(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 651 028**

(51) Int. Cl.:

***C12P 21/00*** (2006.01)
***C07K 14/755*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2007 PCT/KR2007/000947**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2008 WO08102923**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007 E 07709081 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2126106**

(54) Título: **Proceso para producir y purificar el factor VIII y sus derivados**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**23.01.2018**

(73) Titular/es:

**SK CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)**
**600 JEONGJA 1(IL)-DONG JANGAN-GU,**
**SUWON-SI**
**GYEONGGI-DO 440-300, KR**

(72) Inventor/es:

**SONG, IN-YOUNG;**
**KIM, HUN-TAEK;**
**KIM, JONG-WAN;**
**KIM, YONG-KOOK;**
**RYU, JONG-IL y**
**KIM, DAE-KEE**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 651 028 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

Proceso para producir y purificar el factor VIII y sus derivados

**Técnica anterior**

El factor VIII es una glicoproteína del plasma implicada en la coagulación sanguínea. Una deficiencia o anomalía en su función da lugar a una grave enfermedad hereditaria denominada hemofilia A (Eaton, D. *et al.*, 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Toole J. J. *et al.*, 1984, *Nature* 312: 342-347; Vehar, G. A. *et al.*, 1984, *Nature* 312: 337-342). Hasta la fecha, el único tratamiento para la hemofilia A ha sido la administración intravenosa de factor VIII preparado a partir de sangre humana o de una fuente recombinante. Por motivos de seguridad, se ha preferido el factor VIII recombinante al factor VIII derivado del plasma. Sin embargo, dado que el nivel de expresión de factor VIII es 2-3 órdenes de magnitud inferior al de otras moléculas en el mismo sistema de expresión (Lynch C. M., 1993, *Human Gene Therapy 4*: 259-272), la producción de factor VIII recombinante no ha satisfecho su demanda.

Varios intentos han logrado una expresión mejorada de factor VIII eliminando el dominio B, del que se tiene constancia de que no desempeña ninguna función en la actividad de cofactor del factor VIII (Eaton *et al.*, 1986. *Biochemistry* 25:8343-8347; Burke, R. L. *et al.*, 1986 J. *Biol. Chem.*, 261: 12574-12578; Toole, J. J. *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5939-5942; Fay *et al.*, 1986, *Biochem. Biophys. Acta*, 871:268-278). La patente de EE. UU. n.º 5 661 008 y el documento WO-A-91/09122 describieron versiones del factor VIII con el dominio B eliminado, que son similares a la forma más corta del factor VIII del plasma. La patente de EE. UU. n.º 5 112 950 y la patente de EE. UU n.º 7 041 635 describieron las formas monocatenarias de moléculas de factor VIII con el dominio B eliminado.

Como opción para la expresión en células de mamíferos, se ha utilizado el sistema de expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) para producir numerosas proteínas terapéuticas, incluido el factor VIII (Chu, L *et al.*, 2001, *Curr. Opin. Biotehnol.*, 12: 180-187). Las características de la línea de células CHO están elucidadas. Puede crecer de forma dependiente de anclaje o en suspensión, adaptarse a un medio que contiene suero o medio exento de suero y, especialmente, soportar modificaciones postraduccionales de proteínas prácticamente idénticas a los patrones de glicosilación humanos (Brooks S.A., 2004, *Mol. Biotechnol.*, 28: 241-255; Jenkins, N., *et al.*, 1996, *Nat. Biotechnol.*, 14: 975-981; Chen. Z., *et al.*, 2000, *Biotechnol. Lett.*, 22, 837-941; Mols, J., *et al.*, 2005, 41: 83-91). Las líneas de células CHO que producen proteínas terapéuticas se han cultivado normalmente en el medio exento de proteínas derivadas de animales con el fin de abordar las cuestiones de seguridad sobre la transmisión de virus o priones derivados de animales y a efectos de una purificación más sencilla. (Chu, L., *et al.*, 2001, *Curr. Opin. Biotehnol.*, 12: 180-187). Sin embargo, la eliminación del suero de los medios de cultivo también desprovee de los inhibidores de proteasas contenidos de forma natural en un suplemento de suero y dificulta mantener la viabilidad de las células durante los procesos de producción (Mols, J., *et al.*, 2005, 41: 83-91; Sandberg, H., *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.*, 95: 961-971).

Al parecer, la viabilidad reducida y las condiciones de estrés aumentan la producción de proteasas secretadas o liberadas a partir de células muertas que pueden atacar a las proteínas terapéuticas y causar heterogeneidad. La heterogeneidad causada por las escisiones internas de la proteína terapéutica podría ser el principal problema debido a que las proteínas escindidas pueden ser inactivas y dificultar el mantenimiento de la uniformidad “de lote a lote” durante los procesos de producción y purificación. Por lo tanto, es importante mantener un nivel de proteasas relativamente bajo o evitar la actividad de proteasa durante la producción.

