lo tanto, los descubrimientos anteriores pueden integrarse en un esquema de purificación (figura 13) para purificación de r-Antídoto a partir de diversos lotes de fluido de cultivo celular (10 - 25 l). Para determinar la calidad de r-Antídoto purificado en el esquema de incremento a escala, 3,5 µg de proteína purificada se cargaron en pocillos diferentes de un gel de SDS-PAGE (10% de gel bis-tris/tampón MES, reducido) (figura 14). Los carriles se cargaron con 1) marcador de peso molecular; 2) proteína FXa; 3) Lote 1 - 16 l; 4) Lote 2 - 8 l; 5) Lote 4 - primeros 25 l; 6) Lote

5 - segundos 25 l; 7) Lote 6 - terceros 25 l y 8) Lote 7 - cuartos 25 l, con cada número de lote seguido por el volumen de partida de fluido de cultivo celular.

EJEMPLO 3

5

Purificación de r-Antídoto mediante la resina de STI-afinidad con tampón de elución que contiene Arginina

Para ensayar si podría usarse r-Antídoto con arginina, 5-10 mg de extracto de proteína de r-Antídoto del cultivo celular se cargaron en una columna de 1 ml de STI-afinidad a través de una bomba a 0,2 ml/min (aproximadamente 10 61 cm/h). La proteína se eluyó con arginina 0,5 M en acetato de Na 25 mM a pH 5,0 y el pH se ajustó inmediatamente a aproximadamente pH 7,4 mediante la adición de un volumen apropiado de Tris 1 M (pH 8,0). La columna se separó a continuación con arginina 1,0 M, acetato de Na 25 mM a pH 5, seguido por benzamidina 0,5 M, Tris 20 mM, y NaCl 150 mM a pH 7,4. La figura 15 muestra un perfil de elución representativo con el tampón de elución de arginina. El tampón de elución que contenía arginina 0,5 M es capaz de eluir el r-Antídoto de la resina de 15 STI-afinidad. No se descubrió ninguna proteína de r-Antídoto adicional al separar las fracciones con arginina 1 M o benzamidina 0,5 M.

Además, la elución con tampón arginina produjo un perfil de producto similar que la elución con benzamidina (figura 16). Por lo tanto, se ha descubierto que una resina basada en STI-afinidad con un tampón de elución que contiene 20 arginina podría usarse para purificar eficazmente el r-Antídoto a partir del medio acondicionado de cultivo celular.

Con el fin de determinar las capacidades de unión de diversas resinas de STI-afinidad modificadas específicamente, la capacidad de unión de las resinas (resinas A-K) se ensayaron en condiciones similares (columna de 1 ml). La proteína unida se eluyó con el tampón de elución que contenía arginina 0,5 M. El r-Antídoto en las fracciones de 25 elución se cuantificó tanto mediante ELISA como mediante absorbancia a 280 nm. Las capacidades de unión basadas en absorbancia a 280 nm se tabulan a continuación.

Nº de Ejemplo	Nº de resina	Densidad de ligando (mg de STI/ml de resina)	Capacidad de unión (mg de r-Antídoto/ml de resina, proteína medida mediante A280)
1	A	3	2,4
2	B	5	5,1
3	C	7	6,2
4	D	3	2,5
5	E	4	2,9
6	F	6	5,3
7			5,8
8	G	5	4,7
9	H	5	3,1

10	I	5	4,9
11	J	4	3,1
12	K	4	4,1

30 LISTA DE SECUENCIAS
<110> PORTOLA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> PROCEDIMIENTO PARA PURIFICACIÓN DE DERIVADOS DE FACTOR XA RECOMBINANTE

35 <130> N404431EP

<140> 13732317.6

<141> 12-06-2013

40 <150> 61/659,821

<151> 14-06-2012

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 365

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 1

```

Ala Asn Ser Phe Leu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys
1           5           10           15

Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly
20           25           30

Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu
35           40           45

Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln
50           55           60

Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly
65           70           75           80

Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr
85           90           95

Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Arg Lys Arg Ile
100          105          110

Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu
115          120          125

Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser
130          135          140

```

15

ES 2 612 458 T3

Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	145	150	155	160
Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	165	170	175	
Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	180	185	190	
Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	195	200	205	
Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	210	215	220	
Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	225	230	235	240
Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	245	250	255	
Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	260	265	270	
Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	275	280	285	
Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	290	295	300	
Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	305	310	315	320
Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	325	330	335	
Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	340	345	350	
Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys				355	360	365	

<210> 2
 <211> 359
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 2

ES 2 612 458 T3

Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Phe	Trp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	1	5	10	15
Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys	Asp	Gly	Leu	Gly	20	25	30	
Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	35	40	45	
Leu	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	50	55	60	
Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Gly	65	70	75	80
Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	85	90	95	
Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	100	105	110	
Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	115	120	125	
Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	145	150	155	160
Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	165	170	175	
Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	180	185	190	
Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	195	200	205	
Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	210	215	220	
Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	225	230	235	240

