

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 928**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/EP2014/055120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140289**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14709972 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2970376**

54 Título: **Método de purificación para proteínas dependientes de vitamina K mediante cromatografía de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792772 P

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

24.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MITTERER, ARTUR;
HASSLACHER, MEINHARD;
FIEDLER, CHRISTIAN y
MITTERGRADNEGGER, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 682 928 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

Método de purificación para proteínas dependientes de vitamina K mediante cromatografía de intercambio aniónico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la purificación de proteínas dependientes de vitamina K, en particular FIX (recombinante), con alto rendimiento y alta pureza sobre materiales de resina de intercambio aniónico.

10 **Antecedentes de la invención**

Desde la aparición de la tecnología recombinante, muchas proteínas de mamífero se producen en células huésped, por ejemplo, transfectando células con ADN que codifica para dichas proteínas y haciendo crecer las células recombinantes en condiciones favorables para la expresión de dichas proteínas. Las proteínas secretadas por las células en el medio de cultivo celular, o que residen dentro de las células, pueden separarse del medio de cultivo y otros componentes usando técnicas cromatográficas, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y similares. Para aplicaciones farmacéuticas adicionales, la pureza es de importancia particular. Sin embargo, al mismo tiempo la actividad biológica de la proteína debe conservarse tras la purificación concienzuda de las proteínas de interés. El concepto de elución de proteínas de unión a calcio de resinas de intercambio aniónico mediante cationes divalentes se notificó por primera vez hace casi treinta años. Aunque se aisló satisfactoriamente el factor VII bovino de plasma bovino, la purificación de factor VII humano era todavía problemática, es decir, el material producido era solo parcialmente puro o se obtuvo en cantidades muy pequeñas. Los investigadores en el campo tuvieron éxito en el aislamiento de factor VII humano a partir de plasma humano en cantidades suficientes (con un rendimiento de aproximadamente el 30 %) por medio de adsorción de proteínas a un catión divalente, es decir, citrato de bario, y luego la separación de la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. Además, estaban disponibles métodos para recuperar y purificar proteínas dependientes de vitamina K del medio de un cultivo celular que produce proteínas dependientes de vitamina K con diferentes actividades específicas por medio de resinas de intercambio iónico convencionales, por ejemplo, resinas de intercambio aniónico, y usando un eluyente que contiene cationes divalentes, por ejemplo, ión de calcio (Ca^{2+}), ión de magnesio (Mg^{2+}), ión de bario (Ba^{2+}) e ión de estroncio (Sr^{2+}).

Además, estaban disponibles métodos para la purificación del factor IX (FIX) en disolución, que comprenden las etapas de aplicar la disolución que contiene FIX a una resina de intercambio aniónico, lavar la resina de intercambio aniónico con una disolución que tiene una conductividad que es menor que la requerida para eluir FIX de la resina, y eluir FIX de la resina de intercambio aniónico con un primer eluyente que incluye cationes divalentes para formar un primer eluato. El primer eluato se aplica entonces a una resina de heparina o similar a la heparina para formar un segundo eluato, y el segundo eluato se aplica a hidroxapatita para formar un tercer eluato, utilizando un agente de lavado de alta conductividad en la etapa de lavado.

El factor IX (FIX) es una serina proteasa dependiente de vitamina K del sistema de coagulación, que pertenece a la familia de peptidasas S1. FIX es inactivo a menos que se active por el factor XIa o el factor VIIa. Para su activación, se requieren calcio, y fosfolípidos de membrana. La deficiencia de FIX provoca el trastorno hemorrágico recesivo hereditario hemofilia B, que puede tratarse satisfactoriamente mediante la administración de FIX modificado postraduccionalmente, es decir, FIX fosforilado y sulfatado. FIX puede convertirse además en FIX "activado" (procesado adicionalmente), es decir FIXa. Puesto que FIXa puede afectar negativamente a una composición dada de FIX (por ejemplo aumentando su trombogenicidad tal como se describe en la bibliografía), los productos de FIX deben contener preferentemente un bajo contenido en FIXa. Debe tenerse cuidado para no confundir FIX "activado", es decir, FIXa, que es un FIX procesado adicionalmente que tiene los efectos negativos posibles descritos anteriormente, con FIX activo que es el FIX que tiene una actividad deseada en un sujeto dado y que no se ha procesado adicionalmente aún, por ejemplo, por FXIa o FVIIa. Por tanto, es igualmente importante que un producto de FIX tenga un alto contenido en FIX activo, y un bajo contenido en FIX inactivo, preferiblemente junto con un bajo contenido de FIXa "activado". Un posible FIX inactivo puede ser FIX con un pro-péptido, FIX con una baja gamma-carboxilación, FIX oxidado, FIX desamidado, FIX con una estructura terciaria incorrecta, etc. Además, el factor VII (FVII) es una serina proteasa dependiente de vitamina K que desempeña un papel significativo en la cascada de coagulación, donde inicia el proceso de coagulación con factor tisular (TF). Tras la lesión de un vaso, se expone TF a la sangre y FVII circulante. Una vez unido a TF, se activa FVII a FVIIa por trombina, factor Xa, IXa, XIIa y el complejo de FVIIa-TF cuyos sustratos son FX y FIX.

Por tanto, el problema que subyace a la presente invención es proporcionar un método mejorado para la purificación de proteínas dependientes de vitamina K con alto rendimiento y alta pureza, preferiblemente con un bajo contenido de FIX inactivo. La solución al problema técnico anterior se logra mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

65 **Sumario de la invención**

La presente invención, en una realización preferida (punto 1), se refiere a un método tal como se define en la

reivindicación 1.

En ese sentido, la etapa (a) tal como se describe se lleva a cabo preferiblemente en ausencia o a baja concentración de cationes divalentes libres. Cationes divalentes "libres" en ese contexto significará cationes divalentes no complejados. Es decir si, por ejemplo, estaba presente Ca^{++} aproximadamente 1 mM complejado con EDTA, se consideraría todavía que está en ausencia de cationes divalentes (libres).

En una realización adicional preferida, el método para la purificación comprende además las siguientes etapas:

(c) diluir el conjunto de eluatos obtenido, ((1) para disminuir opcionalmente la conductividad), y aumentar la concentración del calcio,

(d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato tal como se obtiene tras la etapa (c); y

(e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína dependiente de vitamina K.

La etapa opcional c (1) de disminuir la conductividad es necesaria solo si la conductividad no se ha disminuido ya en la última etapa de lavado opcional; preferiblemente, la disminución de la conductividad se lleva a cabo en la etapa de lavado 3, tal como se describe en más detalle a continuación.

Lo siguiente describe las combinaciones para los parámetros que se muestra que son decisivos para la separación de proteína dependiente de vitamina K inactiva. Todos los intervalos de parámetros de la invención descritos en el presente documento se refieren a la etapa de elución (b).

El método según el punto 1, en el que en la etapa (b):

- La conductividad es de entre 18 y 20 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 - 7,4 y Ca^{++} 1 mM

- la conductividad es de entre 18,5 y 21 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca^{++} 1 mM

- la conductividad es de entre 19 y 22,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,6 - 8,0 y Ca^{++} 1 mM

- la conductividad es de entre 20 y 23 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca^{++} 1 mM

- la conductividad es de entre 15 y 17,0 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 - 7,4 y Ca^{++} 2 mM

- la conductividad es de entre 16 y 18 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca^{++} 2 mM

- la conductividad es de entre 19,5 y 22 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca^{++} 2 mM

- la conductividad es de entre 14,0 y 15 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 - 7,4 y 3 mM Ca^{++}

- la conductividad es de entre 15 y 15,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca^{++} 3 mM

- la conductividad es de entre 14 y 16,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,6 - 8,0 y Ca^{++} 3 mM, o

- la conductividad es de entre 15 y 19 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca^{++} 3 mM.

En una realización particularmente preferida de la elución (b), el intervalo para la conductividad y el pH se eligen a partir de las áreas sombreadas en la figura 2A para una concentración de Ca^{++} 1 mM, mientras que se eligen de las áreas sombreadas en la figura 2B para una concentración de Ca^{++} 2 mM, y mientras que se eligen de las áreas sombreadas en la figura 2C para una concentración de Ca^{++} 3 mM, siempre tal como se definió anteriormente. En una realización adicional preferida de la elución (b), la conductividad y concentración de Ca^{++} se eligen

- para un pH de 7,0, basándose en las áreas sombreadas de la figura 3A,

- para un pH de 8,0, basándose en las áreas sombreadas de la figura 3B, y

- para un pH de 9,0, basándose en las áreas sombreadas de la figura 3C.

Todos los parámetros de concentración de calcio, pH y conductividad del eluyente (es decir, el tampón de elución) tal como se describió anteriormente son parámetros importantes. Todos pueden interferir con la elución que tiene lugar sobre la resina de intercambio aniónico e influir en la pureza final de la proteína deseada.

Muy sorprendentemente, los inventores también pudieron mostrar que era necesaria una concentración menor de

Ca⁺⁺ que la enseñada previamente en la técnica anterior para lograr un resultado ventajoso.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que es necesario controlar estos parámetros en intervalos más estrechos que los enseñados previamente y, en particular, en una relación específica entre sí, si una proteína diana inactiva debe separarse de una proteína diana activa. Los inventores han mostrado que, por ejemplo, puede separarse rFIX inactivo de rFIX activo manteniendo los parámetros anteriores controlados tal como se describe en el presente documento. En particular, el FIX inactivo podría separarse eficazmente en el esquema de purificación descrito en el presente documento. Muy sorprendentemente, los inventores también pudieron mostrar que no era necesario un desplazamiento del pH desde la carga/lavado hasta la elución en el primer material de intercambio aniónico, siempre que los intervalos de parámetros se fijaran tal como se describió anteriormente o tal como se muestra en las áreas sombreadas de las figuras adjuntas.

“FIX activo” es FIX que tiene la actividad deseada en un sujeto dado. Los inventores creen, aunque esto es una hipótesis solo y no quieren restringirse a la misma, que el FIX activo es una molécula de cadena sencilla de longitud completa sin pro-FIX que porta gamma carboxilaciones en el extremo N-terminal y que tiene una integridad estructural completa (unión por disulfuros, estructura secundaria y terciaria correctas) así como glicosilación. “FIX inactivo” es un FIX que no tiene la actividad deseada en un sujeto dado. Según una posible teoría, FIX inactivo puede originarse por infracarboxilación, contenido en pro-peptido, oxidación, desamidación, disgregación estructural, cambio en enlaces disulfuro, etc. El contenido de FIX inactivo en una composición dada puede determinarse por medio de medición de la actividad de FIX específica, que es menor en presencia de FIX inactivo. Fracciones que contienen solo FIX inactivo no tendrán ninguna actividad de FIX específica en absoluto.

En la parte experimental, los inventores pudieron mostrar en el presente documento que una fracción de aproximadamente el 25 % de proteína dependiente de vitamina K podía separarse durante la primera etapa de intercambio aniónico (carga más elución) que era completamente inactiva. Eso muestra claramente que el material de carga, tal como se origina a partir de por ejemplo producción recombinante de FIX en células CHO, comprende aproximadamente el 25 % de FIX inactivo, que no debe estar comprendido preferiblemente en la preparación farmacéutica final. En una realización preferida de esta invención, la proteína de unión a vitamina K se selecciona de un FIX, FVII o FX, producido de manera recombinante en células CHO, lo más preferiblemente FIX, producido de manera recombinante en células CHO. Tras separar la proteína dependiente de vitamina K inactiva por medio del presente esquema de purificación de la invención de la proteína dependiente de vitamina K activa, la preparación resultante se enriquece en vitamina K activa, preferiblemente libres esencialmente de vitamina K inactiva.

El presente método cromatográfico sobre una resina de intercambio aniónico permite por tanto la separación de polipéptidos de rFIX (longitud completa) activos e inactivos.

