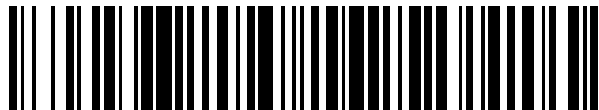


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 144**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2015 PCT/EP2015/051028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2015 E 15700725 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3097118**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de Factor VIII que tiene una relación mejorada de FVIII:C/FVIII:AG**

30 Prioridad:

20.01.2014 EP 14151769

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

31.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WINGE, STEFAN;
DADAIAN, MARINA;
JOHANSSON, ERICA y
FUCHS, BIRTE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 144 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de Factor VIII que tiene una relación mejorada de FVIII:C/FVIII:AG

La presente invención está relacionada con un procedimiento de fabricación de un Factor VIII que tiene una relación mejorada de FVIII:C/FVIII:Ag en el producto de Factor VIII usando cromatografía y un medicamento que comprende el producto que puede obtenerse por el procedimiento de la invención con un contenido monomérico de ≥ 98 %.

Antecedentes de la invención

La molécula de Factor VIII nativa está en condiciones normales en circulación en un complejo que tiene una cadena ligera (para FVIII tanto obtenido de plasma de longitud completa como con supresión del dominio B; 80 kDa) y una pesada (para Factor VIII obtenido de plasma o recombinante de longitud completa 200 kDa y para Factor VIII recombinante con supresión del dominio B 90 kDa). Las condiciones exactas de la asociación de la cadena pesada y la ligera no se conocen en detalle, pero algunos artículos sugieren la implicación de un enlace iónico metálico que junto con interacciones hidrófobas forma y mantiene unido el complejo. Se ha sugerido que diferentes iones metálicos toman parte en la interacción, incluyendo calcio, cobre, cinc, manganeso, etc.⁽¹⁾ Para un producto de Factor VIII con supresión del dominio B recientemente desarrollado, se ha indicado que la molécula contenía tres iones metálicos; calcio, cobre y cinc.⁽²⁾ Sin el enlace metálico las cadenas ligera y pesada de la molécula de Factor VIII solas no tienen actividad biológica pero sí aún actividad antigénica. Se ha publicado en varias publicaciones^(3, 4) que hay un riesgo *in vivo* de formación de inhibidores especialmente para la cadena ligera de Factor VIII. Por lo tanto, en el producto de Factor VIII inyectado en pacientes, deberían estar presentes cantidades tan bajas de cadena ligera y pesada individual como fuera posible, la relación de actividad de FVIII:C/FVIII:Ag debería ser cercana a 1,0 (uno)⁽⁵⁾, especialmente con respecto a la cadena ligera de Factor VIII.

En general, la agregación de proteínas es un factor de riesgo en un procedimiento de purificación no solo debido a pérdidas del producto deseado sino también con respecto a formación de inhibidor potencial⁽⁶⁾. En determinadas condiciones bioquímicas el Factor VIII recombinante puede agregarse^(7, 8) lo que dará como resultado una reducción significativa de su actividad biológica. Un producto de Factor VIII con Factor VIII agregado contendrá por lo tanto formas inactivas de Factor VIII con un contenido monomérico < 100 %. El contenido monomérico de un producto proteico farmacéutico debería ser cercano a 100 % con una cantidad tan baja como sea posible de formas inactivas de Factor VIII (agregados, fragmentos, etc.).