Se han descrito algunas iniciativas con éxito para evitar esta proteólisis causada por las proteasas liberadas a partir de la línea de células CHO durante el cultivo, si bien aún no se han descubierto ningún o ningunos inhibidores universales que se pudieran aplicar a todas las proteínas terapéuticas producidas en la línea de células CHO. Satoh M *et al.* describieron la presencia de cistein- y serinproteasas liberadas a partir de la célula CHO. Chotteau *et al.* (Chotteau, V., *et al.*, 2001, en *Animal cell technology: from target to market, Kluwer Academic publishers*, págs. 287-292) descubrieron que una proteasa metalodependiente extracellular no identificada del medio de cultivo de células CHO era la responsable de la proteólisis del factor VIII truncado. En el documento WO-A-90/02175 se describe que algunas serin- o cisteinproteasas del cultivo de células CHO pueden ser bloqueadas por los péptidos inhibidores, lo que aumenta la productividad del factor VIII. El documento EP A 0 306 968 describe que la adición de aprotinina al medio de cultivo aumentó tres veces la expresión del factor VIII en el medio de células CHO.

En la patente de EE. UU. n.º 5 851 800, los inventores reivindicaron que los inhibidores de metaloproteasas y quimotripsinas podían reducir el efecto perjudicial sobre la producción de factor VIII en cultivo celular. Sanberg H. *et al.* caracterizaron dos tipos de actividades proteolíticas liberadas por las células CHO en un cultivo celular. Una procedía de metaloproteinasas y la otra de una serinproteasa. Se descubrió que únicamente las metaloproteinasas tenían un efecto acusadamente negativo en la actividad del factor VIII. Sin embargo, aunque un inhibidor de metaloproteasas tal como el EDTA y la 1,10- *o*-fenantrolina podían bloquear la escisión del factor VIII, según ha sido descrito por Sandberg H. *et al.*, estos inhibidores no se pueden añadir directamente al medio de cultivo de células CHO debido a su efecto tóxico en las células, a juzgar por nuestros experimentos.

Se han aplicado todos los inhibidores de proteasas mencionados anteriormente y un cóctel de proteasas que se puede adquirir de proveedores comerciales, que contiene inhibidores para serina, cisteína, aspártico y aminopeptidasas tales como aprotinina, bestatina, leupeptina, E-64 y pepstatina A al cultivo de nuestro derivado de factor VIII monocatenario (descrito en la patente de EE. UU. n.º 7 041 635), pero hemos descubierto que ninguno de ellos era eficaz para proteger a nuestro derivado de factor VIII de la escisión por una o varias proteasas liberadas a partir de un cultivo de células CHO durante el cultivo.

La patente de EE. UU. n.º 6 300 100 describe que un polisacárido sulfatado tal como la heparina protegía a un inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI, por sus siglas en inglés) intacto de la escisión por proteasas presentes en el medio de cultivo. Además, la patente de EE. UU. n.º 5 112 950 describe que el dextrano sulfatado sustituye el efecto estabilizante del factor de Von Willebrand sobre el factor VIII en medios exentos de suero. Sin embargo, según nuestro conocimiento, no se ha descrito el efecto inhibidor del sulfato de dextrano frente a proteasas en relación con las moléculas de factor VIII. El documento WO 99/46299 A1 describe métodos para la purificación de polipéptidos del factor VIII mediante cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de intercambio iónico, donde el eluato de la columna de inmunoafinidad se diluye con una disolución que comprende una concentración superior de sales, o una concentración inferior de un agente apolar, a la de la disolución de elución, antes de hacer pasar la disolución diluida a través de la columna de intercambio iónico. El documento KR 2006 0038210 A describe un anticuerpo anti-factor VIII monoclonal determinado para la purificación del factor VIII de coagulación sanguínea humano. El documento US 5 707 832 describe un proceso para la preparación de Factor VIII mediante el cultivo, en un medio de cultivo, de células que producen dicho factor VIII y la separación del Factor VIII, donde el medio de cultivo contiene al menos un derivado de un polímero policatiónico y/o polianiónico. El documento EP 0 127 603 A2 describe un proceso para la purificación de un preparado que contiene el factor VIII, que comprende la precipitación de las proteínas no deseadas utilizando un polisacárido sulfatado a un pH de 6 a 7.

La presente invención tiene como objetivo demostrar el efecto protector del sulfato de dextrano sobre la escisión del Factor VIII o sus derivados por proteasas producidas durante el cultivo de células CHO. La presente invención se define en las reivindicaciones.

**Efectos favorables**

En un aspecto de esta divulgación, se proporciona un proceso para la producción del Factor VIII o sus derivados en una línea de células huésped de mamífero adaptada a un medio exento de suero que se suplementa con sulfato de dextrano. La adición de sulfato de dextrano al medio de cultivo redujo o bloqueó de forma eficaz las actividades que escindían el factor VIII de (a) cierta o ciertas proteasas procedentes del medio de cultivo de células CHO y aumentó simultáneamente la homogeneidad de las moléculas de factor VIII producidas. En otro aspecto de esta divulgación, se proporciona un método eficaz para purificar moléculas de factor VIII a partir de medios que contienen sulfato de dextrano utilizando pasos de purificación basados en un anticuerpo monoclonal.

Esta divulgación se refiere a un inhibidor eficaz que puede proteger a nuestros derivados de factor VIII monocatenario descritos en la patente de EE. UU. n.º 7 041 635 de la escisión por una o varias proteasas liberadas durante un cultivo en células huésped de mamífero y aumentar la homogeneidad del derivado de factor VIII producido. Esta invención también se refiere a un método para purificar el factor VIII sin que se vea afectado por la adición del inhibidor de proteasas, según se define en las reivindicaciones.