También se prefieren para la etapa de elución (b) las siguientes realizaciones, en las que se reflejan combinaciones preferidas de conductividad, concentración de Ca⁺⁺ y pH basándose en los experimentos adjuntos:

- Ca	- pH.	- Cond.
- mM	-	- mS/cm (25 °C)
- 1	- 7,0	- 18,6
- 1	- 7,0	- 19,8
- 1	- 8,0	- 21,2
- 1	- 8,0	- 22,4
- 1	- 8,3	- 23
- 1	- 8,75	- 23
- 2	- 7,0	- 15,8
- 2	- 7,0	- 16,9
- 2	- 8,0	- 19,5
- 2	- 9,0	- 20,9
- 2	- 9,0	- 22,0
- 3	- 7,0	- 14,0
- 3	- 7,4	- 14,0
- 3	- 8,0	- 15,5

ES 2 682 928 T3

- 3	- 8,0	- 16,7
- 3	- 9,0	- 18,2
- 1	- 19,8	- 7,0
- 1	- 19,8	- 7,45
- 1	- 21	- 7,5
- 1	- 21	- 7,85
- 1	- 23	- 8,3
- 1	- 23	- 8,75
- 2	- 18,9	- 7,0
- 2	- 16,9	- 7,45
- 2	- 20,	- 8,2
- 2	- 20,	- 8,65
- 2	- 20,9	- 8,55
- 2	- 20,9	- 9,0
- 3	- 14	- 7,0
- 3	- 14	- 7,4
- 3	- 16,0	- 7,75
- 3	- 16,0	- 8,2
- 3	- 18,2	- 8,55
- 3	- 18,2	- 9,0
- 1	- 7,0	- 18,2
- 1	- 8,0	- 21,7
- 1	- 8,0	- 22,9
- 1	- 8,05	- 23
- 1	- 8,9	- 23
- 2	- 7,0	- 15,3
- 2	- 7,0	- 17,5
- 2	- 8,0	- 20,1
- 2	- 9,0	- 20,4
- 3	- 7,0	- 14,7
- 3	- 7,6	-14,0
- 3	- 8,0	- 15,0
- 3	- 8,0	- 17,2
- 3	- 9,0	- 17,6
- 1	- 20,4	- 7,9
- 1	- 22	- 7,62
- 1	- 22	- 8,5
- 1	- 23	- 8,05
- 1	- 23	- 8,9
- 2	- 19	- 8,45

- 2	- 20,5	- 8,15
- 2	- 20,5	- 9,0
- 3	- 14,7	- 7,0
- 3	- 14	- 7,65
- 3	- 16,5	- 7,7
- 3	- 16,0	- 8,55
- 3	- 17,6	- 8,15
- 3	- 17,6	- 9,0

Las áreas sombreadas de las figuras adjuntas también pueden determinarse matemáticamente, basándose en los experimentos adjuntos.

5 Calculación de Ag de FIX [%] tras la elución

Log(Ag de FIX [%] tras la elución) = 0,150456*(pH de elución) - 0,0582981*(conductividad de elución [mS/cm]) - 0,166317*(concentración de calcio de elución [mM]) - 0,514886*(pH del lavado 2) - 0,333007*(LF del lavado 2 [mS/cm]) + 0,0445826*(pH del lavado 2)*(LF del lavado 2 [mS/cm]) + 5,90989

10

(LF = conductividad)

Lo siguiente describe una realización particularmente preferida: La mezcla de polipéptidos se carga sobre la resina de intercambio aniónico en condiciones que permiten la unión de las moléculas diana (por ejemplo pH neutro, NaCl < 220 mM). La elución selectiva se realiza con CaCl₂ 2 mM, NaCl 180 mM a pH 8,0. Aproximadamente el 25 % de rFIX inactivo no se eluye de la columna en estas condiciones, se eluye rFIX activo. En particular, el FIX inactivo de longitud completa se separa de FIX activo en esta etapa.

Para los parámetros calcio, pH y conductividad, se realizó un estudio de “diseño de experimentos” (DOE) para investigar la robustez y los límites del procedimiento de elución selectiva (véanse los ejemplos). Los experimentos y el modelo calculado dieron como resultado un intervalo de parámetros para pH, conductividad y concentración de calcio para el tampón de elución que garantizan una separación robusta de especies de FIX activo e inactivo durante el modelo de elución. Los intervalos de parámetros obtenidos a partir de los experimentos y el modelo se calculan para un intervalo 3S (valor medio +/- s desviaciones estándar de las ejecuciones de punto central) considerando que el 99,7 % de los experimentos realizados con ese ajuste de parámetros dará como resultado una separación robusta de las especies de FIX activo e inactivo. Para separar adicionalmente formas truncadas de FIX, en el presente documento se describe que la etapa de “lavado 2” es particularmente adecuada.

Por tanto, la presente invención también abarca en una realización preferida una etapa de elución (b), con combinaciones de parámetros elegidas del intervalo 3S alrededor del valor medio mostrado en una cualquiera de las figuras 1, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b o 3c, siempre que sean las definidas en la reivindicación 1.

De manera importante, el modelo también muestra que la selectividad del procedimiento de elución se pierde cuando la concentración de calcio aumenta más allá de los intervalos facilitados, y proporciona combinaciones de parámetros particularmente ventajosas que mantienen el comportamiento de elución selectivo.

2. El método según el punto 1, en el que tras la etapa de carga se realizan una o más etapas de lavado (1), (2) y/o (3) con un tampón de lavado (1), (2) y/o (3) en ausencia de un catión divalente pero en presencia de un contraanión. Contraaniones preferidos son: cloruro (el más preferido), acetato, fosfato, sulfato, carbonato, aunque no se limitan a estos.

3. El método según el punto 1 o 2, en el que al menos uno del tampón de carga y/o tampón de lavado tienen un pH que es al menos 0,5 pH unidades menor que el pH del eluyente de la etapa (b), preferiblemente en el que o bien el tampón de carga y/o bien el tampón en la etapa de lavado (2) tienen un pH que es al menos 0,5 pH unidades menor que el pH del eluyente de la etapa (b). Para separar las formas inactivas de las proteínas dependientes de vitamina K de las formas activas, el desplazamiento del pH descrito anteriormente no es necesario siempre que se mantengan las condiciones de parámetros específicas descritas en el presente documento.

4. El método según uno cualquiera o más de los puntos 1 a 3, en el que el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y el tampón de lavado opcional y en el que el eluato complementado en la etapa (c) tiene una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b). En una realización preferida, la conductividad del tampón de elución es de entre 14 y 23 mS/cm (TA), preferiblemente 19-20 mS/cm (TA). Si se realiza la etapa de lavado opcional 2

("lavado ácido"), la conductividad es preferiblemente de entre 14 y 19 mS/cm (TA), más preferido entre 16 y 18 mS/cm (TA) mediante lo cual en todos los casos el requisito del punto 4 anteriormente y los intervalos descritos para los parámetros anteriormente (es decir, área "h" de las figuras) debe satisfacerse.

5 5. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo tienen cada uno un grupo cargado positivamente que se selecciona independientemente del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetano (TMAE), polietilimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).

10 6. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo portan cada uno una amina primaria como ligando que se selecciona independientemente del grupo que consiste en aminohexilo, benzamidina, lisina y arginina.

15 7. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que la proteína dependiente de vitamina K es una proteína de unión a catión divalente, preferiblemente una proteína de unión a calcio. Una "proteína de unión a calcio" es una proteína que participa en, por ejemplo, rutas de señalización celular de calcio mediante unión a Ca^{++} . La unión a calcio de proteínas dependientes de vitamina K es, por ejemplo, necesaria para la unión de la proteína a superficies celulares cargadas negativamente, por ejemplo, de plaquetas sanguíneas activadas o, por ejemplo, para señalización celular.

20 8. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la proteína dependiente de vitamina K de esta invención se caracteriza preferiblemente por la existencia de residuos de glutamato específicos en regiones proteicas, ampliamente conocidos como dominios Gla, que se carboxilan a carboxiglutamato mediante una cascada de enzimas, en particular, gamma-carboxilasa y vitamina-K-oxidoreductasa, con vitamina K como coenzima. La reacción se cataliza mediante una carboxilasa dependiente de vitamina K que requiere oxígeno, dióxido de carbono y la forma reducida de vitamina K. La vitamina K se recicla mediante una vitamina K epóxido reductasa (VKOR).

25 9. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la proteína dependiente de vitamina K se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C y proteína S, de manera particularmente preferida del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VII (FVIIa) y factor X. Una cualquiera de las proteínas anteriores puede derivarse de, o bien, una fuente natural, por ejemplo plasma, o bien, de tecnologías recombinantes. Lo más preferido, la presente invención se refiere a la purificación de FIX y, en particular, FIX recombinante, incluso más preferido la purificación "posterior" de FIX recombinante que se produjo mediante expresión recombinante en células CHO.

30 10a. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 10 en el que el pH en la etapa (a) es de 6,8 a 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,4, para un caso en el que se realiza una etapa de lavado opcional y su pH es de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,9 a 6,1 en un caso en el que no se realiza la etapa de lavado opcional.

35 10b. El método según uno cualquiera de los puntos 1-10, en el que el pH de la etapa de lavado opcional (3) es de entre 7,0 y 8,2, preferiblemente entre 7,3 y 8,0, incluso más preferido de 7,3 a 7,5.

Se divulgan además en el presente documento las siguientes etapas:

40 - cargar una columna de intercambio aniónico con el sobrenadante de cultivo celular de la producción de FIX recombinante, FVII o FX, en ausencia de cationes divalentes, a un pH de 7,0 - 7,4,

45 - realizar un primer lavado, un segundo lavado con un pH de aproximadamente 5,5 - 6,5 y una conductividad de 16,5 - 19 mS/cm (25 °C) y un tercer lavado con un pH de 7,3 a 7,5,

50 - eluir con un tampón de elución que comprende Ca 1 - 3 mM, 17 - 22 mS/cm (25 °C) y un pH de 7 - 9, preferiblemente todos seleccionados según los intervalos de parámetros de la invención,

55 - opcionalmente realizar una etapa de disolvente/detergente (S/D) para la inactivación de virus,

- opcionalmente diluir para disminuir la conductividad hasta preferiblemente 15 - 18 mS/cm (25 °C),

- aumentar la concentración de Ca^{++} hasta 6 mM y ajustar el pH a 7,6 - 7,8,

60 - cargar una segunda columna de intercambio aniónico con el conjunto de eluatos diluido y recoger la fracción no retenida.

65 11. El método según el punto 10, con una o más etapas de lavado entre carga y elución en condiciones que garantizan la unión del producto activo, por ejemplo, a un pH de 6,0 - 8,0 y una conductividad de menos de NaCl 200 mM.

12. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en el que el pH en la etapa de lavado opcional (1) es de 7,3 a 7,5, y el pH de la etapa de lavado opcional (2) es preferiblemente de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,9 a 6,1.
- 5 13. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 12, en el que el tampón de elución (es decir, eluyente) en la etapa (b) contiene calcio 2 mM y tiene un pH de ~8,0 y una conductividad de 18 - 19 mS/cm (25 °C), obtenido mediante una adición de NaCl 180 mM.
- 10 14. Un método según cualquiera de los puntos 1 - 13 anteriores, particularmente según el punto 3, en el que el pH del tampón de carga en la etapa de cargar (d) es mayor que o bien el pH del tampón de carga en la etapa de cargar (a) o el pH del lavado, que sigue tras cargar (a). El "lavado que sigue tras cargar (a)" en el contexto anterior y tal como se menciona también a continuación, se refiere en este caso al "lavado ácido" o lavado 2. El lavado "ácido" descrito en el presente documento es adecuado para separar formas truncadas de proteínas dependientes de vitamina K, por ejemplo FIX, de proteínas de longitud completa.
- 15 15. Un método según cualquiera de los puntos 1 - 14 anteriores, particularmente según el punto 3, en el que la conductividad en la etapa de cargar (d) es igual a o menor que la conductividad del lavado, que sigue tras cargar (a).
- 20 16. Un método según cualquiera de los puntos 1 - 15 anteriores, particularmente según el punto 3 anterior, en el que la concentración de Ca⁺⁺ del tampón de carga en la etapa (d) es mayor que la concentración de Ca⁺⁺ en el tampón de elución de la etapa (b).
- 25 17. El método de cualquiera de los puntos 1 - 16, en el que la etapa de proporcionar el conjunto de eluatos obtenido con una baja conductividad se lleva a cabo mediante dilución con un tampón de dilución apropiado, alternativamente cambiando la composición del tampón, o alternativamente mediante diálisis, diafiltración o filtración en gel. También se describen:
- 30 18. Una proteína dependiente de vitamina K, tal como se obtiene mediante el método según uno cualquiera de los puntos 1 - 17 anteriores.
- 35 19. (r)FIX, obtenido mediante el método según uno cualquiera de los puntos 1-17 anteriores.
- 40 20. (r)FIX según el punto 19, con una actividad específica de al menos 270 U.I./mg Ag de FIX, preferiblemente una actividad específica de 270 a 350 U.I./mg Ag de FIX, más preferido una actividad específica de 270 a 320 U.I./mg Ag de FIX, particularmente preferido con una actividad específica de 280 a 300 U.I./mg Ag de FIX.
- 45 21. Composición farmacéutica que comprende (r)FIX tal como se define en el punto 19 o 20, con una razón de reducción de CHP de CHO de aproximadamente una reducción de 2,5 - 3 log. La reducción de 2,5-3 log es el logaritmo de la reducción global de CHP de CHO. Una reducción de CHP de CHO se ha mostrado como 229 (desde la etapa 1 hasta la etapa 2) y 1,75 (desde la etapa 2 hasta la etapa 3), es decir 1,75 x 229 = aproximadamente 440, el log de la misma sería de 2,6.
- 50 22. Composición farmacéutica que comprende (r)FIX tal como se define en el punto 19 o 20, y/o según el punto 21, con una impureza de CHP de CHO de menos de 50 µg/mg de Ag de FIX, preferiblemente menos de 20 µg/mg de Ag de FIX, incluso más preferido menos de 10 µg/mg de Ag de FIX.
- 55 23. Composición farmacéutica que comprende (r)FIX tal como se define en el punto 19 o 20, y/o según el punto 21 o 22, en la que la composición comprende menos de 10 pg/ml de ADN de CHO, preferiblemente menos de 5 pg/ml de ADN de CHO, incluso más preferido menos de 1 pg/ml ADN de CHO.
- 60 24. Composición farmacéutica que comprende (r)FIX tal como se define en el punto 19 o 20, y/o según uno cualquiera de los puntos 21 - 23, en la que la composición de (r)FIX comprende menos de 1 mU de actividad de FIXa (FIX activado)/unidad de actividad coagulante de FIX, preferiblemente menos de 0,75 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, más preferido menos de 0,5 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, incluso más preferido menos de 0,3 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX. 1 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX es equivalente al 0,1 % de actividad cromogénica por UI/ml de actividad coagulante de FIX (véase el método de ensayo tal como se describe más adelante).
- 65 25. Composición farmacéutica que comprende (r)FIX tal como se define en uno cualquiera de los puntos 19 o 20, y/o según uno cualquiera de los puntos 21 - 24, en la que la composición está enriquecida en una especie de FIX activa, de cadena sencilla y de longitud completa. Preferiblemente, la composición resultante está esencialmente libre de FIX inactivo (de longitud completa).
26. Un kit que comprende medios para llevar a cabo el método según uno cualquiera de los puntos 1-17.
27. Composición de (r)FIX, que puede obtenerse mediante el método de uno cualquiera de los puntos 1 - 17, en la