Se han descrito muchos procedimientos para purificación de Factor VIII de plasma o cultivos que producen de forma recombinante Factor VIII (rFVIII). Como ejemplo el documento WO 2009/156430 desvela una serie de etapas cromatográficas para purificación de Factor VIII, incluyendo una etapa de afinidad basada en Fab no obtenida de animal en la que el ligando de 13 kDalton se une con la cadena ligera de Factor VIII. Otras etapas cromatográficas mencionadas en la solicitud incluye resinas de modo mixto aniónicas y catiónicas, intercambio catiónico, intercambio aniónico y filtración en gel. No se proporciona información con respecto a la retirada de formas inactivas o el contenido de agregado de Factor VIII en esta solicitud de patente. En el artículo; Purification and characterization of a new recombinant Factor VIII⁽⁹⁾ se describe un procedimiento de purificación cromatográfica de cuatro etapas de Factor VIII incluyendo una etapa de afinidad con un anticuerpo monoclonal como ligando que se une con la cadena pesada de Factor VIII. Las otras tres etapas son una resina de cromatografía de modo mixto, una resina de intercambio aniónico y una etapa de filtración en gel, no se proporciona información con respecto a la retirada de formas inactivas o el contenido de agregado de Factor VIII en este artículo. En el artículo; Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of Factor VIII⁽¹⁰⁾, se describe un procedimiento de cromatografía de cinco etapas que incluye una etapa de afinidad basada en péptidos en la que el ligando de 2,7 kDalton se une con la cadena ligera de Factor VIII. Se describe que el exceso de cadena ligera de Factor VIII del procedimiento de cultivo se retira durante lavado de la resina de afinidad peptídica. Las otras cuatro etapas de cromatografía son resina de intercambio catiónico, resina de intercambio aniónico, resina de interacción hidrófoba y una etapa de filtración en gel. Se indica que dos etapas cromatográficas después de la resina de afinidad peptídica retiran el exceso de cadena ligera de Factor VIII, pero no se define adicionalmente en cuál de las etapas. No se proporciona información con respecto a la retirada de otras formas inactivas distintas de la cadena ligera de Factor VIII o el contenido de agregado de Factor VIII en este artículo. En el artículo; application for a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant Factor VIII compounds⁽¹¹⁾, se describe una resina de afinidad de ligando de 13 kDalton basado en Fab para purificación de Factor VIII, no se proporciona información con respecto a la retirada de formas inactivas o el contenido de agregado de Factor VIII en este artículo.

Como se describe en los artículos^{(5), (12)}, los productos de Factor VIII recombinantes disponibles comercialmente en el mercado contienen formas de Factor VIII inactivas, como se mide con la relación de Factor VIII biológicamente activo (Factor VIII:C) con respecto a la cantidad total de Factor VIII (Factor VIII:Ag), con un potencial de efectos negativos para los pacientes con respecto a reacciones inmunológicas.

El Factor VIII biológicamente activo se define como Factor VIII que tiene actividad de Factor VIII que en condiciones normales *in vivo* puede activarse a Factor VIIIa mediante reacciones enzimáticas, que es una parte esencial de la cascada de coagulación con la intención de detener hemorragias. Puede medirse el Factor VIII biológicamente activo con diferentes procedimientos analíticos *in vitro* (FVIII:C), por ejemplo ensayo cromogénico de FVIII y/o ensayo de

coagulación de un estadio.⁽¹³⁾ El ensayo cromogénico es un procedimiento fotométrico de dos estadios que mide la actividad biológica de Factor VIII como un cofactor. El Factor VIII activa el Factor X a Factor Xa, que a su vez se escinde enzimáticamente en un producto que puede cuantificarse de forma espectrofotométrica. El ensayo de coagulación de un estadio se basa en la capacidad de una muestra que contiene Factor VIII para corregir el tiempo de coagulación del plasma deficiente en Factor VIII en presencia de fosfolípido, activador de contacto e iones de calcio. El tiempo de aparición de un coágulo de fibrina se mide en una etapa.

El documento WO-A-2008/134310 desvela un procedimiento para estabilizar una solución a granel de proteína recombinante para almacenamiento congelado, que comprende proporcionar una solución parcialmente purificada de proteína recombinante que tiene una concentración de sal monovalente de al menos 100 nM y añadir un carbohidrato a dicha solución en una cantidad suficiente que, tras congelación, la solución tiene una temperatura de transición de vidrio de -56 °C o más.