La célula huésped de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En la anterior patente de EE. UU. n.º 6 300 100 había una descripción sobre los efectos protectores de los polisacáridos sulfatados en una proteína objetivo frente a ciertas proteasas, donde una proteína objetivo era el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Por lo tanto, evaluamos si esos polisacáridos sulfatados podían proteger nuestra molécula objetivo, el factor VIII. Esta invención mostró que solamente el sulfato de dextrano posee un efecto protector muy intenso sobre la escisión del factor VIII cuando se añade al medio de cultivo durante el proceso de cultivo.

El sulfato de dextrano se puede obtener por fermentación bacteriana o síntesis química. Los pesos moleculares del sulfato de dextrano pueden variar de 20 a 5000 kDa en peso molecular, y preferentemente es de 50 a 2000 kDa.

El contenido de azufre del sulfato de dextrano también puede variar en función de su material de origen. Independientemente del contenido de azufre del sulfato de dextrano, este solamente se puede emplear para esta invención si el sulfato de dextrano puede proteger al factor VIII de la escisión por una o varias proteasas liberadas a partir de un proceso de cultivo celular. El contenido de azufre del sulfato de dextrano se encuentra preferentemente en el intervalo de un 5 a un 20% en peso del sacárido sulfatado, más preferentemente más de un 17% en peso.

Dependiendo del nivel de expresión del factor VIII y su línea de células huésped, puede ajustarse la cantidad de sulfato de dextrano añadida a un medio de crecimiento y no limitarse a aquellas mostradas en las realizaciones preferidas de esta invención.

En una realización preferida de esta invención, la molécula de factor VIII es uno de los derivados de factor VIII, denominado dBN(64-53) (en adelante denominado I2GdBN), que se describe en la patente de EE. UU. n.º 7 041 635. Este derivado del factor VIII posee una eliminación interna de parte del dominio B y la parte N-terminal de A3 y se diseñó para que tuviese una secuencia de reconocimiento de N-glicosilación nueva en su sitio de fusión. Según el método descrito en el ejemplo 6 de la patente de EE. UU. n.º 7 041 635, se preparó una línea de células CHO que expresaba el I2GdBN de forma estable y se adaptó a un medio exento de suero que se puede adquirir de proveedores comerciales. En adelante en la presente, este clon se designa como “clon #39” y todas las células mencionadas en los ejemplos se refieren a esta línea de células CHO (#39).

El uso de la presente invención puede comprender un proceso para purificar el factor VIII expresado en una línea de células huésped de mamífero a partir de medios de cultivo suplementados con sulfato de dextrano utilizando una cromatografía de afinidad. La cromatografía de afinidad incluye una columna de afinidad que contiene moléculas de afinidad acopladas a un soporte sólido tal como agarosa o sefarosa. Las moléculas de afinidad pueden ser anticuerpos anti-factor VIII que pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser péptidos con una elevada afinidad por el factor VIII.

**Descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra los efectos comparativos de diferentes polisacáridos sulfatados en la protección de la escisión del factor VIII intacto.

La Figura 2 muestra los efectos del peso molecular y la concentración del sulfato de dextrano en la fragmentación de un factor VIII con el dominio B eliminado, I2GdBN.

La Figura 3 muestra los efectos del sulfato, dextrano y sulfato de dextrano en la fragmentación del I2GdBN.

La Figura 4 muestra el efecto del sulfato de dextrano en la fragmentación del I2GdBN en un cultivo por perfusión de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5 muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie R250 de las fracciones de elución de una cromatografía de inmunoafinidad de acuerdo con una realización de la presente invención.

**Mejor modo**

Esta invención se ilustra adicionalmente haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, pero se puede aplicar a otras moléculas de factor VIII y otras líneas celulares, como sobreentenderá el experto en la técnica. Por lo tanto, no se debería interpretar que los siguientes ejemplos limiten el alcance de esta invención.

La heparina, heparinas de bajo peso molecular (~3 kDa y 4~6 kDa), sulfato de dermatano, dextrano (500 kDa), sulfato sódico, sulfato de dextrano (500 kDa, 10 kDa, 8 kDa) se adquirieron de Sigma. Los dextranos se obtuvieron a partir de *Leuconostoc mesenteroides*, cepa B 512. Se produjeron diferentes pesos moleculares de sulfato de dextrano mediante hidrólisis limitada y fraccionamiento. Los grupos sulfato se incorporaron mediante esterificación con ácido sulfúrico en condiciones suaves. Este sulfato de dextrano contenía aproximadamente un 17% de azufre. (http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/product_information_sheet/d6001pis.pdf).

Deposición en las placas de la línea de células CHO #39

El clon #39 descrito anteriormente, que alberga un fragmento de ADN que codifica el I2GdBN, se cultivó en un medio exento de suero (medio ProCHO5 adquirido de Cambrex). A los dos pases de subcultivo después de descongelar, se sembraron 4 x $10^5$ células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos.

Ensayo de inmunoelectrotransferencia

El medio de cultivo que contenía el factor VIII expresado se sometió a un gel SDS-PAGE al 7.5% y se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana transferida se marcó con un anticuerpo específico para el dominio A2 denominado #26-1 que fue generado por los inventores de esta invención. Se utilizó una IgG de ratón secundaria acoplada con peroxidasa de rábano picante para visualizar el complejo factor VII-anticuerpo anti-factor VIII en la membrana.