que la composición de (r)FIX comprende menos de 1 mU de actividad de FIXa (FIX activado)/unidad de actividad coagulante de FIX, preferiblemente menos de 0,75 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, más preferido menos de 0,5 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, incluso más preferido menos de 0,3 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX.

5 28. Composición de (r)FIX según el punto 27, caracterizada además por una o más de las características definidas en uno cualquiera de los puntos 19 - 25.

10 29. Composición de (r)FIX, en la que la composición de (r)FIX comprende menos de 1 mU de actividad de FIXa (FIX activado)/unidad de actividad coagulante de FIX, preferiblemente menos de 0,75 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, más preferido menos de 0,5 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX, incluso más preferido menos de 0,3 mU de actividad de FIXa/unidad de actividad coagulante de FIX.

15 30. Composición de (r)FIX según el punto 29, caracterizada además por una o más de las características definidas en uno cualquiera de los puntos 20-25.

Descripción detallada de la invención

20 En un aspecto, la presente invención se refiere al método según la reivindicación 1.

En una realización adicional preferida, el método para la purificación comprende además las siguientes etapas:

(c) diluir el conjunto de eluatos obtenido, ((1) reducir opcionalmente la conductividad), y aumentar la concentración del calcio;

25 (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato tal como se obtiene tras la etapa (c); y

30 (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína de unión a catión divalente.

El presente método de la invención usa preferiblemente un procedimiento en dos columnas de intercambio aniónico, haciéndose funcionar la primera columna en un modo de unión a producto y haciéndose funcionar la segunda columna en un modo de no unión a producto.

35 El principio del procedimiento requiere en una realización preferida poner en contacto (es decir, cargar) la disolución de proteína dependiente de vitamina K (por ejemplo rFIX) con (sobre) una resina de intercambio aniónico a un pH neutro o ácido (pH = 6,8 - 7,5, pref. 7,0 - 7,4, por ejemplo 7,0 - 7,2) en presencia de un quelante, por ejemplo, EDTA. Puede preferirse EDTA si el rendimiento del producto ha de mejorarse adicionalmente. EDTA puede mejorar la unión de la proteína de unión a catión divalente, por ejemplo, FIX. En una realización preferida, tras uno o más lavados (a por ejemplo un pH tal como se define más en detalle a continuación), el producto se eluye con un tampón que contiene calcio 1 - 3 mM (con un pH y una conductividad en un intervalo muy específico tal como se definió anteriormente). La proteína dependiente de vitamina K resultante, por ejemplo rFIX, contenida en el conjunto de eluatos tiene un bajo contenido en FIX inactivo y está adicional y sorprendentemente enriquecido en especies de FIX de cadena sencilla de longitud completa, activas.

45 El conjunto de eluatos obtenido se diluye entonces, en una realización preferida, para reducir la conductividad y aumentar la concentración de calcio. La disolución diluida tiene un pH de por ejemplo 7,6-7,8. El conjunto de eluatos condicionado de la primera etapa de purificación por intercambio aniónico se transfiere entonces (por ejemplo se bombea) sobre la segunda columna de intercambio aniónico en donde la proteína dependiente de vitamina K, como por ejemplo rFIX, no se une en las condiciones aplicadas (en particular presencia de concentraciones aumentadas de cationes divalentes, y pH ligeramente básico y una conductividad de aproximadamente 15-21 mS/cm (TA)), mientras que las impurezas de proteína sí se unen. La proteína dependiente de vitamina K resultante, por ejemplo rFIX, contenida en el efluente de columna de la segunda purificación por intercambio aniónico tiene una alta pureza y alta actividad específica. En particular, tiene un contenido particularmente bajo de FIX inactivo. La presente invención se explica además mediante las siguientes figuras:

Figura 1: Evaluación del espacio de diseño del tampón de elución de la etapa de captura ("CPN") en cuanto a la capacidad de eliminación de formas inactivas de FIX (parámetros variables: calcio y conductividad, pH=constante). Evaluación de datos de un estudio de robustez a pequeña escala para el estudio de DOE de la etapa de captura diseñados y evaluados con la herramienta de software Mode (versión 9.1). En este gráfico, el contenido de antígeno de FIX en el lavado con alto contenido de sal (tras la elución = se investigó la fracción considerando los parámetros conductividad y contenido en calcio del tampón de lavado con alto contenido en sal). El área sombreada indica un espacio de diseño para la composición de tampón que conduciría a una buena capacidad de eliminación para el antígeno de FIX de longitud completa inactivo. En las áreas adicionales, los polipéptidos de FIX inactivo eluirían conjuntamente con el conjunto de productos principales. Gráfico de contorno de la evaluación de datos dentro de intervalos de parámetros de 1 - 3 mM (calcio) y 14 - 23 mS/cm (25 %) para la conductividad a pH=8.

Figura 2: Evaluación del espacio de diseño del tampón de elución de la etapa de captura (CPN) en cuanto a capacidad de eliminación de formas inactivas de FIX (parámetros variables: calcio y conductividad, pH= 7-9).

5 Figura 2A: $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$

Figura 2B: $\text{Ca}^{++} = 2 \text{ mM}$

Figura 2C: $\text{Ca}^{++} = 3 \text{ mM}$

10 Figura 3: Visión general de parámetros de procedimiento sometidos a prueba en la etapa de CPN incluyendo intervalos de pruebas para los experimentos de DOE a escala de laboratorio.

15 Tal como puede deducirse a partir de los presentes datos experimentales, tal como se muestra en las figuras y la parte de ejemplos, el parámetro “concentración de calcio” del tampón de elución es muy relevante para la separación, los parámetros pH y la conductividad son importantes e interfieren con la elución ya que la elución tiene lugar sobre una resina de intercambio aniónico. El pH y la conductividad son responsables del desplazamiento de la ventana en donde puede realizarse satisfactoriamente una separación eficaz durante la elución. Muy sorprendentemente, es posible realizar una separación de proteína dependiente de vitamina-K inactiva a partir de la carga a bajas concentraciones de Ca^{++} de 1 - 3 mM.

20 El término “en ausencia de cationes divalentes” tal como se usa en el presente documento se refiere a la ausencia de cationes divalentes libres en el tampón, en el que pueden estar presentes cationes divalentes que se unen a una proteína o se complejan por ejemplo mediante un quelante, por ejemplo EDTA. El término “a una baja concentración de cationes divalentes” se refiere a una concentración de cationes divalentes en el intervalo μM , en particular una concentración de 1000 μM como máximo, preferiblemente 800 μM como máximo, incluso más preferido 500 μM como máximo. Para esta solicitud el término “en ausencia de cationes divalentes” pretende abarcar también la definición anterior para “a una baja concentración de cationes divalentes”. Tal como ya se mencionó anteriormente, calcio unido a proteína, por ejemplo calcio unido a EDTA puede tolerarse en una realización. Si el calcio se une a una proteína, se considera calcio “inactivo” en el contexto de esta invención. No interfiere entonces con la unión al producto. Por otro lado, el calcio libre podría interferir con la unión al producto.

25 La carga (a) del primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína dependiente de vitamina K en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En particular, las condiciones adecuadas para cargar la proteína dependiente de vitamina K en el material de resina de intercambio aniónico las conoce bien un experto en la técnica. Las condiciones específicas para la conductividad del tampón de carga que permiten la unión del producto dependen de las propiedades particulares de la proteína y el material de resina de intercambio aniónico usado (por ejemplo densidad de ligando, presentación de ligando, etc.). Los cationes divalentes se unen a proteínas en regiones que son habitualmente muy ácidas (es decir, cargadas negativamente). Las cargas negativas se enmascaran cuando se une el catión divalente. Sin embargo, cargando el material de intercambio aniónico con la proteína dependiente de vitamina K en ausencia de cationes divalentes, por ejemplo separando el catión divalente unido mediante un quelante, por ejemplo EDTA, la proteína porta parches muy cargados negativamente sobre la superficie que permiten una unión fuerte a un ligando de intercambio aniónico. Las condiciones para cargar una proteína sobre un material de resina de intercambio aniónico requieren siempre además un equilibrio entre el pH y la concentración de los contraiones, por ejemplo Cl^- . La química del contraión también influye en el comportamiento de elución, por ejemplo Cl^- porta una carga negativa, y el fosfato a pH neutro porta dos cargas negativas. Este último puede tener un poder de elución superior en comparación con Cl^- , incluso cuando la conductividad es inferior.

30 La carga de la columna de intercambio aniónico 1 (es decir, etapa (a)) se realiza preferiblemente a un pH de 6,8 - 7,5, preferiblemente 7,0 - 7,4, seguido por un lavado 1 a un pH de 7,3 - 7,5 para completar la carga, un lavado 2 en condiciones ácidas (pH 5,5 - 6,5, preferiblemente 5,8 - 6,2, más preferiblemente 5,9 - 6,1). En una realización adicional puede llevarse a cabo un lavado 3 opcional (lavado a baja conductividad, este es el lavado que se lleva a cabo directamente antes de la elución) a pH 7,0 - 8,2, preferiblemente 7,3 - 8,0, por ejemplo pH 7,3 - 7,5 para preparar la columna para la elución. La elución se realiza a un pH de 7,5 - 8,5, más preferiblemente 7,8 - 8,2. En una realización de la presente invención, el pH del tampón de elución es al menos 0,5 pH unidades superior al pH del lavado 2 anterior (lavado a alta conductividad, véanse las condiciones de conductividad tal como se describió anteriormente). Este segundo lavado a alta conductividad “ácido” tiene todavía una conductividad que es menor que la conductividad de la elución. Sin embargo, tal como queda claro a partir del área sombreada encerrada así como la descripción anterior de intervalos de parámetro preferidos, es posible obtener una buena separación de FIX inactivo de activo, incluso si el pH se mantiene constante.