El documento WO 2010/115866A1 desvela moléculas y polipéptidos que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos que tiene identidad significativa con (homología con) Factor VIII humano o parte o partes biológicamente activas del mismo, moléculas relacionadas (tales como ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos), composiciones (tales como formulaciones farmacéuticas) que comprenden tales polipéptidos y procedimientos para preparar y usar dichos polipéptidos.

El documento WO 97/33178A1 desvela un procedimiento para ensayar la idoneidad de fracciones proteicas que contienen Factor VIII, cuyo procesamiento adicional implica un estadio de pasteurización, implica ensayar el material de partida para fragmentos en el intervalo de 20-50 kD. Los fragmentos de Factor VIII en este intervalo dan lugar evidentemente a formaciones inhibitorias en pacientes previamente tratados con Factor VIII. Pueden usarse incluso lotes contaminados con estos fragmentos para producir Factor VIII sin virus muy puro aplicando cromatografía de exclusión por tamaño en materiales hidrófilos.

El documento US 4.675.385 A desvela un procedimiento rápido y sencillo para purificar Factor VIII de proteína procoagulante humana, bovina y porcina en una gran escala usando cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento secuencial en, en primer lugar, condiciones de baja concentración salina y, en segundo lugar, en condiciones de alta concentración salina de concentrado de Factor VIII:C (Factor VIII en complejo) comercial reconstituido. La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna cromatográfica de exclusión por tamaño de alto rendimiento con perlas porosas que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 micrómetros, diámetros de poro de aproximadamente 500 a aproximadamente 2000 Angstroms y un volumen de poro de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,8 ml por gramo. La primera separación cromatográfica se lleva a cabo en una solución acuosa tamponada usando la solución acuosa tamponada como un eluyente. Los constituyentes de bajo peso molecular (impurezas) se separan de Factor VIII y los constituyentes de alto peso molecular (impurezas). Puede llevarse a cabo una segunda separación cromatográfica después de haberse disociado el Factor VIII en una solución tamponada que tiene una concentración de ion de calcio de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,45 M. La segunda columna cromatográfica se empaqueta con algo de relleno como la primera columna y se eluye con una solución acuosa tamponada que contiene ion de calcio de 0,25 a 0,45 M. En una columna de 2,5x60 cm, pueden purificarse 4 g de concentrado de Factor VIII comercial en menos de dos horas. El procedimiento es susceptible de aumento de escala.

El documento EP 0 412 466 A2 desvela un procedimiento para la preparación de un concentrado de Factor VIII pasteurizado con alta actividad específica y estabilidad y comprende impurezas que se adsorben de la solución que contiene Factor VIII al menos mediante dos adsorciones usando $Al(OH)_3$, un intercambiador aniónico o $Ca_3(PO_4)_2$, preferentemente usando dos adsorbentes diferentes de este grupo.

El documento FR 2 650 393 A1 desvela la obtención de un concentrado de Factor VIII que tiene una actividad específica y un alto rendimiento, estando dicho concentrado exento de proteína ajena de origen no humano. Se deposita Factor VIII obtenido por cualquier procedimiento en una columna que contiene un gel de intercambio aniónico preequilibrado con un primer tampón. Después de haber cargado el Factor VIII en la columna, el gel se lava con un segundo tampón hasta que se obtiene una densidad óptica menor de 0,1. El Factor VIII purificado se libera después del gel con un tercer tampón. Después de la cromatografía, la actividad específica es de 30/1600 UI/mg.

Cheng, Elisabeth y col., desvela en *Biotechnology Letters*, v.32, n.9, p.1207-1214, 2010, que FVIII humano se purificó directamente del plasma usando cromatografía de intercambio aniónico seguido de filtración en gel. Se ensayaron tres resinas Q-Sepharose, dando como resultado 40 % de recuperación de la actividad de FVIII usando resina Q-Sepharose XL, aproximadamente 80 % usando Q-Sepharose Fast Flow y 70 % usando las Q-Sepharose Big Beads. Los factores de coagulación dependientes de vitamina K coeluyeron con FVIII de las columnas de intercambio aniónico. En la segunda etapa de purificación, cuando se usó Sepharose 6FF, se recuperó 70 % de la actividad de FVIII sin factores dependientes de vitamina K.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para reducir la cantidad de cadena ligera y pesada individual en un procedimiento de fabricación de Factor VIII y para proporcionar un producto de alto contenido