ES 2 612 458 T3

Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val
245 250 255

Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn
260 265 270

Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly
275 280 285

Asp Ala Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val
290 295 300

Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr
305 310 315 320

Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser
325 330 335

Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val
340 345 350

Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
355

<210> 3

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 3

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de una serina proteasa, que comprende:
 - 5 cargar la serina proteasa en un cromatógrafo de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI), y
eluir la serina proteasa con un tampón de elución que comprende arginina que interrumpe la interacción entre el STI y la serina proteasa.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de elución comprende además una sal, un detergente y/o un agente caotrópico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la serina proteasa es un polipéptido que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2, o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 80% de
identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o 2, que tiene una delección de al menos parte del dominio Gla y una
mutación en el sitio activo.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, donde la serina proteasa comprende la secuencia de
20 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que tiene al menos aproximadamente el 95% de identidad de
secuencia con la SEQ ID NO: 2, que tiene una delección de al menos parte del dominio Gla y una mutación en el sitio
activo.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, donde la serina proteasa comprende la secuencia de
25 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el pH del tampón de elución
es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,5.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde el pH del tampón de elución es aproximadamente 5,0 o
30 es aproximadamente 7,4.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el tampón de elución comprende de arginina
aproximadamente 250 mM a arginina aproximadamente 1000 mM.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 8, donde el tampón de elución comprende arginina
aproximadamente 500 mM.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde el pH del tampón de elución es de aproximadamente
40 5,0.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además someter a
la serina proteasa eluida a purificación con una columna de intercambio iónico.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además, antes de
45 eluir la serina proteasa, lavar el cromatógrafo con un tampón de lavado que comprende una sal y está a un pH
neutro.
13. Un kit que comprende:
un cromatógrafo de afinidad basado en inhibidor de tripsina de soja (STI), y
50 un tampón de elución que comprende arginina que interrumpe la interacción entre el STI y una serina proteasa.
14. El kit de la reivindicación 13, donde
 - (i) el pH del tampón de elución es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 10,5; o
 - 55 (ii) el tampón de elución comprende de arginina aproximadamente 250 mM a arginina aproximadamente 1000 mM.
15. El kit de la reivindicación 13 o 14, que comprende además un tampón de lavado que comprende NaCl
aproximadamente 250 mM a un pH neutro.

60

SEQ ID NO: 1:

Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Phe	Trp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	1	5	10	15
Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys	Asp	Gly	Leu	Gly	20	25	30	
Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	35	40	45	
Leu	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	50	55	60	
Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Gly	65	70	75	80
Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	85	90	95	
Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Ile	100	105	110	
Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	115	120	125	
Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	130	135	140	
Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	145	150	155	160
Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	165	170	175	
Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	180	185	190	
Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	195	200	205	
Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	210	215	220	
Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	225	230	235	240
Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	245	250	255	
Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	260	265	270	
Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	275	280	285	
Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	290	295	300	
Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	305	310	315	320
Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	325	330	335	
Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	340	345	350	
Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys				355	360	365	

FIG. 1

SEQ ID NO: 2:

Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Phe	Trp	Asn	Lys	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	1	5	10	15
Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys	Asp	Gly	Leu	Gly	20	25	30	
Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	35	40	45	
Leu	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Gln	50	55	60	
Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Arg	Gly	65	70	75	
Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	85	90	95	
Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	100	105	110	
Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	115	120	125	
Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	130	135	140	
Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	145	150	155	
Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	165	170	175	
Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	180	185	190	
Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	195	200	205	
Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	210	215	220	
Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	225	230	235	
Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	245	250	255	
Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	260	265	270	
Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	275	280	285	
Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	290	295	300	
Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	305	310	315	
Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	325	330	335	
Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	340	345	350	
Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys										355			