35 En una realización, la etapa de cargar del primer intercambio aniónico se lleva a cabo a un pH de neutro a ligeramente ácido, por ejemplo a un pH de 6,8 - 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,4, si se realiza(n) la(s) etapa(s) opcional(es) de lavado. Preferiblemente esta etapa de cargar va seguido por un primer lavado a pH = 7,3 - 7,5 para completar la carga, un segundo lavado en condiciones ácidas (pH de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,8 a 6,2) y un

- lavado 3 a un pH de 7,3 - 7,5 para preparar la columna para la elución. El pH de la etapa de cargar de la primera columna de intercambio aniónico se fija a de 5,5 a 6,5, más preferido a pH 5,9 - 6,1, si no se realiza(n) la(s) etapa(s) opcional(es) de lavado. En una realización el pH se aumenta, preferiblemente en al menos 0,5 unidades de pH, antes de que se lleve a cabo la etapa de elución. Este aumento puede producirse en todas las fases, por ejemplo, desde la etapa de cargar directamente hasta la etapa de elución, si no se llevan a cabo etapas de lavado entre medias. En una realización alternativa, el aumento de pH se produce tras un lavado ácido, tal como se describió anteriormente. La elución, tal como se describe a continuación, se lleva a cabo preferiblemente al pH descrito en las realizaciones preferidas de intervalos de parámetros para la etapa de elución.
- En un caso en el que solo se lleva a cabo una etapa de lavado, es decir la etapa de lavado (1), esta etapa de lavado se llevará a cabo sin adición de sal; en consecuencia, el pH no es de importancia inmediata en la etapa de lavado.
- En una realización preferida, cuando se llevan a cabo dos etapas de lavado, es decir las etapas de lavado (1) y (2), o cuando solo se lleva a cabo la etapa de lavado (2) riguroso (véase también a continuación), este tampón de carga podría tener un pH en el área de neutro a ligeramente ácido, tal como se definió anteriormente, aunque se permitiría según los principios de la invención solo si la segunda etapa de lavado (es decir, la etapa de lavado 2) tenía un pH inferior de 5,5 a 6,5, o de 5,9 - 6,1. Si la etapa de cargar se llevaba a cabo a este pH inferior, entonces la etapa de lavado (2) tendría también preferiblemente este pH inferior. La etapa de lavado (2) en una realización preferida se lleva a cabo a través de una alta conductividad, tal como se definió anteriormente.
- En una realización adicional preferida, cuando se llevan a cabo tres etapas de lavado, es decir las etapas de lavado (1), (2) y (3), la etapa de lavado (3) no contendría preferiblemente ninguna sal; en consecuencia, el pH en esta etapa no sería relevante, siempre que se proporcionen las condiciones anteriores tal como se mencionan para el caso con dos etapas de lavado y el pH se aumente en la etapa de elución en al menos 0,5 unidades de pH, en comparación preferiblemente con la etapa de cargar y/o de lavado (2). El lavado (3) es preferiblemente un lavado a baja conductividad (en ese caso, no es necesario llevar a cabo la etapa c(1), si la conductividad del eluato resultante ya es baja).
- En una realización particularmente preferida, el pH en la etapa de lavado (3) puede aumentarse ya hasta el nivel del pH de la etapa de elución. Por tanto, el pH preferido de la etapa de lavado (3) es de entre 7,0 y 8,2, preferiblemente entre 7,3 y 8,0, incluso más preferido a 7,3 - 7,5. Si la etapa de lavado (3) se realiza en esta condición de pH particular, los presentes inventores encontraron que el grado de impurezas que están comprendidas en el producto deseado eluido se reduce adicionalmente en comparación con una situación en donde no se realiza etapa de lavado (3) o en donde dicha etapa se realiza a un pH diferente, por ejemplo, a un pH que es todavía tan bajo como el pH usado durante las etapas de cargar y/ de lavado (1) y (2). Los inventores creen, aunque no desean restringirse a esa hipótesis, que ajustar el pH de la etapa de lavado (3) al mismo pH que la elución evita un gradiente de pH durante la elución. Un gradiente de pH durante la elución podría ser una fuente de interferencia que permitiera que algunas impurezas se eluyeran conjuntamente con el producto. El lavado 3 tal como se describió anteriormente condiciona la columna ventajosamente para la elución. Un alto pH y una baja conductividad de este lavado impiden la elución conjunta de impurezas durante la siguiente elución. Incluso más preferido, la etapa de lavado (3) debe tener una conductividad, y en particular un poder de elución que es muy bajo o incluso cercano a cero. Una conductividad muy baja de este tipo estaría preferiblemente a 1 - 15 mS/cm (TA), más preferiblemente por debajo de 5 mS/cm (TA).
- En una realización preferida, una disolución que comprende proteínas, el producto deseado y todos los compuestos de los medios de cultivo celular incluyendo aminoácidos, vitaminas, azúcares, oligoelementos, etc. (incluyendo KCl, NaCl, Ca, aprox. 13 mS/cm (TA)) es el material de carga en la etapa de cargar (a). Tras la etapa de cargar, se lleva a cabo preferiblemente una etapa de lavado 1 que completa entonces la carga (preferiblemente próxima a o a pH neutro y a una baja conductividad). Después de eso, sigue preferiblemente una segunda etapa de lavado 2, que se considera un lavado riguroso, y se lleva a cabo preferiblemente con un bajo pH y de 150 a 210, preferiblemente de 170 a 190 mM, lo más preferido 180 mM (si se lleva a cabo con NaCl, las condiciones preferidas para diferentes sales estarían dentro del conocimiento del experto en la técnica), seguido en una realización adicional preferida por una etapa de lavado 3 que prepara la columna cargada para la elución. Esta tercera etapa de lavado se lleva a cabo preferiblemente a una baja conductividad y a un pH tal como se definió anteriormente. Esta etapa de lavado tiene la importante tarea de reducir la conductividad en la columna y llevar el pH de nuevo hasta la neutralidad ya que el lavado anterior era a un pH bajo, e incluso llevar la columna próxima al pH de la elución, tal como se explicó anteriormente. Estas medidas preparan la columna para la elución de pseudoafinidad con calcio e impiden la elución conjunta de impurezas en la interfase entre tampón de elución y tampón de lavado 2. La elución se lleva a cabo preferiblemente con un tampón que contiene calcio y de 150 de 210, preferiblemente de 170 a 190 mM y lo más preferido NaCl 180 mM. El contenido de los contraiones, por ejemplo NaCl, se ajusta para obtener la conductividad deseada, tal como se describió anteriormente para los intervalos de parámetros preferidos para la elución de la primera columna de intercambio aniónico. Serían posibles otros contraiones, además del cloruro anterior (el más preferido), por ejemplo acetato, fosfato, sulfato, carbonato, aunque sin limitarse a estos.
- Además, se conocen bien en la técnica tampones de carga adecuados para cargar una proteína dependiente de vitamina K en un material de intercambio aniónico en la etapa (a) del método de la presente invención, proporcionando condiciones en las que la proteína dependiente de vitamina K se une al material de intercambio

aniónico. Por ejemplo, el tampón de carga puede tener un pH de pH 6,8 a 7,5, preferiblemente de pH 7,0 a 7,4, si se lleva(n) a cabo una(s) etapa(s) de lavado opcional(es), tal como se explicó anteriormente. Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para unir la proteína dependiente de vitamina K al material de resina de intercambio aniónico que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. En una realización preferida, el tampón de carga puede contener un agente quelante, por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA de 0,5 a 10 mM, más preferido EDTA de 1 a 5 mM, preferiblemente EDTA 2 mM aproximadamente. También pueden usarse posibles agentes quelantes alternativos, y los conoce bien un experto en la técnica. Un tampón de carga que contiene la proteína dependiente de vitamina K que puede aplicarse al material de resina de intercambio aniónico en el método de la presente invención puede contener por ejemplo MES 20 mM y EDTA 2 mM. MES es un ejemplo para un agente tamponante para pH 6; para pH 7 y por encima sería por ejemplo posible usar tampón Tris. Como el material de carga es en una realización preferida un sobrenadante de cultivo celular, por ejemplo de la producción recombinante en una línea celular CHO, que se tampona básicamente mediante carbonato y aminoácidos, no debe estar presente necesariamente un tampón de carga.

El método de la presente invención comprende preferiblemente la etapa de lavar el material de resina de intercambio aniónico cargado con un tampón de lavado en ausencia de cationes divalentes. Esta etapa de lavado puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. Se conocen bien en la técnica tampones de lavado adecuados para eliminar por lavado impurezas del material de intercambio aniónico esencialmente sin eluir la proteína dependiente de vitamina K. Por ejemplo, el tampón de lavado tiene un pH que es al menos 1,0 o al menos 0,5 unidades de pH menor que el pH del tampón de carga y es preferiblemente de 5,5-6,5, preferiblemente de 5,9-6,1. Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para lavar el material de resina de intercambio aniónico sin eluir la proteína dependiente de vitamina K en una cantidad significativa que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tampón de lavado puede contener un agente tamponante adecuado, por ejemplo Bis-Tris, tampón acetato, tampón citrato o tampón fosfato, preferiblemente Bis-Tris 20 mM. Preferiblemente, los lavados 1 y 3 tienen Tris como tampones de lavado mientras que el lavado 2 tiene MES. Adicionalmente, puede contener un agente quelante como por ejemplo EDTA, preferiblemente EDTA de 0,5 a 10 mM, más preferido EDTA de 1 a 5 mM, preferiblemente EDTA 2 mM aproximadamente. Además, puede contener una sal adecuada, por ejemplo sales de los siguientes cationes y aniones: K^+ , Na^+ , Li^+ , NH_4^+ y aniones como cloruro, fosfato, sulfato, carbonato, acetato, para regular la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de ≤ 200 mM, preferiblemente desde 100 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 150 mM hasta 200 mM, más preferiblemente desde 170 mM hasta 190 mM y lo más preferiblemente desde 175 mM hasta 185 mM. En otra realización preferida de la presente solicitud, el tampón de lavado contiene NaCl de 100 a 200 mM. El valor absoluto para la concentración de sal depende de la proteína dependiente de vitamina K que va a purificarse, en la que está dentro del conocimiento del experto en la técnica determinar qué proteínas dependientes de vitamina K requieren concentraciones de sal inferiores o superiores para conseguir la pureza óptima.

Preferiblemente, según el presente método para la purificación de proteínas dependientes de vitamina K, se lleva a cabo una segunda etapa de lavado tras la primera etapa de lavado mencionada anteriormente. Esta etapa de lavado, si es el lavado directamente antes de la elución, se lleva a cabo a una baja conductividad. Esta conductividad es preferiblemente menor que la conductividad en la etapa de cargar y la primera etapa de lavado. Incluso más preferiblemente, puede realizarse una tercera etapa de lavado. Esta realización se ha descrito en detalle anteriormente.

La elución de la proteína dependiente de vitamina K con un eluyente que comprende calcio puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En particular, se conocen bien en la técnica eluyentes adecuados que contienen contra-cationes adecuados. El tampón de elución puede tener un pH que es mayor que el pH del tampón de lavado. El pH se aumenta preferiblemente en al menos 0,5, preferiblemente 1,0 unidades de pH. El tampón de elución debe tener un pH tal como se selecciona según las realizaciones de combinación preferidas mostradas en las reivindicaciones. Contiene las concentraciones de sal que los presentes inventores determinan que son adecuadas para eluir la proteína dependiente de vitamina K del primer material de resina de intercambio aniónico sin eluir impurezas, particularmente FIX inactivo, en una cantidad significativa.

En particular, ahora es posible, trabajando en los intervalos de parámetros para los parámetros de pH, conductividad y concentración de Ca^{++} para la etapa de elución de la primera columna de intercambio aniónico, separar tanto como el 25 % de proteína dependiente de vitamina K inactiva de la proteína dependiente de vitamina K activa, enriqueciendo por tanto la proteína dependiente de vitamina K resultante en su contenido de proteína dependiente de vitamina K activa, preferiblemente en una preparación que está esencialmente libre de formas inactivas, particularmente libre de formas de longitud completa inactivas.

Por ejemplo, el tampón de elución puede contener un agente tamponante adecuado como por ejemplo HEPES, Tris, preferiblemente Tris 20 mM, Tris/acetato, histidina, Gly-Gly, MOPS o tricina, a concentraciones que oscilan normalmente entre 5 y 50 mM. Puede contener también una sal adecuada, por ejemplo sales de los siguientes cationes y aniones: K^+ , Na^+ , Li^+ , NH_4^+ y aniones como cloruro, fosfato, sulfato, carbonato, acetato, para regular la conductividad del tampón, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de 120-205 mM.

Lo siguiente es una lista de tampones particularmente preferidos:

Tris: tampones a $\text{pH} = 8,06 \pm 1,0$,

5 HEPES: tampones a $\text{pH} = 7,7 \pm 1,0$,

MOPS; tampones a $\text{pH} = 7,3 \pm 1,0$,

10 tricina: tampones a $\text{pH} = 8,3 \pm 1,0$,

histidina: tampones a $\text{pH} = 7,6 \pm 1,0$,

Gly-Gly: tampones a $\text{pH} = 7,4 \pm 1,0$.

15 Bis-Tris: tampones a $\text{pH} = 6,35 \pm 1,0$,

ACES (ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico): tampones a $\text{pH} = 7,0 \pm 1,0$,

20 ADA (ácido N-(2-acetamido)-iminodiacético): tampones a $\text{pH} = 7,0 \pm 1,0$,

MES: tampones a $\text{pH} =$ aproximadamente 6,0.

El tampón de elución puede contener también una sal adecuada para regular la conductividad del tampón de lavado, como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de 120-205 mM.