**Ejemplo 1**

***Comparación del efecto protector de varios polisacáridos sulfatados en la fragmentación del I2GdBN***

El sulfato de dextrano de alto peso molecular (aproximadamente 500 kDa), la heparina, dos tipos de heparina de bajo peso molecular (~3 kDa y 4~6 kDa) y el sulfato de dermatano se adquirieron de Sigma Co., Ltd. y se resuspendieron en agua y se esterilizaron por filtración. Las células se depositaron en placas según se ha mencionado anteriormente. Veinticuatro horas después de la siembra, se reemplazó el medio con uno fresco y se

añadieron cinco tipos de polisacáridos sulfatados a cada pocillo con una concentración final de 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L o 200 mg/L, respectivamente. Después de 48 h de incubación, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y analizaron mediante un ensayo de inmunoelectrotransferencia. Según se muestra en la figura 1, hubo un escaso efecto de protección por parte de tres tipos de heparina que protegían al TFPI de forma eficaz descritos en otras patentes. Sin embargo, el sulfato de dextrano puede proporcionar una protección de la escisión eficaz y de manera dependiente de la concentración. Más del 92% de Factor VIII en el sobrenadante de cultivo (hilera 2 en la figura 1-(D)) permaneció intacto en comparación con los factores VIII en un medio de cultivo sin aditivos (41%; hilera 1 en la figura 1-(D)) y los factores VIII en un medio de cultivo con heparinas o sulfato de dermatano (52%~67%; hilera 3~6 en la figura 1-(D)). Esto muestra que no todos los polisacáridos sulfatados pueden proteger a todas las proteínas objetivo y que el efecto protector de un determinado polisacárido sulfatado es muy específico para una proteína objetivo.

**Ejemplo 2**

***Efecto del peso molecular del sulfato de dextrano en la escisión del I2GdBN***

Si se puede aplicar un sulfato de dextrano con un peso molecular inferior para proteger la escisión, un sulfato de dextrano de peso molecular inferior se podría separar fácilmente del factor VIII basándose más en su diferencia de tamaño. Por tanto, para comprobar si un sulfato de dextrano de peso molecular inferior puede proteger la escisión del I2GdBN expresado durante el cultivo celular, se añadieron sulfatos de dextrano de 8 kDa, 10 kDa y 500 kDa, que tenían el mismo contenido de azufre y procedían de la misma fuente, al medio en concentraciones variables de 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L y 1000 mg/L. A las 72 horas después de la adición de sulfato de dextrano, se recogió el medio de cultivo y se analizó por ensayo de inmunoelectrotransferencia. Según se muestra en la figura 2, aunque se añadió una cantidad creciente de sulfato de dextrano con bajo peso molecular (hilera 1 a hilera 8 en la figura 2) al medio de cultivo celular, no se observó ningún efecto protector eficaz en la escisión del I2GdBN. Se mostró que únicamente el sulfato de dextrano de 500 kDa (hilera 9 a hilera 12) protegía la fragmentación del I2GdBN monocatenario.

**Ejemplo 3**

***Únicamente el dextrano sulfatado puede proteger la escisión***

Para comprobar si un grupo funcional individual del sulfato de dextrano posee el efecto inhibidor de la escisión, se añadieron cantidades equimolares de dextrano (500 kDa), sulfato sódico y sulfato de dextrano (500 kDa) al medio de cultivo. Las células se sembraron según se describe en los experimentos. A las 24 horas después de la siembra, se añadieron diferentes concentraciones que variaban entre 250 mg/L y 1000 mg/L de sulfato de dextrano (500 kDa) y dextrano (500 kDa) o diferentes concentraciones que variaban entre 71 g/L y 384 g/L de sulfato sódico al medio. A las 48 horas después de la adición, se recogió el medio de cada pocillo y se analizó por ensayo de inmunoelectrotransferencia. Según se muestra en la figura 3, únicamente el sulfato de dextrano de 500 kDa (hilera 5 a hilera 7) mostró un efecto protector en la escisión del I2GdBN según se representa en la figura 3. Se mostró que ni el dextrano solo (hilera 2 a hilera 4) ni el sulfato sódico (hilera 8 a hilera 10) inhibían las actividades de proteasa de la o las proteasas liberadas durante el cultivo de CHO. El patrón de fragmentación del medio de cultivo con solamente dextrano o sulfato sódico fue similar al del medio de cultivo sin aditivos (control, hilera 1).

**Ejemplo 4**

***Aplicación de sulfato de dextrano al cultivo en suspensión***

El sulfato de dextrano (500 kDa) se aplicó a un sistema de cultivo por perfusión. Un vial de células se descongeló y expandió en un matraz T75, y se expandió adicionalmente en un matraz T125. Las células en el matraz T125 se transfirieron a frascos de agitación de 250 mL, 1 L y 3 L en serie y se mantuvieron en forma de cultivo en suspensión en una placa de agitación magnética a 37 ºC en una mezcla de un 5% de $CO_2$/aire con una velocidad de rotación de 100 rpm. Las células que crecían exponencialmente en el frasco de agitación de 3 L se recogieron e inocularon en un biorreactor de 7.5 L con un volumen de trabajo de 5 L. Se añadió sulfato de dextrano (500 kDa) con una concentración de 200 mg/L al medio exento de suero en el biorreactor. A partir del cuarto día después de la inoculación, el medio de cultivo se recogió cada dos días durante 20 días. La viabilidad de las células se mantuvo por encima de un 92.7% durante la perfusión del cultivo, y se detectó el fragmento del factor VIII en menos de un 5% a juzgar por el análisis densitométrico de cada banda de la electroinmunotransferencia durante el proceso de fermentación. Las electroinmunotransferencias ilustrativas de los medios de cultivo recogidos en el día 6, día 12 y día 18 se incluyeron en la figura 4.