FIG. 2

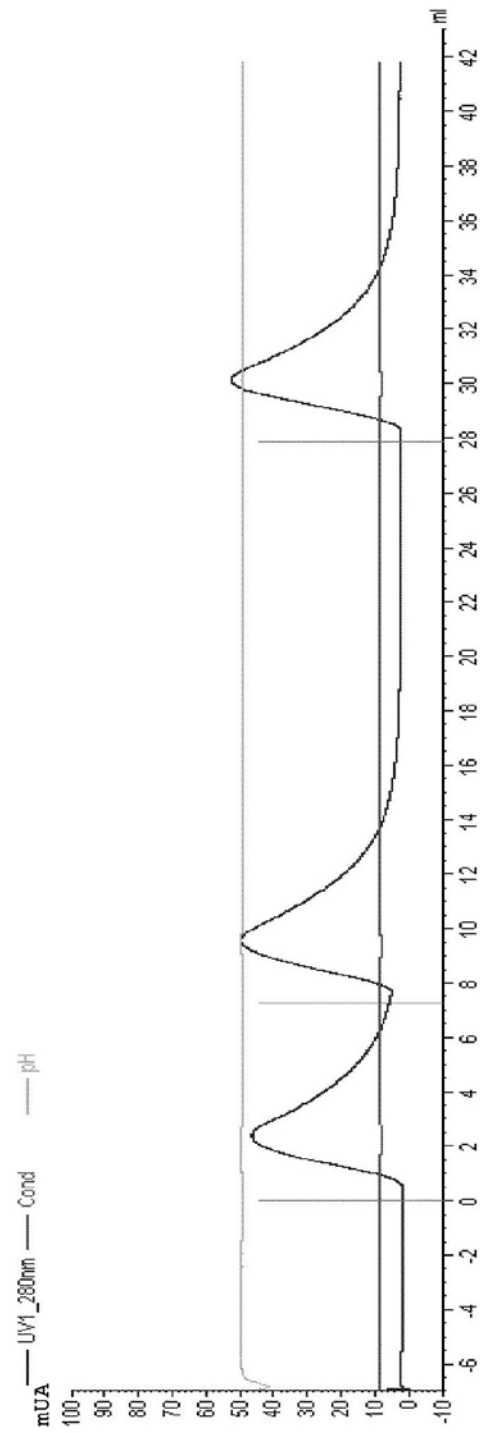


FIG. 3

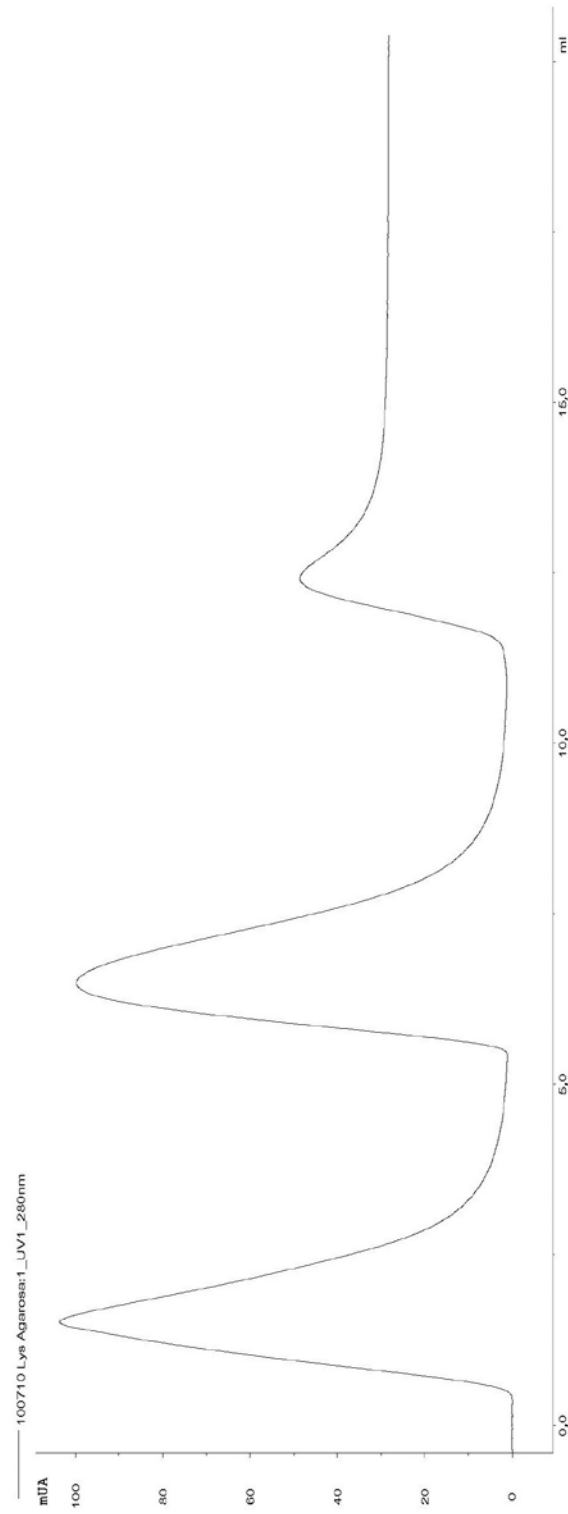


FIG. 4