25 Tras la etapa de elución, el conjunto de eluatos obtenido se diluye para reducir la conductividad y la concentración de calcio, preferiblemente se aumenta la concentración de calcio. Esta medida proporciona condiciones que impiden la unión del producto a la segunda resina de intercambio aniónico y facilita la unión de proteínas de células huésped. Una dilución de este tipo la conoce un experto en la técnica y se realiza según métodos bien conocidos. Por ejemplo, la adición de un volumen de columna de tampón de dilución aumenta Ca^{++} y reduce ligeramente la conductividad. La disolución diluida tiene preferiblemente un pH final de 7 a 8, más preferiblemente de 7,5 a 7,9.

30 El experto en la técnica entiende que procedimientos adicionales para proporcionar el conjunto de eluatos obtenido con la conductividad disminuida también se encontrarían bajo la definición de diluir el conjunto de eluatos para reducir la conductividad. Por tanto, posibilidades adicionales para reducir la conductividad del conjunto de eluatos serían cambiar la composición del tampón, por ejemplo mediante dilución con un tampón de bajo contenido en sal o mediante diálisis, o usando diafiltración.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "material de resina de intercambio aniónico" no subyace a una restricción específica. Según la presente invención, la primera y segunda resina incluye cualquier material adecuado para cromatografía de intercambio aniónico conocido en la técnica, como por ejemplo un material de cromatografía a base de agarosa, por ejemplo sefarosas como Fast Flow o Capto, material sintético polimérico, por ejemplo polimetacrilato como Toyopearl, poliestireno/divinilbenceno, por ejemplo Poros, Source, o celulosa, por ejemplo Cellufine. En un ejemplo específico de la presente invención, el primer y segundo material de resina de intercambio aniónico es sefarosa, que se basa en agarosa modificada, cuyas cadenas de polisacárido se reticulan para formar una red tridimensional. En una realización preferida, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo incluyen, pero no se limitan a resinas que portan una amina primaria como ligando, por ejemplo aminohexilsefarosa, benzamidinasefarosa, lisinasefarosa o argininasefarosa. En otra realización preferida, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo incluyen, pero no se limitan a resinas que tienen un resto cargado positivamente a pH neutro, tal como alquilaminoetano, como dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE) o trimetilaminoetilo (TMAE), polietilenoimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q), y similares. En una realización particularmente preferida el material de resina de intercambio aniónico es Q-Sepharose Fast Flow (Q-Sepharose FF). Según el método de la presente invención, los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

40 El tampón de carga (etapa d) para la segunda etapa de intercambio aniónico puede ser el mismo que anteriormente para la primera etapa de intercambio aniónico. La diferencia entre las dos etapas de intercambio aniónico tal como se proporciona según la presente invención es esencialmente la siguiente:

60 a) La primera columna de intercambio aniónico se carga con el material de partida, es decir en una realización preferida con el material de cultivo celular. Éste es un material de partida altamente impuro. La segunda columna de intercambio aniónico se carga con material que ya se ha purificado en algún grado, ya que es el material obtenido tras la etapa de elución (y complementación).

65

b) La primera etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo con cationes divalentes, para la elución del producto, tras haber cargado la primera columna de intercambio aniónico en ausencia de cationes divalentes.

5 c) El pH y la concentración de los cationes divalentes de la carga para el segundo intercambio aniónico se seleccionan en una realización preferida de modo que el pH de la carga (d) es superior y el pH de o bien el lavado (ácido, por ejemplo lavado 2) tras la carga (a) o bien la carga (a) *per se* si no se usan etapas de lavado. Además, la conductividad de la carga (d) es comparable al lavado ácido, pero preferiblemente inferior, si este lavado se lleva a cabo. La concentración de cationes divalentes, por ejemplo concentración de Ca^{++} es mayor en la carga (d) que el tampón de elución de la etapa (b).

10 d) En consecuencia, en la primera columna de intercambio aniónico el producto se une a la columna y en la segunda columna de intercambio aniónico el producto no se une.

15 La proteína dependiente de vitamina K según la presente memoria descriptiva es una proteína de unión a catión divalente, como por ejemplo una proteína de unión a calcio. En una realización preferida, la proteína dependiente de vitamina K se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C y proteína S, particularmente preferida del grupo que consiste en factor IX, factor VII y factor X.

20 El material de partida ("muestra") para la proteína dependiente de vitamina K puede obtenerse usando métodos conocidos por un experto en la técnica como, por ejemplo proteínas derivadas de plasma, proteínas producidas de manera transgénica o proteínas producidas de manera recombinante, por ejemplo usando células CHO. Un experto en la técnica conoce bien métodos secretores y no secretores para extraer proteínas del cultivo celular. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo por medio de transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariontas o eucariontas mediante transfección, por ejemplo por medio de electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo de una manera continua o discontinua, (iv) la expresión de una proteína dependiente de vitamina K, por ejemplo constitutiva o tras inducción, y (v) el aislamiento de la proteína, por ejemplo del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, con el fin de obtener una proteína dependiente de vitamina K en bruto. Adicionalmente, el ADN recombinante que codifica para una proteína dependiente de vitamina K, por ejemplo un plásmido, puede contener también una secuencia de ADN que codifica para un marcador seleccionable para seleccionar las células que se han transfectado satisfactoriamente con el ADN recombinante.

35 En una realización preferida de la presente invención, el material de partida para el método de la invención es un material que comprende FIX, preferiblemente plasma que comprende FIX o FIX producido de manera recombinante. La producción recombinante de FIX se conoce bien en la técnica. rFIX, que es FIX recombinante, se secreta según una realización preferida en el sobrenadante de cultivo celular (CCS) y este CCS se usa entonces como material de partida para el presente método de la invención.

40 Las proteínas pueden purificarse previamente para reducir las impurezas, por ejemplo mediante electroforesis en gel, cromatografía, filtración en gel, centrifugación, filtración, precipitación, cristalización o cualquier otro método conocido en la técnica. El término "impureza" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier impureza que se origine a partir de la producción de la proteína dependiente de vitamina K y puede incluir por ejemplo impurezas de proteínas de células huésped (HCP), impurezas de ácido nucleico, impurezas de polipéptido, impurezas de tampón y sal, impurezas que se originan a partir del medio de cultivo celular, impurezas relacionadas con productos, tales como dímeros o fragmentos, y combinaciones de los mismos.

50 El método de la invención tal como se describe en el presente documento permite la eliminación o separación de formas inactivas y truncadas de por ejemplo FIX del producto de FIX activo. El método también permite controlar o mantener la formación de impurezas relacionadas con productos a un nivel muy bajo (por ejemplo productos de degradación, agregación de productos, partículas). Incluso adicionalmente, el método proporciona condiciones para mantener la cantidad de FIX activado (FIXa) a un nivel particularmente bajo.

55 Además, el método es particularmente poderoso en la separación de impurezas relacionadas con el procedimiento (HCP de CHO, ADN de CHO, componentes del medio) del producto de FIX activo.

60 Una impureza adicional que se encuentra en particular en preparaciones de FIX, incluso preparaciones farmacéuticas de FIX, es FIX activado, es decir, FIXa. Se ha mostrado que FIXa afecta negativamente a la preparación de FIX resultante deseada ya que eleva la trombogenicidad. Por tanto, es altamente deseable proporcionar métodos para reducir el contenido de FIXa en una preparación de FIX.

El presente método de la invención logra este objetivo impidiendo la formación de FIXa en la preparación que puede obtenerse mediante el presente método.

65 De un modo ventajoso y sorprendente, también es posible según la presente invención reducir el contenido de proteína de células huésped (HCP), en particular HCP de células CHO si el material de partida usado es un FIX

producido de manera recombinante en un cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular.

De un modo ventajoso y sorprendente adicional, adicionalmente es posible reducir el contenido de ADN de células huésped, en particular ADN de CHO en la composición obtenible mediante el presente método de la invención.

Los resultados anteriores son adicionales a las mejoras en rendimiento y actividad específica que proporciona la presente invención.

Los resultados anteriores son adicionales a las mejoras en rendimiento y actividad específica que proporciona la presente invención,

En una realización preferida, la proteína dependiente de vitamina K que se ha purificado según el método de la presente invención tiene una pureza con respecto a impurezas de proteínas de células huésped (HCP) de al menos el 95 % p/p, y lo más preferiblemente al menos el 99,5 % p/p de proteína dependiente de vitamina K en proteína total. Por consiguiente, en una realización preferida, el contenido de las impurezas de HCP en la proteína dependiente de vitamina K purificada es menor del 5 % p/p, más preferiblemente el 2 % p/p, más preferiblemente menor del 1 % p/p y lo más preferiblemente menor del 0,5 % p/p. Los valores de porcentajes de las impurezas de HCP se refieren a p/p de producto, es decir la proteína dependiente de vitamina K purificada, y pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC o ELISA.

La presente invención proporciona un método eficaz para la purificación de una proteína dependiente de vitamina K usando materiales de resina de intercambio aniónico que permiten una alta reducción de impurezas relacionadas con el procedimiento de la proteína con rendimientos de producto simultáneamente altos.

El conjunto de eluatos que se ha diluido de la primera etapa de purificación por intercambio aniónico se carga entonces sobre la segunda columna de intercambio aniónico, en donde la proteína dependiente de vitamina K no se unirá en las condiciones aplicadas. La proteína dependiente de vitamina K resultante contenida en el efluente de la columna de la segunda purificación por intercambio aniónico tiene una alta pureza y alta actividad específica. Además, tiene un bajo contenido de HCP (CHO), un bajo contenido de ADN (CHO) y un bajo contenido de FIXa.

El contenido de factor FIXa se mide por medio de su actividad, expresada como porcentaje de actividad en relación con la actividad del factor IX.

La potencia (en unidades internacionales, UI) de un producto de FIX recombinante (rFIX), se determina usando un ensayo de coagulación de una fase *in vitro* ampliamente conocido y aceptado usando una referencia calibrada frente a un patrón internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para concentrado de factor IX. Una unidad internacional es la cantidad de actividad de FIX presente en 1 ml de plasma humano normal agrupado (Barrowcliffe TW, Standardization of FVIII and FIX assays, Haemophilia 2003; 9: 397-402).

FIXa en dicho producto se mide usando un ensayo que lo conoce generalmente un experto en la técnica. Un ejemplo es el kit de FIXa cromogénico comercialmente disponible (como Rox FIX-A, n.º de artículo 950030; Rossix, Moindal, Suecia) empleando una referencia calibrada frente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) para factor IXa. Para llevar a cabo un ensayo de este tipo, se activa FX humano a FXa mediante FIXa en presencia de FVIII, trombina, calcio y fosfolípidos. La cantidad de FXa generada se mide con un sustrato de FXa específico, que tras la escisión liberará p-nitroanilina en cantidades que son proporcionales a las de FXa. El ensayo es muy sensible a FIXa con un límite de cuantificación inferior de 0,10 mUI/ml.

Los niveles de FIX preactivado (rFIXa) en el producto final (tal como se obtiene mediante el presente método de la invención) fueron muy bajos de manera sistemática. El límite permitido se fija como $\leq 0,10$ % de la actividad de FIXa (UI cromogénicas/ml)/actividad de FIX (UI de coagulación/ml). El contenido de FIXa real de 15 lotes sometidos a prueba de la invención era sin embargo tan bajo como $\leq 0,02$ % de FIXa/FIX. Todas las preparaciones de FIX, que se obtuvieron siguiendo el procedimiento de purificación reivindicado en el presente documento, tenían valores de menos del 0,02 % de FIXa/FIX. Cuando se analizó un único lote de BeneFIX (E94791 como producto comparativo disponible en el mercado) con los mismos ensayos, el contenido de FIXa relativo se midió como el 0,11 %.

Tomados conjuntamente, el contenido de FIXa relativo de todos los lotes era sistemáticamente bajo y aparentemente hasta 10 veces menor que el del producto comparativo.

En particular, el método de la presente invención se basa en el siguiente principio general. Generalmente, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico aumenta a conductividades inferiores y valores de pH superiores. A la inversa, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico disminuye a conductividades superiores y valores de pH inferiores. En el método de la presente invención, la proteína dependiente de vitamina K se carga y/o se lava preferiblemente a un bajo pH, tal como se explicó en detalle anteriormente, lo que todavía permite la unión de la proteína dependiente de vitamina K al primer material de intercambio aniónico y no daña la integridad estructural o la actividad de la proteína dependiente de vitamina K. Muchas impurezas de proteína no se unirán al primer material de resina de intercambio aniónico y, por tanto, la

unión de impurezas al primer material de resina de intercambio aniónico se reduce en gran medida mientras que el producto de hecho se une a la primera columna de intercambio aniónico. Las impurezas de proteína que se unen al primer material de resina de intercambio aniónico en estas condiciones, y que no se eliminan por lavado, se impide que eluyan conjuntamente aumentando el pH durante la elución. Un posible aumento del pH en el eluyente provoca que todas las proteínas se unan incluso más fuerte al primer material de resina de intercambio aniónico, pero el calcio interacciona específicamente con el producto provocando elución.