**Ejemplo 5**

***Purificación del I2GdBN a partir de medios de cultivo por cromatografía de inmunoafinidad***

Debido a la característica altamente negativa del sulfato de dextrano, no se puede aplicar la cromatografía de

intercambio iónico para purificar el factor VIII secretado en medios de cultivo suplementados con sulfato de dextrano. Por lo tanto, los medios de cultivo producidos en el ejemplo 4 se concentraron mediante ultrafiltración de flujo tangencial y se sometieron a una columna de inmunoafinidad preequilibrada con tampón de equilibrio (20 mM de Tris-HCl [pH 7.0], NaCl 400 mM, $CaCl_2$ 5 mM, EDTA 3 mM). La columna de inmunoafinidad se preparó acoplando anti-factor VIII monoclonal que reconoce la región A2 de la cadena pesada del factor VIII a resinas de sefarosa activadas con CNBr. La columna de inmunoafinidad con el factor VIII unido se lavó con 2.5 volúmenes de lecho de tampón de equilibrio y 2.5 volúmenes de lecho de tampón de lavado (20 mM de Tris-HCl [pH 7.0], NaCl 400 mM, $CaCl_2$ 5 mM, EDTA 3 mM, etilenglicol al 10%). La elución se llevó a cabo con un gradiente de elución escalonado con tampones de elución que contenían etilenglicol con una concentración que variaba entre un 40-60%. Se tomaron muestras de nueve de las 12 fracciones de elución (los números de fracción de elución 1 a 9 correspondían a las entradas de E1 a E9 en la figura 5) y se sometieron a un 7.5% de SDS-PAGE y se tiñeron con tinte azul brillante de Coomassie R 250. Solamente la purificación en un paso del medio de cultivo proporcionó más de un 95% de factor VIII monocatenario sumamente puro según se ilustra en la figura 5.

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de sulfato de dextrano para reducir o bloquear las actividades que escinden el Factor VIII de cierta o ciertas proteasas procedentes de medios de cultivo de células CHO y para aumentar la homogeneidad de las moléculas de Factor VIII producidas en un proceso para la producción de Factor VIII en células CHO adaptadas a un medio exento de suero que está suplementado con sulfato de dextrano, donde el peso molecular medio de dicho sulfato de dextrano es de 20 a 5000 kDa.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho Factor VIII se denomina dBN(64-53), descrito en la patente de EE. UU. n.º 7 041 635.

3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el peso molecular medio de dicho sulfato de dextrano es de 50 a 2000 kDa.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho uso comprende un proceso para purificar el Factor VIII expresado en células CHO a partir de medios de cultivo suplementados con sulfato de dextrano utilizando una cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos anti-Factor VIII.

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho uso comprende un método para producir Factor VIII recombinante a partir de células CHO transformadas con el vector de ADN de expresión que contiene ADNc que codifica el FVIII en un medio de cultivo y purificar dicho factor VIII utilizando moléculas de afinidad específicas para factor VIII conectadas al soporte sólido, que comprende

   (a) cultivar dichas células CHO en un medio de cultivo que está suplementado con sulfato de dextrano;
   (b) concentrar dicho medio de cultivo que contiene el factor VIII mediante ultrafiltración y
   (c) purificar dicho factor VIII a partir del medio de cultivo concentrado mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos anti-Factor VIII.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la cantidad de dicho sulfato de dextrano en dicho medio de cultivo es de 10 mg/L a 2 g/L.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho medio de cultivo es un medio exento de una proteína animal.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha cromatografía comprende:

   (a) una columna empaquetada con un soporte sólido que incluye agarosa y sefarosa acoplado a un anticuerpo específico anti-factor VIII, y
   (b) un tampón de elución que contiene agentes tamponantes, sales, cloruro cálcico, detergente y etilenglicol para las moléculas de Factor VIII unidas a dicho soporte sólido acoplado a un anticuerpo.