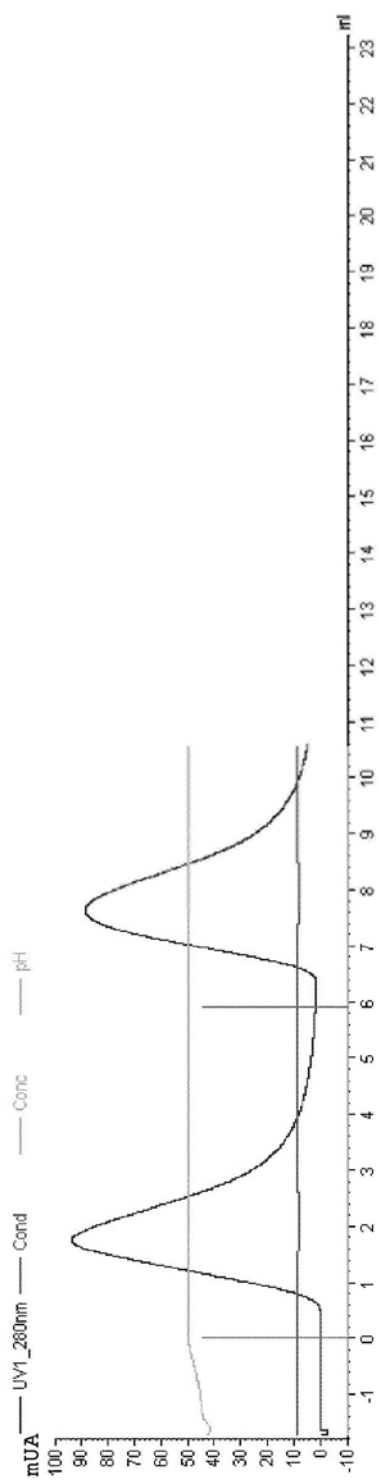


FIG. 5

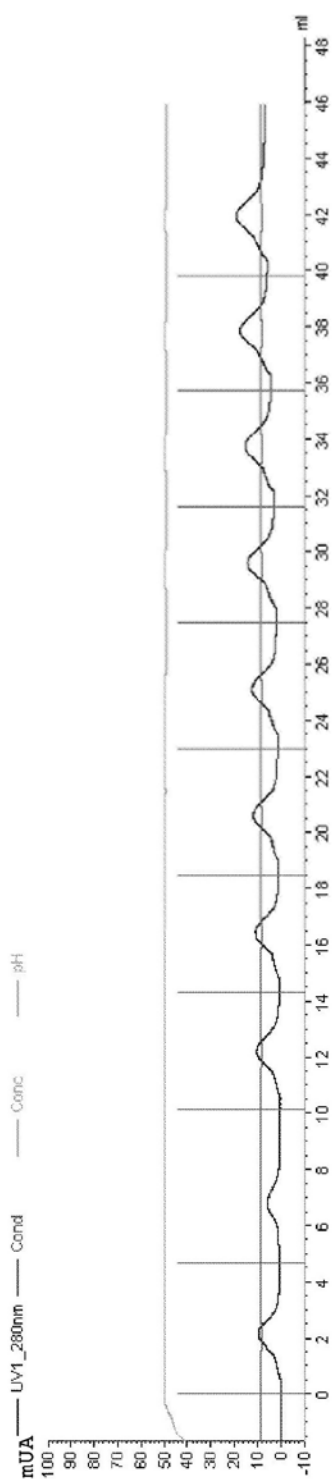


FIG. 6

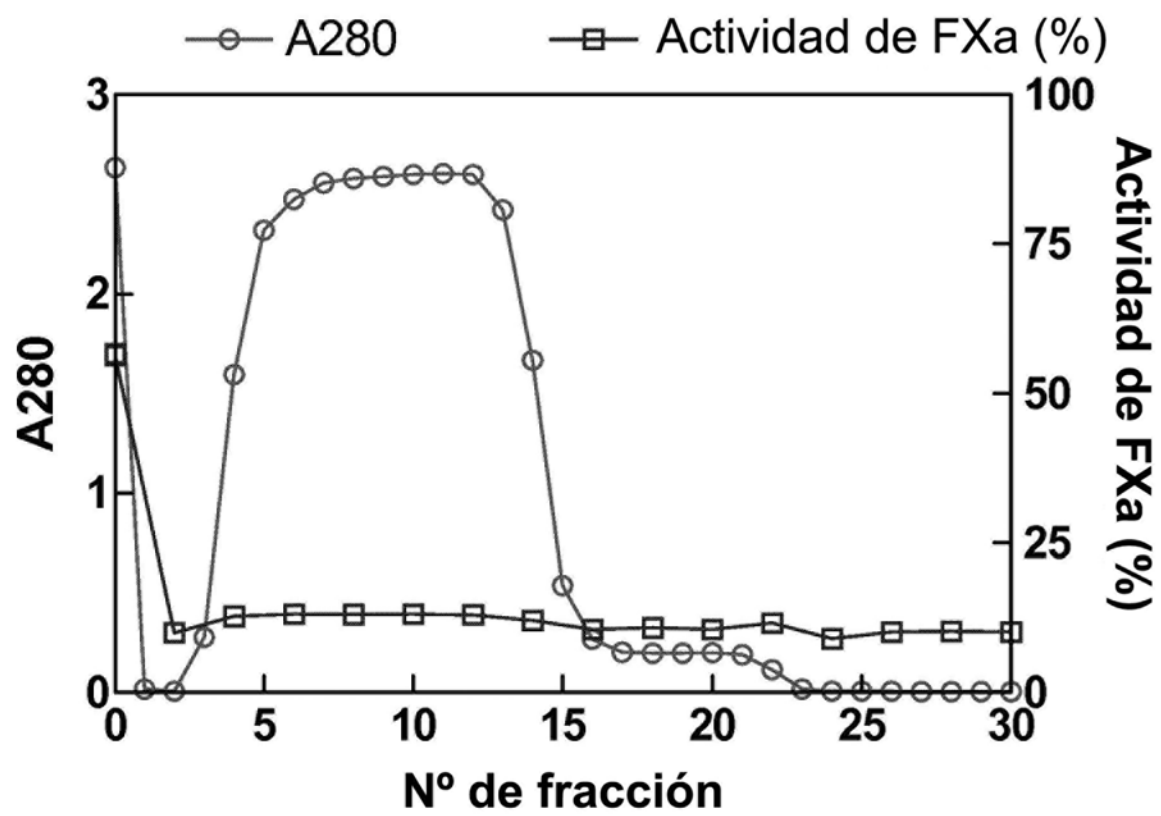


FIG. 7