El tampón de elución de la primera columna de intercambio aniónico se condiciona

- para ajustar la conductividad (a los intervalos tal como se describió anteriormente), en particular dentro de un intervalo específico en relación con los parámetros de pH y concentración de Ca^{++} ,

- ajustar el pH para que esté dentro de un intervalo especificado en relación con los parámetros de conductividad y concentración de Ca^{++} , y

- aumentar la concentración de calcio (para que sea mayor que en la carga (a)) y esté entre 1-3 mM, pero de nuevo seleccionada en relación con los parámetros de pH y conductividad.

Estas medidas proporcionan las condiciones para la unión selectiva de impurezas, particularmente de FIX inactivo, y la no unión selectiva y elución del producto activo sobre la resina de intercambio aniónico.

Según una realización preferida del método de la presente invención, el eluato se condiciona adicionalmente, tal como se describe en el presente documento de modo que solo la proteína dependiente de vitamina K no se une al segundo material de intercambio aniónico debido a la selección de parámetros en el eluato. En este contexto, debe indicarse que aumentar el pH para la carga en la etapa (d) en comparación con el lavado ácido es muy atípico para una cromatografía negativa, es decir una cromatografía de intercambio aniónico en la que la proteína que va a purificarse se espera en la fracción no retenida, puesto que, tal como se ha establecido anteriormente, las proteínas se unen generalmente más fuertemente a materiales de resina de intercambio aniónico a valores de pH superiores.

De manera importante, usando el tampón de elución para el primer material de resina de intercambio aniónico con Ca^{++} 1-3 mM, el método de la presente invención logra de manera sorprendente y ventajosa un contenido superior del producto de proteína dependiente de vitamina K activo mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Además, el aumento opcional de pH durante la elución del producto inducida por Ca de la etapa (b) (el tampón de elución tiene un pH mayor que el tampón de carga de la etapa (a) o el lavado ácido de la etapa (a)) y el ajuste de la carga para la etapa (d) (pH mayor que el lavado ácido de etapa (a), más calcio que eluyente de la etapa (b)) proporciona una purificación selectiva de proteínas dependientes de vitamina K e impide la elución conjunta de impurezas. La carga del segundo material de resina de intercambio aniónico a alto pH y alto contenido de calcio fuerza a las impurezas a unirse al segundo material de resina de intercambio aniónico mientras que se inhibe la unión de la proteína que va a purificarse complementando cationes divalentes. Según la presente invención, las condiciones anteriores dan como resultado una alta pureza así como altos rendimientos de proteínas dependientes de vitamina K. El método de la presente invención puede proporcionar una reducción significativa de impurezas de polipéptido relacionadas con el procedimiento, por ejemplo cargando la disolución de proteína sobre un material de resina de intercambio aniónico a pH reducido, cargando el producto con un eluyente con calcio a 1-3 mM, a un pH y una conductividad específicamente seleccionados, cargando el eluato sobre un segundo material de resina de intercambio aniónico bajo alto pH y concentración aumentada de calcio, pero en particular mediante la selección de parámetros específicos durante la elución, y recogiendo la fracción no retenida.

La estrategia de purificación se basa entre otras en las propiedades bioquímicas únicas de proteínas dependientes de vitamina K. Por ejemplo en el dominio de Gla, aproximadamente 12 cargas negativas están centradas dentro de un tramo de aminoácidos corto. Esta carga negativa puede neutralizarse o incluso convertirse en una carga positiva añadiendo cationes divalentes (por ejemplo Ca^{2+}) al sistema. Basándose en este efecto, por ejemplo puede unirse rFIX a resinas de intercambio iónico en un estado de carga específico y eluirse del gel convirtiendo la carga eliminando (o añadiendo) Ca^{2+} . Este principio de separación se denomina "cromatografía de pseudoafinidad". Este principio se refleja también en las proteínas dependientes de vitamina K que no comprenden un dominio de Gla. El presente método de la invención que se aplica para la purificación de proteínas dependientes de vitamina K, como por ejemplo rFIX, introduce intervalos de parámetros particulares que permiten la provisión de una preparación farmacéutica superior de una proteína dependiente de vitamina K, que está enriquecida en proteína dependiente de vitamina K activa y preferiblemente libre esencialmente de proteína dependiente de vitamina K inactiva, particularmente de proteína dependiente de vitamina K de longitud completa inactiva.

Procedimiento de purificación de rFIX

Los inventores desarrollaron una línea celular CHO recombinante que expresa factor IX humano recombinante basándose en la línea celular original CHO DXB11. La línea celular se modificó por ingeniería genética de un modo que expresa conjuntamente furina humana recombinante para mejorar la maduración intracelular de pro-FIX a FIX.

Para el procedimiento de producción, se hicieron crecer las células en suspensión en modo de quimiostato y se adaptaron a medios químicamente definidos sin ninguna adición de proteínas derivadas de mamíferos o plasma. Se añadió peptona de soja a los medios de crecimiento para mejorar la productividad del clon.

5 En una campaña de producción de quimiostato, se clarificó la cosecha de cultivo celular recogida mediante filtración en profundidad sobre filtros profundos Cuno (con potencial zeta positivo) y filtración por membrana de 0,2 µm sobre membranas de filtro de PVDF o PES para eliminar células y residuos celulares. La cosecha filtrada libre de células representaba el material de partida para desarrollar el procedimiento de purificación de rFIX.

10 Diversas modificaciones y variaciones del método descrito y los productos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferidas, no debe limitarse excesivamente a tales realizaciones.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Determinación de intervalos de parámetros y eliminación de FIX inactivo

Objetivo

20 En este conjunto de experimentos, se investigó la influencia de los parámetros de tampón de pH, conductividad y contenido en calcio sobre las prestaciones de la etapa de captura. Se evaluó el impacto sobre el rendimiento de producto y la calidad de producto usando un enfoque de diseño estadístico.

Introducción

25 La etapa de producción posterior de rFIX "CPN" es una purificación cromatográfica sobre una columna de intercambio aniónico, en este ejemplo sobre Q-Sepharose Fast Flow. El material de carga es material de cosecha clarificado de la fermentación complementada con EDTA 2 mM. El procedimiento de purificación a gran escala aplicado a la producción clínica de rFIX comienza normalmente con una etapa de captura mediante cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sepharose Fast Flow, cargando la cosecha clarificada con una complementación de EDTA 2 mM y un pH de aproximadamente 7,0-7,4. El objetivo principal de esta etapa de captura es la reducción de impurezas relacionadas con el procedimiento (componentes del medio, impurezas derivadas de células de producción), eliminación de impurezas relacionadas con productos (especies de rFIX truncadas, especies de rFIX sin sensibilidad al calcio, FIX-desGLA) y la concentración del producto. Los parámetros críticos para la etapa de purificación cromatográfica por intercambio aniónico que se aprovechan de un efecto del calcio sobre una elución por "pseudo"-afinidad se definieron mediante una evaluación del riesgo. Para evaluar adicionalmente la etapa de procedimiento posterior de rFIX, CPN (etapa de captura), se realizaron estudios a pequeña escala que cubren los parámetros que se consideraron críticos, es decir pH (lavado con tampón 2 y tampón de elución), conductividad (lavado con tampón 2 y tampón de elución) y el contenido en calcio (tampón de elución) aplicando un enfoque de DOE. Se derivó el material de prueba de una producción en fase III clínica de rFIX a escala piloto. Se analizaron las ejecuciones de purificación cromatográfica aplicando métodos analíticos cualificados o validados apropiados. Se evaluaron los datos resultantes, se compararon con los datos de producción clínica y dieron información sobre la robustez de la etapa en cuanto al entorno de parámetros actuales. Los detalles cromatográficos de la etapa de captura de FIX se describen a continuación. La carga de proteína para la carga de muestra fue de 0,8-1,1 mg de antígeno de FIX por ml de resina. La recolección se inició a un aumento significativo de la pendiente de UV₂₈₀ de más de o equivalente a 0,2 UA (longitud de paso óptimo: 5 mm) y termina tras 4,5 CV. Se usó el tampón QFF-Equi para el equilibrado, lavado 1 y lavado 3, se usó el tampón de lavado QFF para el lavado 2. Se usó el tampón QFF-elú para la elución. La disolución madre de EDTA 200 mM estaba a un pH de 7,4 ± 0,1 a temperatura ambiente. Tenía una conductividad de 30-35 mS/cm a 25 °C. Se introdujeron variaciones planeadas para determinar el efecto de variaciones y varios parámetros para el tampón de lavado y elución correspondientes al diseño del estudio. Se tomó el material de carga de rFIX de campañas de producción de fase 3 clínica sin una etapa de congelación/descongelación. La etapa de captura incluye activación de la columna, equilibrado, carga de producto, lavados 1, 2, 3 y elución. Se usó un procedimiento de limpieza de columna para garantizar que no se produce arrastre de lote a lote de proteínas desnaturalizadas e impide la incrustación de la columna que tendría un impacto en el rendimiento de la columna.

Diseño experimental

60 Se variaron cinco parámetros de los tampones QFF-wash (lavado 2) y QFF-Elu (elución) incluyendo pH, conductividad y la concentración de calcio tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Visión general de parámetros de procedimiento sometidos a prueba de la etapa CPN

Variable de procedimiento	Subvariable	Punto establecido o intervalos	
		Intervalo especificado	Intervalo sometido a prueba

ES 2 682 928 T3

pH	Tampón de lavado 2	5,9-6,1	5,0-7,0
	Tampón de elución	7,9-8,1	7,0-9,0
Conductividad	Tampón de lavado 2	16,5-21,5	14/18/22
	Tampón de elución	17,0-22,0	14-23
Concentración de Ca ²⁺	Tampón de elución	2 mM	1,0-3,0 (+ 0,05 y 6,0)

En la siguiente tabla 2, se identifican los parámetros de procedimiento realmente usados en la etapa de captura:

Tabla 2A: Visión general de parámetros de procedimiento sometidos a prueba en la etapa CPN incluyendo intervalos de pruebas para los experimentos de DOE

5

Nombre del experimento	Parámetros de procedimiento								
	Carga				Lavado 2		Elución		
	Carga	pH	Cond.	EDTA	pH	Cond.	pH	Cond.	Ca ⁺⁺
	mg/ml		mS/cm	mM		mS/cm		mS/cm	mM
F9_04	0,90	6,97	13,41	2,0	6,03	18,48	7,92	18,23	2,0

F9_07	0,92	7,06	13,47	2,0	6,03	18,43	7,96	19,03	2,0
F9_06	0,94	6,96	13,33	2,0	5,01	21,80	7,06	13,85	1,0
F9_09	0,80	6,97	13,46	2,0	4,97	13,99	9,09	22,60	3,0
F9_08	0,93	6,96	13,35	2,0	5,01	21,80	9,13	22,50	1,0
F9_11	0,88	6,98	13,43	2,0	7,02	21,8	7,08	22,6	1,0
F9_10	0,80	6,99	13,28	2,0	7,04	14,27	7,02	23,00	3,0
F9_13	0,86	6,95	13,29	2,0	5,05	13,99	9,09	13,88	1,0
F9_12	0,81	6,94	13,33	2,0	6,06	18,41	8,00	18,99	2,0
F9_15	1,07	6,95	13,41	2,0	5,05	13,93	7,00	13,90	3,0
F9_14	0,97	6,92	13,35	2,0	5,03	13,92	7,06	22,70	1,0
F9_17	0,96	6,94	13,21	2,0	5,04	21,81	9,07	13,86	3,0
F9_16	0,83	6,92	13,26	2,0	7,03	21,90	7,05	13,92	3,0
F9_18	0,88	7,01	13,48	2,0	7,00	22,00	9,11	13,92	1,0
F9_20	0,88	6,97	13,78	2,0	7,04	14,21	9,09	22,90	1,0
F9_19	0,83	7,00	13,34	2,0	5,02	21,90	7,06	22,90	3,0
F9_22	0,82	6,96	13,55	2,0	7,04	14,21	9,10	13,86	3,0
F9_21	0,85	6,97	13,87	2,0	7,02	14,14	7,02	13,97	1,0
F9_27	0,75	6,99	12,93	2,0	7,01	22,20	9,09	22,60	3,0

Tabla 2B: Visión general de parámetros de procedimiento sometidos a prueba en la etapa CPN incluyendo intervalos de pruebas para los experimentos de DOE

Nombre del experimento	Parámetros del procedimiento								
	Carga				Lavado 2		Elución		
	Carga	pH	Cond.	EDTA	pH	Cond.	pH	Cond.	Ca ⁺⁺
	mg/ml		mS/cm	mM		mS/cm		mS/cm	mM
F9_23	0,83	6,97	13,45	2,0	6,04	18,57	8,02	19,20	2,0
F9_28	0,88	6,99	12,83	2,0	6,06	18,69	8,11	19,23	1,0
F9_29	0,79	6,99	13,17	2,0	6,06	18,69	8,12	19,24	3,0
F9_30	0,95	6,96	13,32	2,0	5,03	18,51	7,99	19,23	2,0
F9_31	0,97	6,97	13,32	2,0	5,97	22	7,97	19,23	2,0
F9_32	1,05	6,98	13,54	2,0	7,00	19,02	7,99	19,23	2,0
F9_33	0,83	6,99	13,57	2,0	6,06	14,01	7,97	19,23	2,0
F9_34	0,83	6,99	13,05	2,0	6,05	18,67	6,96	19,70	2,0
F9_35	0,82	7,02	13,45	2,0	6,04	18,44	8,06	14,02	2,0
F9_36	0,76	6,97	13,20	2,0	6,05	18,67	9,13	18,42	2,0
F9_37	0,84	6,98	13,4	2,0	6,05	18,49	8,09	22,9	2,0
F9_38	0,98	7,00	12,68	2,0	6,05	18,67	8,05	18,85	0,5
F9_39	0,83	6,97	13,45	2,0	6,00	18,49	7,96	19,35	2,0
F9_40	0,79	6,98	13,26	2,0	5,98	18,56	8,03	19,85	6,0
F9_41	0,82	7,00	13,17	2,0	5,98	18,56	7,92	19,12	2,0

5 Solo se hizo posible un ajuste fino tras la investigación tal como la realizaron los presentes inventores que encontraron sorprendentemente que el intervalo de calcio 1-3 mM es particularmente adecuado y necesita combinarse con intervalos elegidos muy particularmente de conductividad y pH.