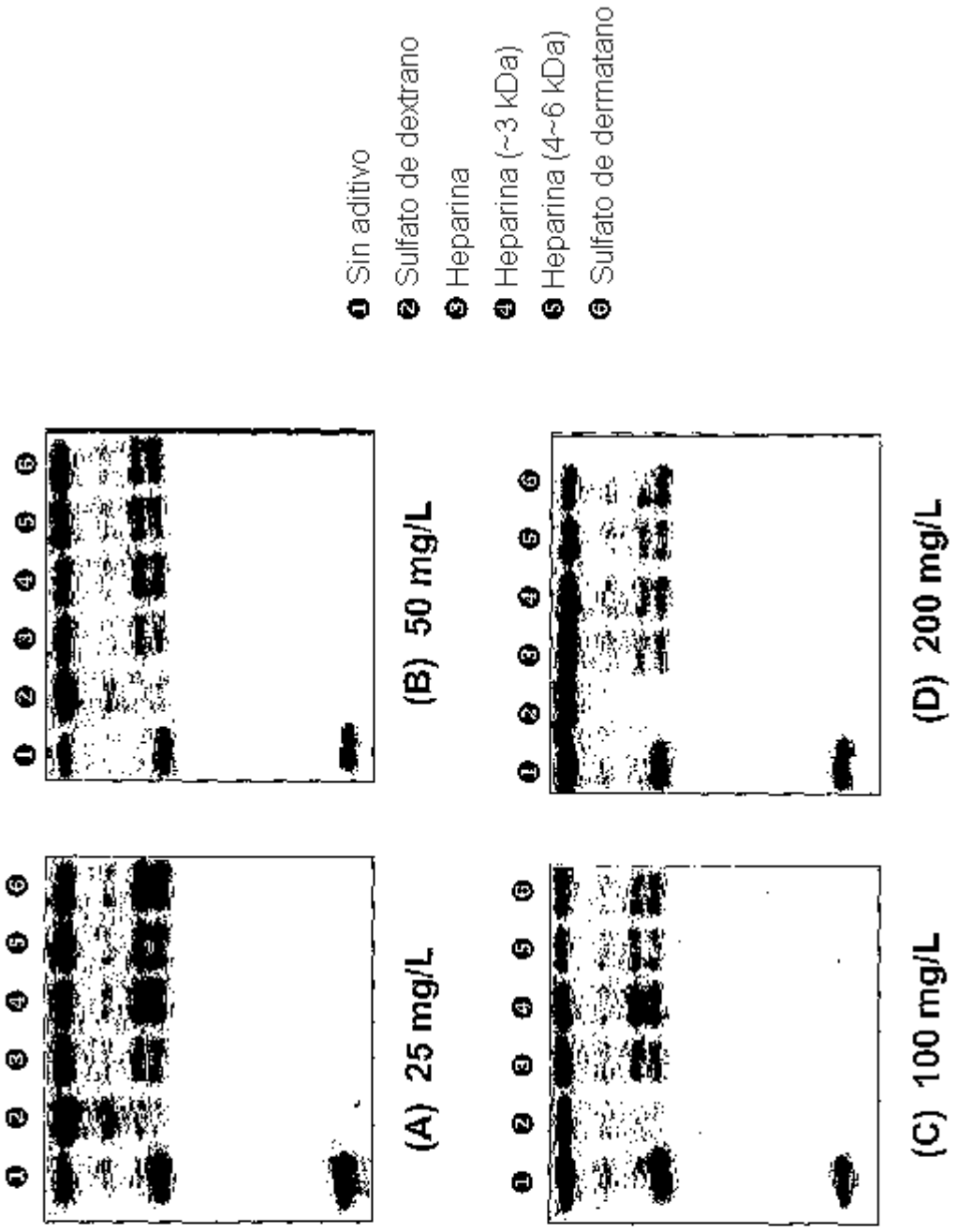

1 Sin aditivo
2 Sulfato de dextrano
3 Heparina
4 Heparina (~3 kDa)
5 Heparina (4~6 kDa)
6 Sulfato de dermatano
1 2 3 4 5 6
(A) 25 mg/L
1 2 3 4 5 6
(B) 50 mg/L
1 2 3 4 5 6
(C) 100 mg/L
1 2 3 4 5 6
(D) 200 mg/L

Figura 1.

Figura 2.