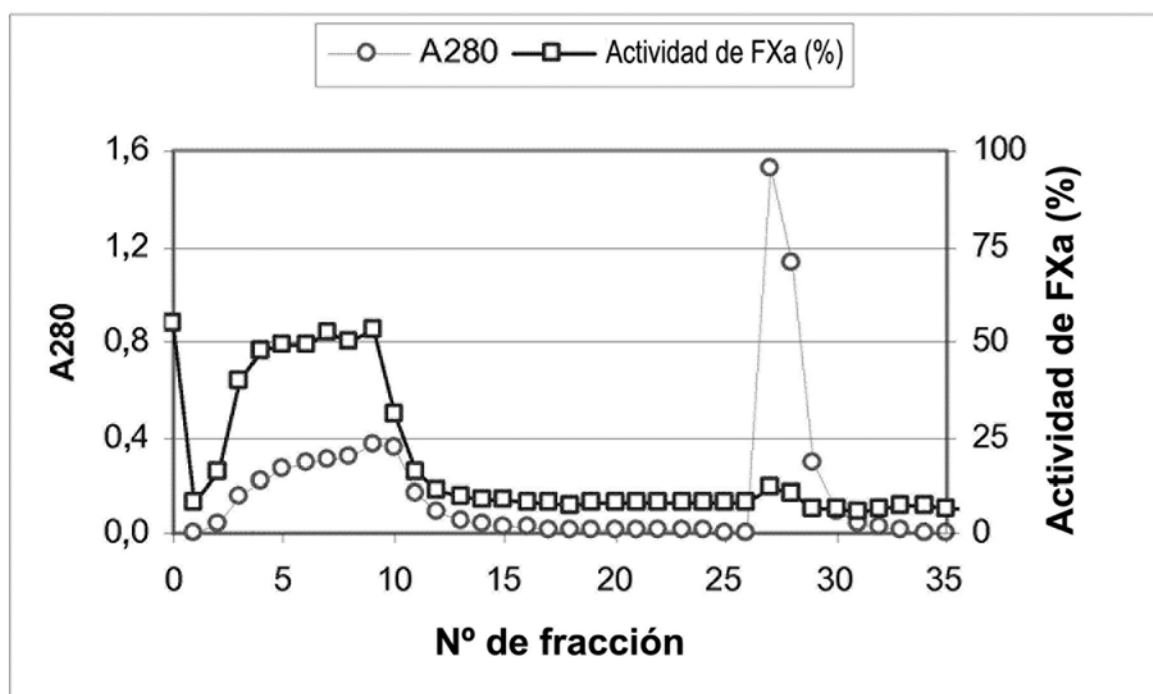


FIG. 8

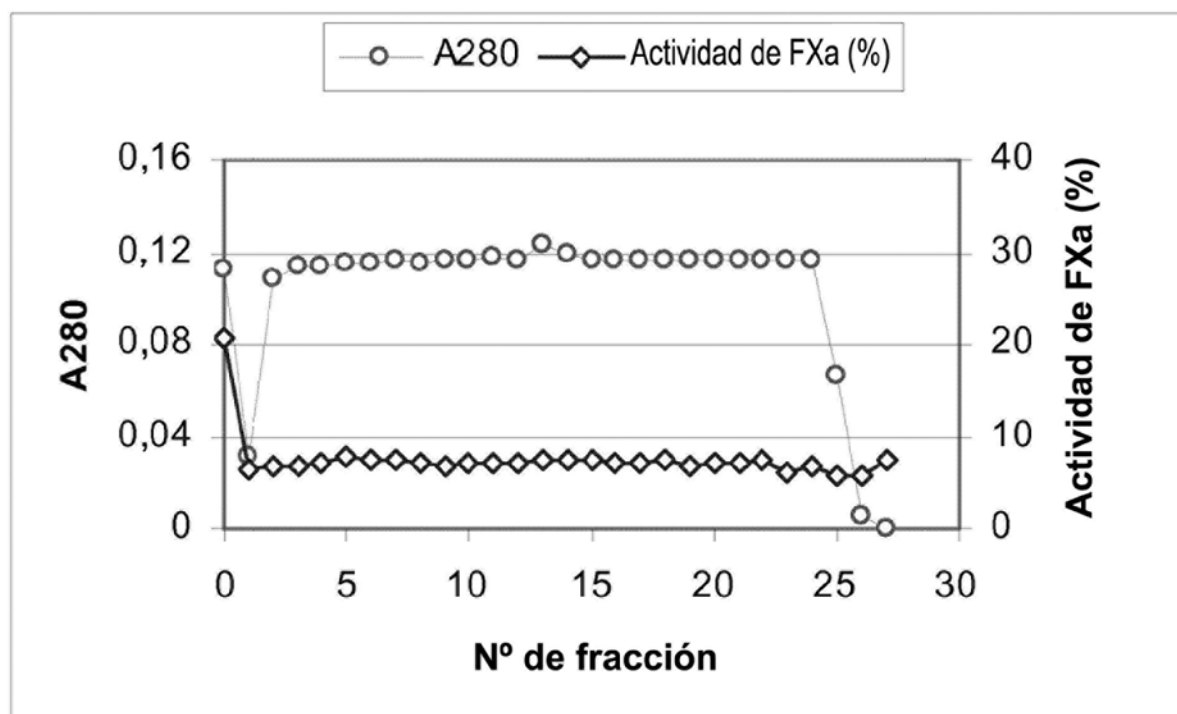


FIG. 9

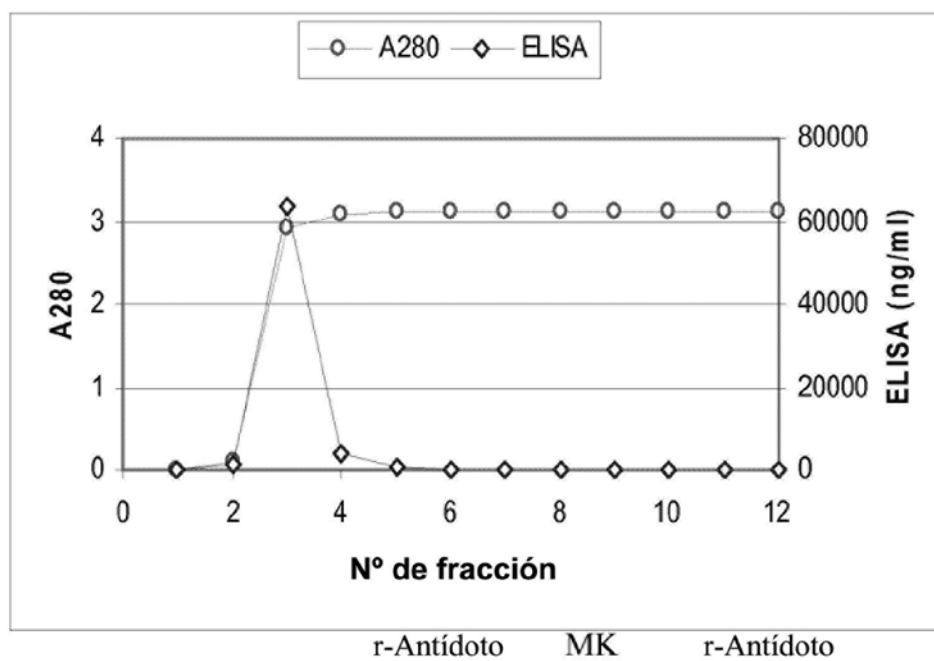