Ejemplo 2: Investigación adicional de productos de degradación de rFIX.

10 Métodos

• Se determinó la potencia de FIX con un procedimiento de coagulación de una etapa usando plasma agotado en FIX.

15 • Se determinó la potencia de FIX con un ensayo cromogénico que mide la actividad del formado con un método de evaluación cinética. FIX se convierte en FIXa mediante FXIa y trombina contenidos en el kit.

• Se analizó antígeno de FIX con un ELISA de tipo sándwich usando anticuerpos policlonales purificados por afinidad para el recubrimiento y la detección.

20 • Se determinó FIXa con un ensayo cromogénico que genera FXa en presencia de fosfolípidos, calcio y FVIII activado. FXa escinde el sustrato de péptido cromogénico y libera pNA que se mide a 405 nm.

• Se realizó SDS-PAGE usando geles al 12 % en condiciones reductoras. Se hizo análisis de inmunotransferencia de tipo Western de polipéptidos separados con IgG policlonales anti-FIX como anticuerpos primarios.

5 • Densitometría: Se digitalizó la inmunotransferencia de tipo Western recién desarrollada usando el instrumento Image Scanner III (GE Healthcare) y el software Labscan 6.0. Se realizó la densitometría con el paquete de software Image Quant TL (GE Healthcare). A lo largo de un eje vertical, se determinan la intensidad y anchura de la banda y el área bajo la curva se correlaciona con la cantidad de antígeno en las bandas. La suma de todas las bandas se fijó como el 100 %, las bandas individuales se expresan en porcentaje de la cantidad total.

10 Resultados

15 La eliminación de una especie de rFIX de longitud completa inactiva en la etapa de purificación por intercambio aniónico de captura se hizo posible trabajando en intervalos de parámetros específicos (datos no mostrados). Los resultados se reflejan por el cálculo de DOE, que se muestra en las figuras 1-2. Se hace evidente que los inventores han tenido éxito en la identificación de intervalos de parámetros para una concentración de calcio 1-3 mM para tanto la conductividad como el pH en la etapa de elución de la (“primera”) cromatografía de intercambio aniónico. Cuando se trabaja dentro de estos intervalos, los parámetros pueden adaptarse a la necesidad del procedimiento en cuestión, siempre que la elución funcione en el área sombreada tal como se muestra en estas figuras. Estas áreas son también tal como se define en las realizaciones preferidas en la parte general de esta invención anteriormente.

20 Por tanto, la presente invención proporciona intervalos de parámetros ventajosos como una contribución en la técnica para la provisión de una preparación de FIX que está esencialmente libre de FIX de longitud completa, inactivo.

25 La purificación por captura se realiza sobre una resina Q-Sepharose Fast Flow aplicando un lavado con alto contenido en sal a bajo pH y una elución de producto inducida por calcio a alto pH. El procedimiento de purificación tal como se aplica para la producción clínica de rFIX se explica resumidamente en la tabla 3, las formulaciones de tampón se resumen en la tabla 4.

30 Tabla 3: Esquema de purificación final para la captura de FIX sobre Q Sepharose Fast Flow

Etapa		Tampón	Cantidad	Velocidad de flujo
			CV	cm/h
1	Activación de la resina	QFF-activation	≥ 2,0	150
2	Equilibrado	QFF-Equi	≥ 4,0	150
3	Carga de muestra	CCS libre de células complementado con EDTA 2 mM	Aprox. 125 CV	150
3.1	Intervalo de carga		Carga de proteína: 0.4-2.0 mg de Ag de FIX/ml de resina	
4	Lavado 1	QFF-Equi	≥ 2,0	150
5	Lavado 2	QFF-Wash	≥ 5,0	100
6	Lavado 3	QFF-Equi	≥ 2,0	100
7	Elución	QFF elu	≥ 5,0	50
7.1	Recogida del conjunto		La recogida comienza como un aumento significativo de la pendiente de UV ₂₈₀ ≥ 0,2 UA (longitud de trayectoria óptica: 5 mm) y acaba tras 4,5 CV	

Las purificaciones cromatográficas se realizaron a 2 °C-8 °C a escala de laboratorio, la especificación para la producción de fase III clínica es de 2-15°.

Tabla 4: Composición de los tampones para la etapa de captura de Q-Sepharose

Id de tampón	Etapas	Composición	Conductividad [mS/cm] a 25 °C
QFF-act	Activación de la resina	NaCl 2000 mM	~ 160
QFF-Equi	Equilibrado, lavado 1, lavado 3	Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH=7,4 ± 0,1 a TA	1,5-2,5
QFF-wash	Lavado 2	MES 20 mM, NaCl 180 mM, EDTA 2 mM, pH=6,0 ± 0,1 a TA	16,5-21,5
QFF-Elu	Elución	Tris 20 mM, NaCl 180 mM, CaCl ₂ 2 mM,	17-22

		pH=8,0 ± 0,1 a TA	
Dis. madre de EDTA	Complementación con EDTA de la carga	EDTA 200 mM, pH=7,4 ± 0,1 a TA	30-35

Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western anti-FIX. Puede observarse en SDS-PAGE (resultados no mostrados) que se elimina una cantidad significativa de impurezas (HCP de CHO y proteínas FIX truncadas) durante el lavado de carga 2 o permanecen sobre la columna y se eluyen en la etapa de limpieza con alto contenido en sal. El producto se eluye con una alta pureza y homogeneidad durante la elución inducida por calcio a pH = 8,0. La posición de la forma truncada principal está presente principalmente en el lavado 2.

Fracción no retenida

En esta fracción, puede encontrarse una especie de FIX truncada principal con una masa molecular aproximada de 60 kDa y trazas de especies de rFIX con un peso molecular de 51 kDa. El FIX de longitud completa muestra una masa molecular aparente de aproximadamente 75 kDa en este sistema de gel. La cantidad de polipéptidos de rFIX truncados en esta fracción es muy baja y no pudo medirse coagulación o actividad cromogénica (datos no mostrados). Puede encontrarse aproximadamente el 1-1,5 % del antígeno total cargado en esta fracción de lavado según los datos de ELISA de antígenos, los análisis densitométricos indican que aproximadamente el 0,4-0,5 % de la proteína total cargada son especies de FIX truncadas encontradas en esta fracción.

Fracción de lavado 2

En esta fracción, se elimina por lavado de la columna una especie de FIX truncada con una masa molecular aproximada de 60 kDa. El FIX de longitud completa muestra una masa molecular aparente de aproximadamente 75 kDa en este sistema de gel. El polipéptido de rFIX truncado no tiene coagulación o actividad cromogénica. Los resultados de secuenciación N-terminal indicaron que el truncamiento debe estar en el extremo C-terminal y que los dominios de GLA N-terminales son incompletos. Aproximadamente el 6-8 % del antígeno total cargado puede encontrarse en esta fracción de lavado según los datos de ELISA de antígenos, los análisis densitométricos indican que aproximadamente el 15-16 % de la proteína total cargada son especies de FIX truncadas encontradas en esta fracción.

Ya que la cantidad de especies de FIX truncadas no está creciendo en comparación con la cosecha filtrada con las fracciones cromatográficas de la etapa de captura CPN, el truncamiento de rFIX sucede lo más probablemente durante la fermentación dentro de la célula o en el sobrenadante de cultivo celular mediante proteasas celulares aún sin identificar. La etapa CPN posterior no contribuye a ni aumenta el contenido de estas especies de rFIX truncadas.

Fracción de conjunto de eluatos

Los resultados de la SDS-PAGE indican que en el conjunto de eluatos se enriquece una especie de FIX de longitud completa y solo pueden detectarse trazas de especies de FIX truncadas. Las actividades específicas de FIX muestran que las actividades específicas son significativamente superiores en el conjunto de eluatos. El aumento en la actividad específica en el conjunto de eluatos se correlaciona con el hecho de que se eliminan cantidades significativas de especies de FIX inactivo en esta etapa de purificación durante el lavado 2 y la etapa de limpieza de la columna con alto contenido en sal. Aproximadamente el 61-72 % del antígeno de FIX detectado en la cosecha filtrada (= carga) mediante el método de ELISA se encuentra en el conjunto de eluatos de la etapa de purificación por captura CPN. Los análisis densitométricos indican que aproximadamente el 68-75 % del FIX total cargado sobre la etapa CPN se encuentra como rFIX de longitud completa en los conjuntos de eluatos, lo que se correlaciona con los datos de ELISA de FIX (datos no mostrados).

Fracción de limpieza con alto contenido en sal (tras el eluato)

En la fracción de limpieza con alto contenido en sal de la columna, puede detectarse una cantidad significativa de FIX de longitud completa inactivo. Aproximadamente el 23-28 % del antígeno de FIX total cargado puede encontrarse en esta fracción de limpieza de la columna según los datos de ELISA de antígenos, los análisis densitométricos indican que aproximadamente el 22-30 % del antígeno de FIX total cargado se encuentra como FIX inactivo de longitud completa en esta fracción.

Robustez de la eliminación de especies de FIX inactivo en la etapa CPN

Durante estudios de robustez a pequeña escala, se han investigado parámetros de procedimiento relevantes para las condiciones de elución.