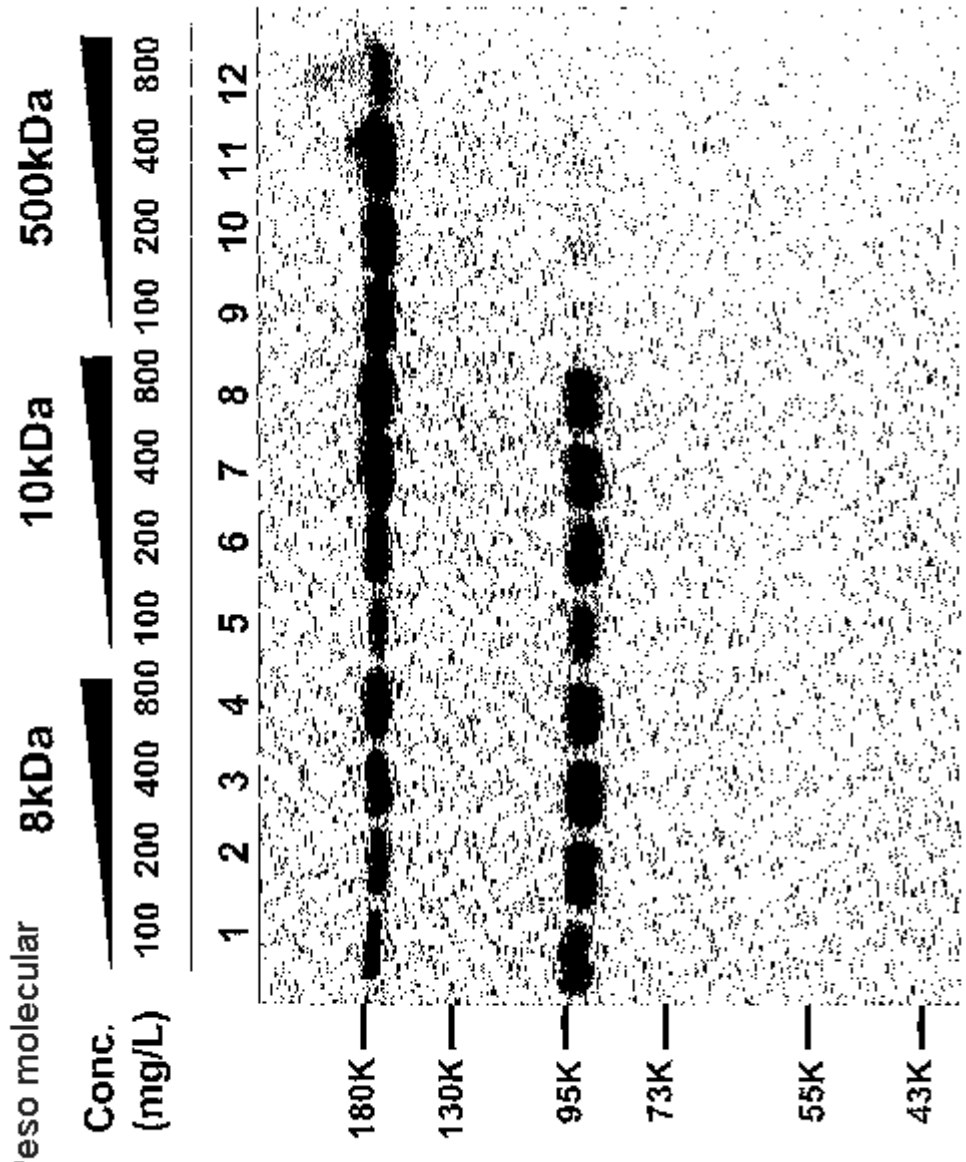

Peso molecular
8kDa
10kDa
500kDa
Conc. (mg/L)
100 200 400 800 100 200 400 800 100 200 400 800
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
180K
130K
95K
73K
55K
43K

Figura 3.

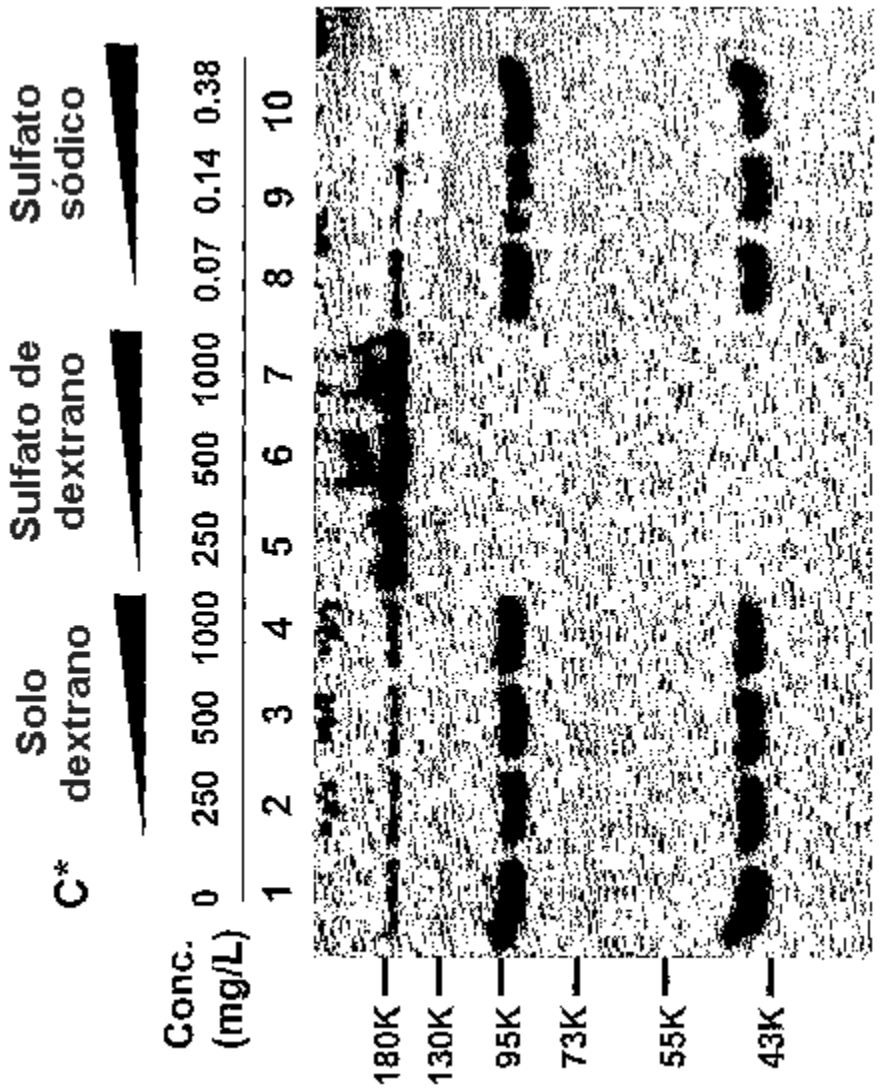
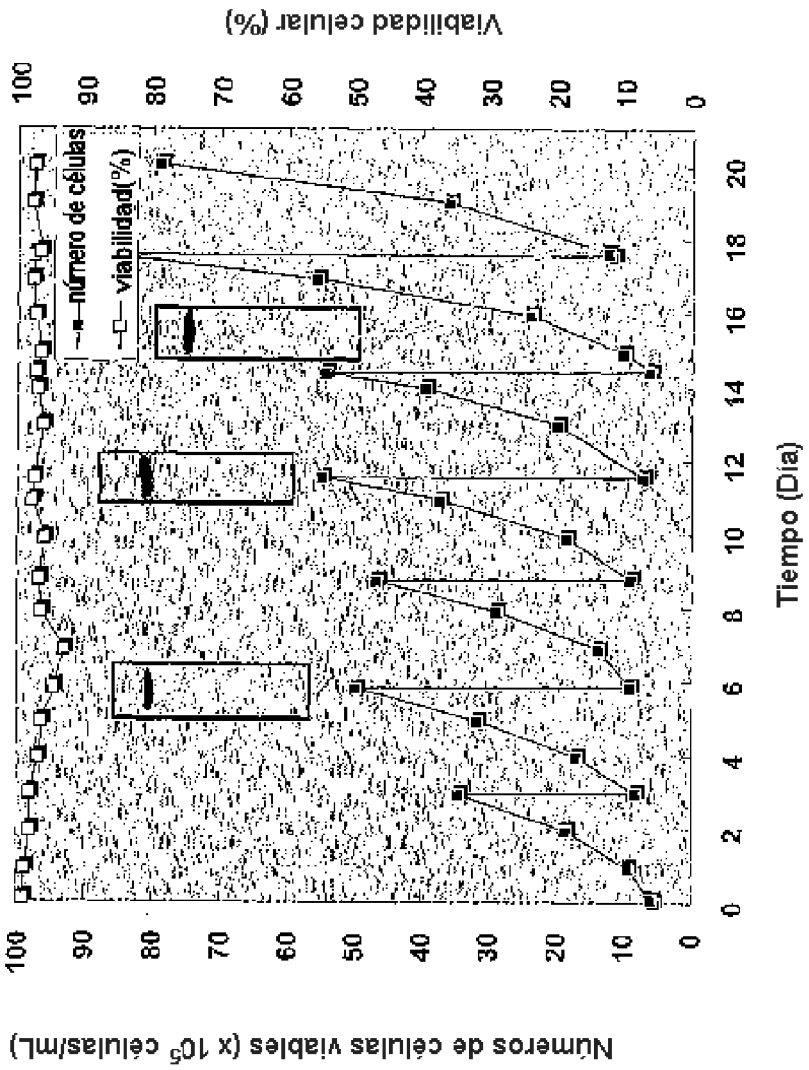