FIG. 10A

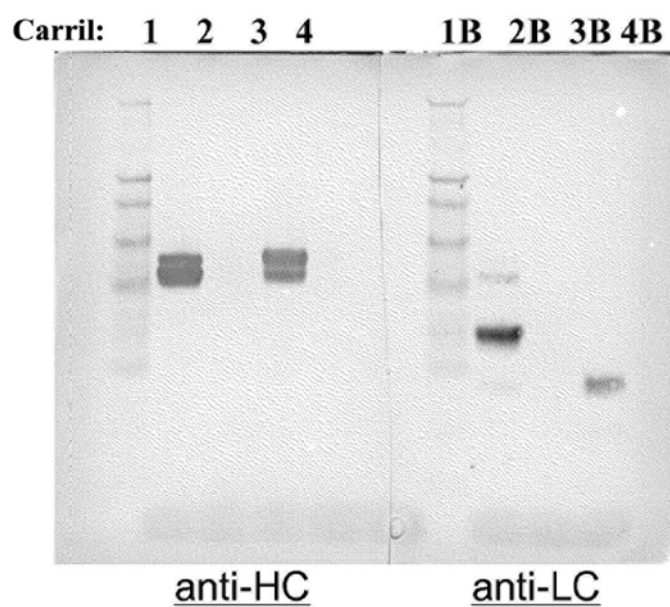


FIG. 10B

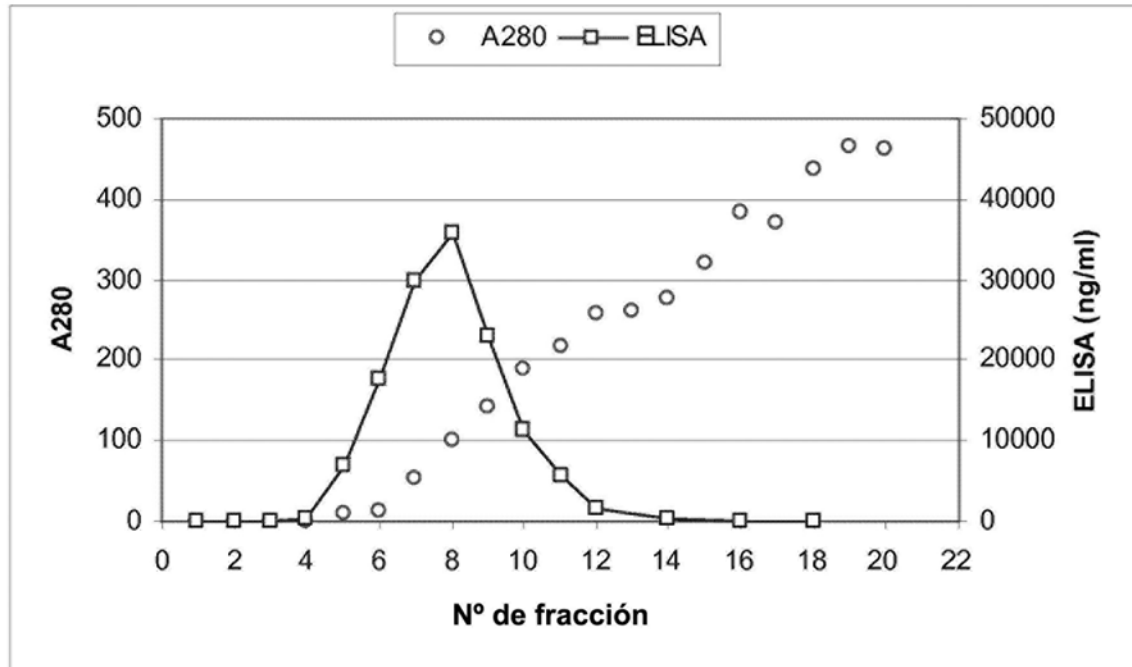


FIG. 11