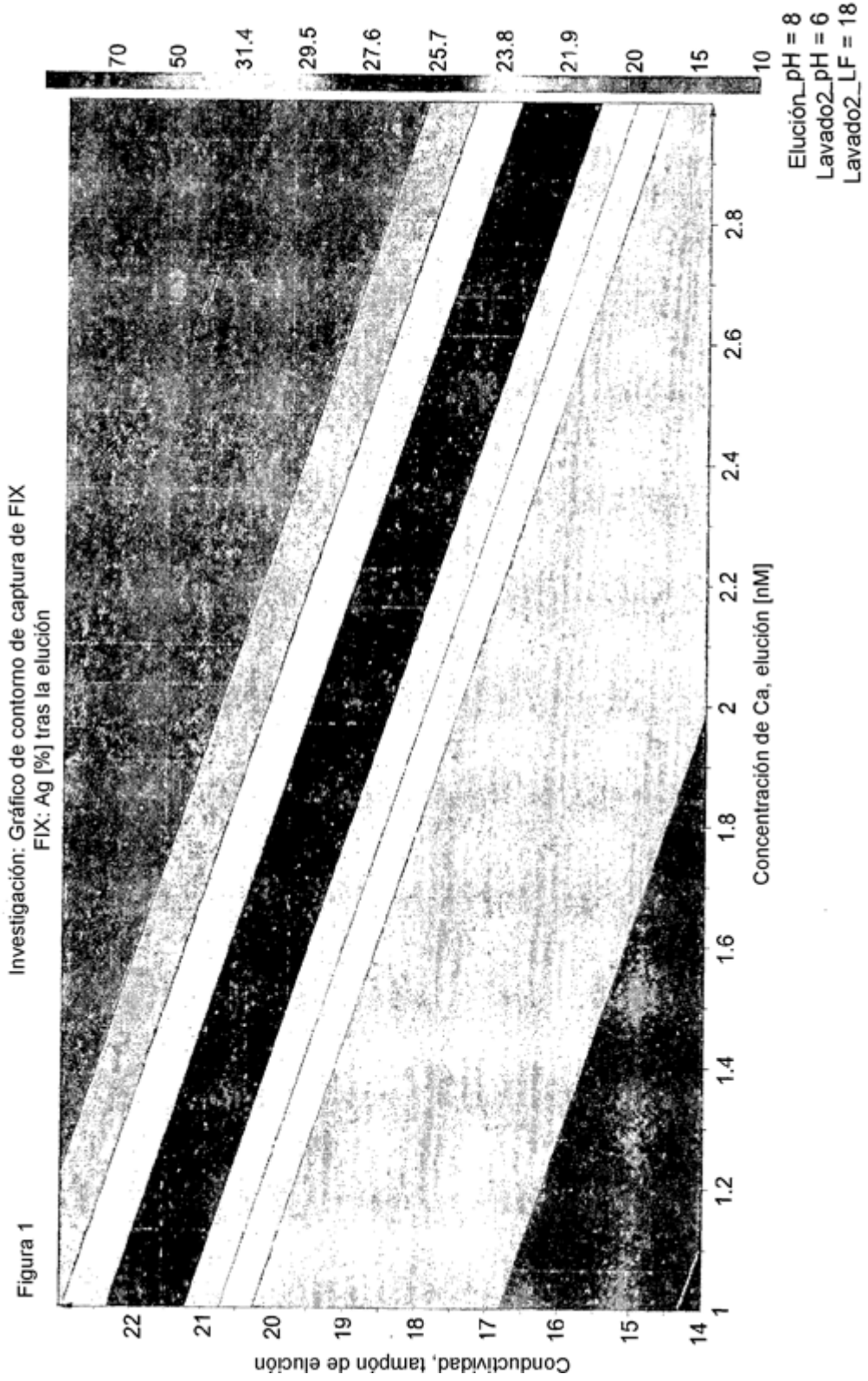
Para el tampón de elución, se investigaron los parámetros conductividad, pH y concentración de calcio en un estudio de DOE a pequeña escala. En las condiciones de elución de calcio 6 mM, parte del antígeno de FIX inactivo parece

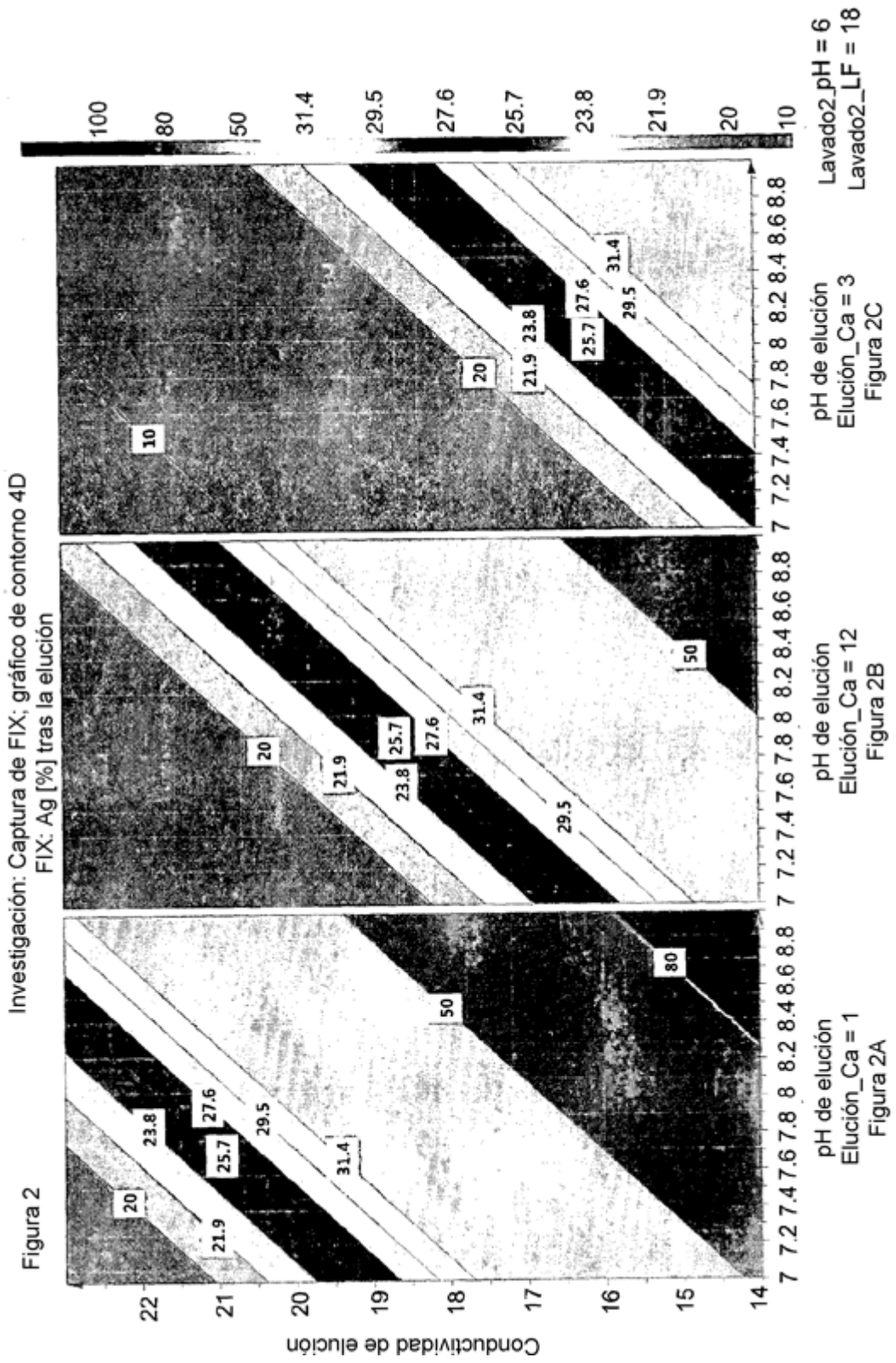
5 eluir conjuntamente con el producto y el antígeno de FIX en la fracción de limpieza con alto contenido en sal se reduce hasta el 5,9 %. En condiciones de una alta conductividad del tampón de elución, también parte del antígeno de FIX inactivo parece eluir conjuntamente con el producto y el antígeno de FIX en la fracción de limpieza de alto contenido en sal se reduce hasta el 16,4 %. En ambos casos, el conjunto de productos de FIX se contaminaría con un determinado porcentaje de FIX inactivo de longitud completa.

También se han realizado experimentos adicionales, en los que se ha usado FVII como proteína diana. Tras trabajar en los intervalos de parámetros descritos, pudo confirmarse la eliminación de proteína inactiva (datos no mostrados).

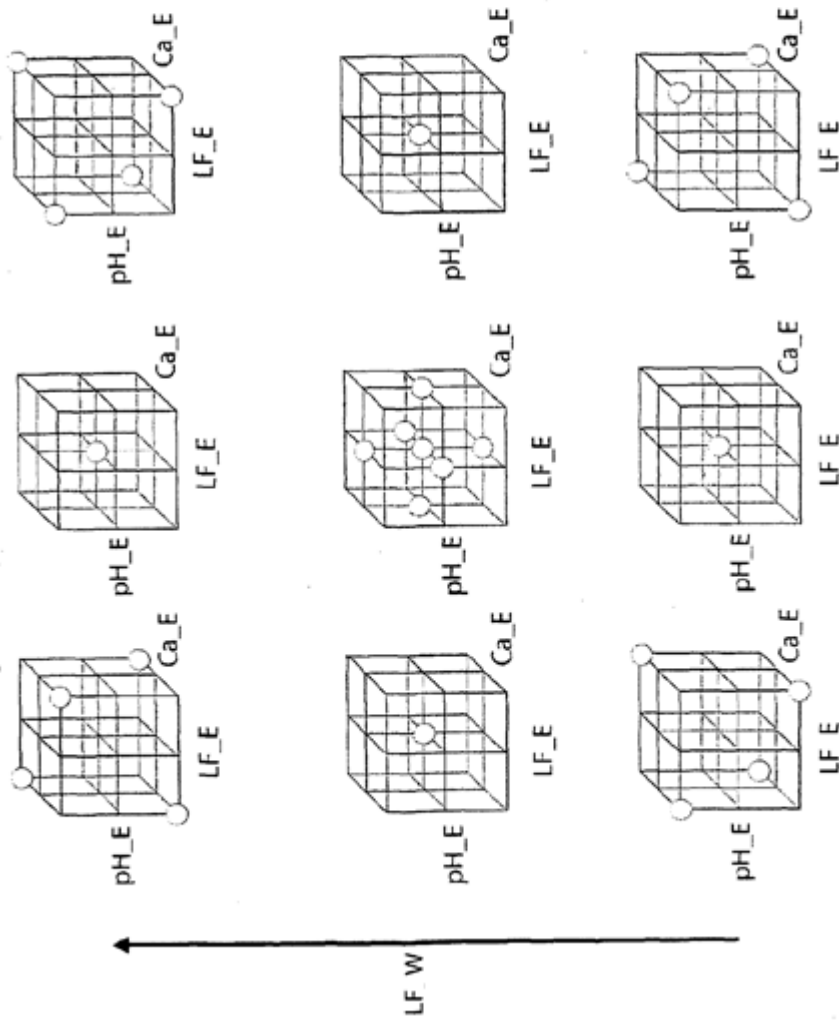
REIVINDICACIONES

1. Método para la separación de proteína dependiente de vitamina K inactiva de proteína dependiente de vitamina K activa en un método para la purificación de una proteína dependiente de vitamina K que comprende las etapas de:
- (a) cargar un material de resina de intercambio aniónico (a continuación también “el primer material de resina de intercambio aniónico”) con la proteína dependiente de vitamina K en un tampón de carga en ausencia o baja concentración de cationes divalentes, opcionalmente seguido por de una a tres etapas de lavado;
- (b) eluir la proteína dependiente de vitamina K con un eluyente que comprende calcio y un contraión para formar un eluato que contiene la proteína dependiente de vitamina K, en el que:
- está comprendido calcio 1-3 mM en el eluyente
 - el eluyente tiene una conductividad de 14 - 23 mS/cm (25 °C) y
 - el pH del eluyente es de entre 7,0 y 9,0, en el que la etapa (b) se selecciona del siguiente grupo:
 - la conductividad es de entre 18 y 20 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 -7,4 y Ca⁺⁺ 1 mM,
 - la conductividad es de entre 18,5 y 21 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca⁺⁺ 1 mM,
 - la conductividad es de entre 19 y 22,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,6 - 8,0 y Ca⁺⁺ 1 mM, o
 - la conductividad es de entre 20 y 23 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca⁺⁺ 1 mM,
 - la conductividad es de entre 15 y 17,0 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 - 7,4 y Ca⁺⁺ 2 mM,
 - la conductividad es de entre 16 y 18 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca⁺⁺ 2 mM,
 - la conductividad es de entre 19,5 y 22 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca⁺⁺ 2 mM,
 - la conductividad es de entre 14,0 y 15 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,0 - 7,4 y Ca⁺⁺ 3 mM,
 - la conductividad es de entre 15 y 15,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,4 - 7,6 y Ca⁺⁺ 3 mM,
 - la conductividad es de entre 14 y 16,5 mS/cm (25 °C) a un pH de 7,6 - 8,0 y Ca⁺⁺ 3 mM, o
 - la conductividad es de entre 15 y 19 mS/cm (25 °C) a un pH de 8,0 - 9,0 y Ca⁺⁺ 3 mM.
2. Método para la purificación según la reivindicación 1, que comprende además las siguientes etapas:
- (c) diluir el conjunto de eluatos obtenido, ((1) para disminuir opcionalmente la conductividad), y aumentar la concentración del calcio,
- (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato tal como se obtiene tras la etapa (c); y
- (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína dependiente de vitamina K.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que tras la etapa de cargar se realizan una o más etapas de lavado (1), (2) y/o (3) con un tampón de lavado (1), (2) y/o (3) en ausencia de un catión divalente pero en presencia de un contraión.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los materiales de resina de intercambio aniónico primero y segundo tienen cada uno un grupo cargado positivamente que se selecciona independientemente del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetilo (TMAE), polietilenimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína dependiente de vitamina K es una proteína de unión a catión divalente, preferiblemente una proteína de unión a calcio, y más preferido, se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C y proteína S.





Investigación: FIX_CPN:Äkta_DOE_CCF_Grafik
 Diseño: CCF



Lavado 2: pH: pH_W; conductividad:
 Con_W
 Elución: pH: pH_E; conductividad:
 Con_E; concentración de calcio
 Ca_E

Figura 3

MODDE9.1 - 2012-06-22 16:12:02 (UTC+1)