C*
Solo dextrano
Sulfato de dextrano
Sulfato sódico
Conc. (mg/L)
0 250 500 1000 250 500 1000 0.07 0.14 0.38
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
180K
130K
95K
73K
55K
43K

**Figura 4.**


Números de células viables (x 10^5 células/mL)
Viabilidad celular (%)
número de células
viabilidad(%)
Tiempo (Día)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20

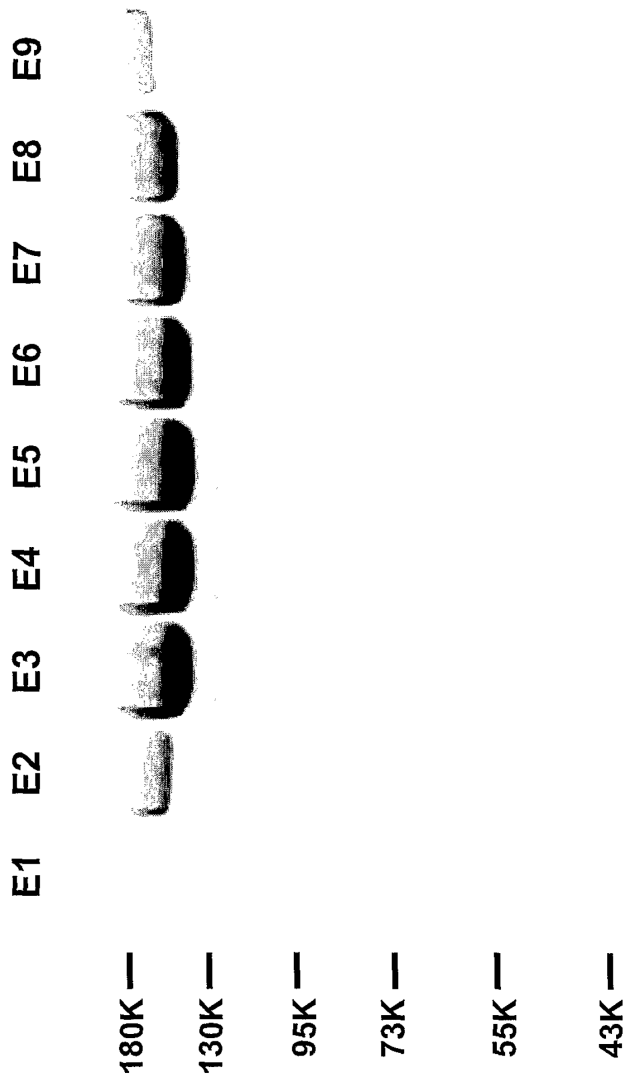



Figura 5.