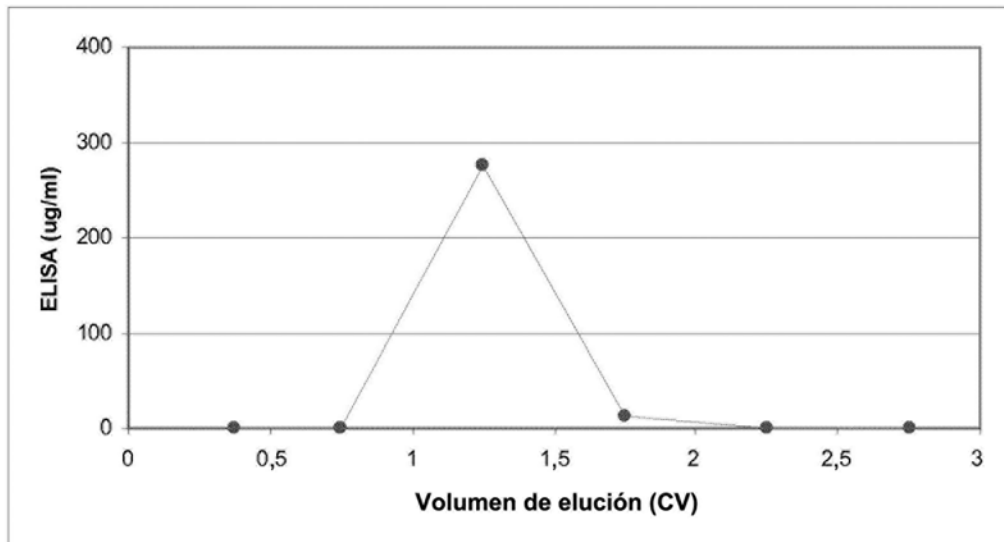


FIG. 12

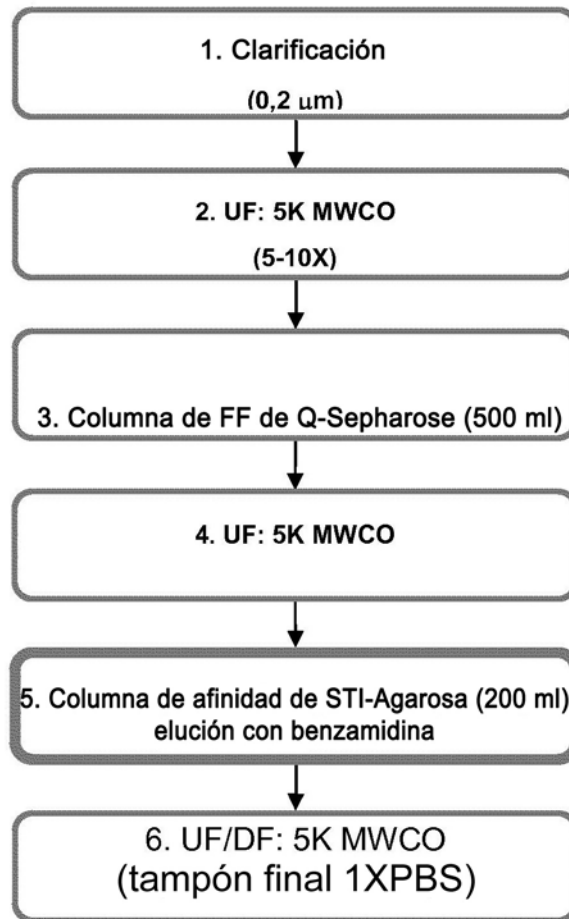


FIG. 13

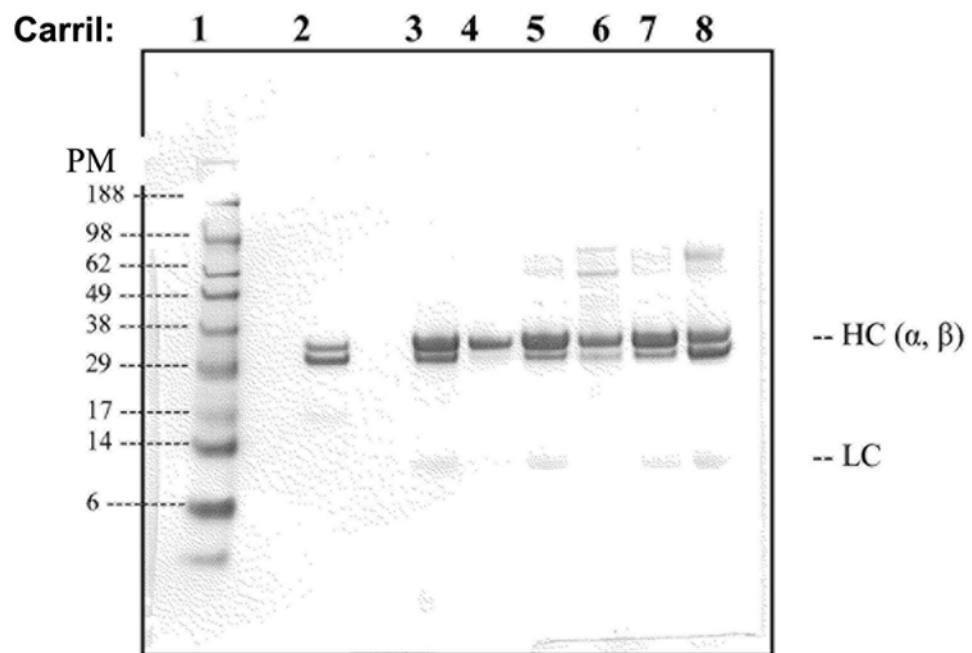


FIG. 14

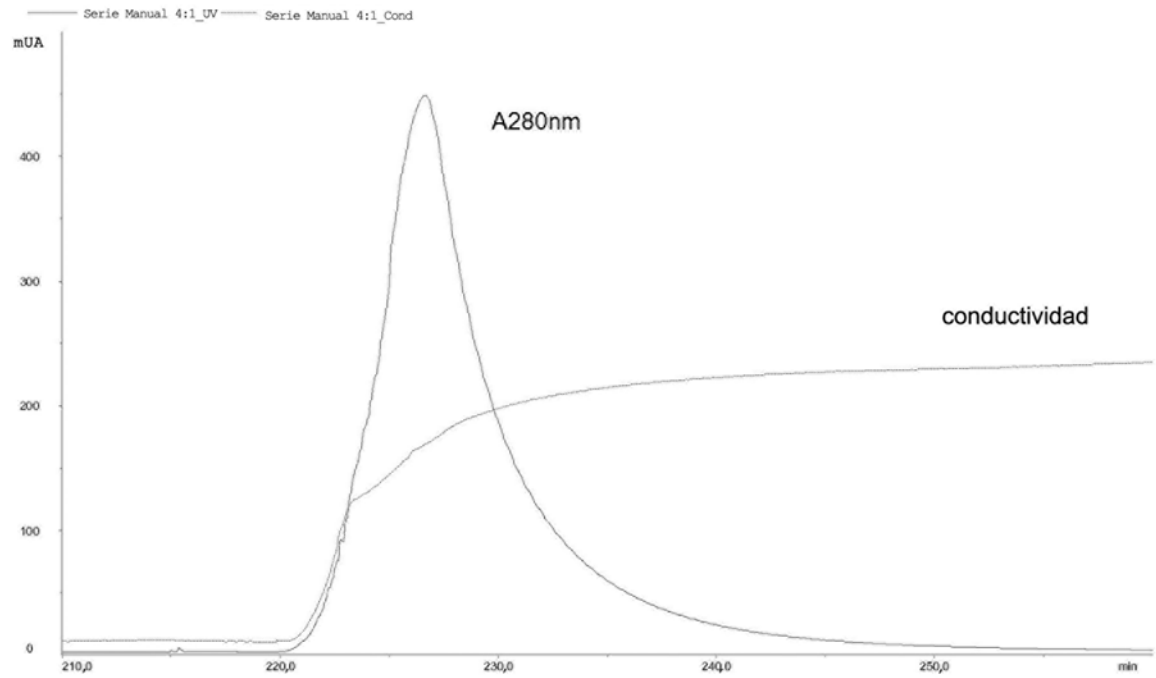


FIG. 15

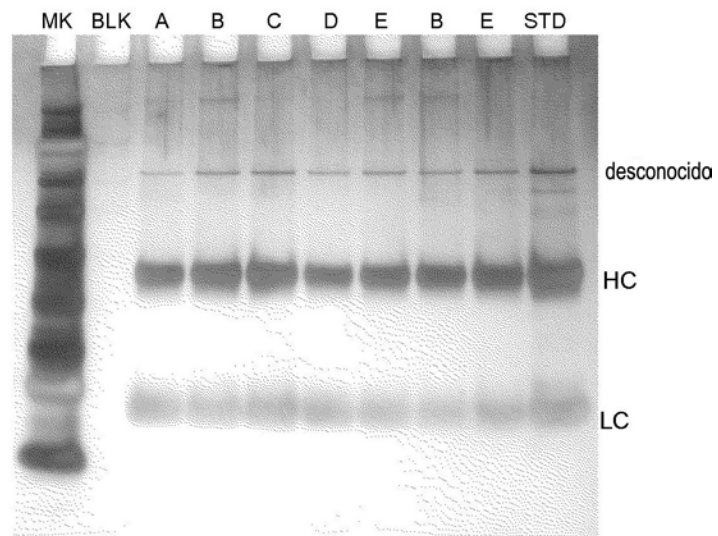


FIG. 16