monomérico, en particular para Factor VIII producido de forma recombinante. Otro objeto de la invención es proporcionar un producto de Factor VIII, en el que se retiran esencialmente cadena ligera y pesada individual (fragmentos) y formas de Factor VIII agregadas y que el producto de Factor VIII monomérico esencial resultante pueda almacenarse en estado congelado y/o liofilizado durante varios años, manteniendo su contenido de Factor VIII monomérico alto.

Sorprendentemente los inventores de la presente invención han descubierto que un procedimiento para fabricar un producto de Factor VIII, que tiene una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,7 y un contenido monomérico alto en el producto de Factor FVIII usando cromatografía, es capaz de resolver el objeto que subyace a la invención. El procedimiento de la invención comprende un funcionamiento en el que se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una resina de cromatografía de afinidad que tiene una afinidad por la unión específica con el Factor VIII que se efectúa por un ligando de afinidad que se inmoviliza en la resina de cromatografía de afinidad, dicho ligando de afinidad es un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII, en el que

- se produce unión de Factor VIII con la resina de cromatografía de afinidad en condiciones de baja salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,1 - 0,5 mol/kg,
- lavado de la resina de cromatografía de afinidad en concentración salina aumentada en el intervalo de 0,3 - 4 mol/kg de cloruro sódico para la retirada de la cadena ligera, y
- elución y recogida de Factor VIII en una fracción separada empleando una concentración salina en el intervalo de 0,5 - 4 mol/kg de cloruro sódico en combinación con etilenglicol 40-60 %, y

en el que la carga de la resina de cromatografía de afinidad con Factor VIII biológicamente activo es de al menos 10.000 UI/ml de resina.

Dicho ligando de afinidad se une con la parte de cadena ligera de la molécula de FVIII. De forma sorprendente, en una solución que comprende una mezcla que contiene Factor VIII nativo formado por la cadena ligera y pesada de Factor VIII en complejo y la cadena ligera de FVIII individual sin ninguna actividad biológica de FVIII, la cadena ligera de FVIII sin ninguna actividad biológica de coagulación podría retirarse de la mezcla por procesamiento sobre dicha resina de afinidad empleando condiciones de lavado específicas. El experto en la materia esperaría que se retirara también una cantidad significativa de la molécula de Factor VIII nativa, es decir el complejo de cadena pesada y ligera.

Dicho ligando se inmoviliza en particular en una resina de cromatografía de afinidad mediante una rama espaciadora hidrófila, resina que es una matriz de base de agarosa reticulada, dicho ligando de afinidad es un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII y disponible en el mercado de GE Healthcare con el nombre comercial VIIISelect.

Según una realización de la invención, se realiza al menos una etapa cromatográfica en el procedimiento por medio del uso de al menos una etapa cromatográfica en una resina de cromatografía de intercambio aniónico, que da como resultado un contenido monomérico de Factor VIII alto.

En otra realización de la presente invención se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño en el procedimiento.

En otra realización de la invención, usando las mismas etapas de cromatografía que para la retirada de FVIII:C/FVIII:Ag, el contenido monomérico después del producto de Factor VIII es de ≥ 98 %.

En una realización adicional de la invención, la relación de FVIII:C/FVIII:Ag alta resultante y el contenido monomérico de FVIII: alto de una etapa de cromatografía previa puede almacenarse durante al menos 12 meses, preferentemente durante al menos 24 meses y más preferentemente durante al menos 36 meses en estado congelado y/o liofilizado, con propiedades sin cambios de FVIII:C/FVIII:Ag y/o un contenido monomérico de Factor VIII alto, hasta su uso por un paciente.

Si se combinan dos de los tres procedimientos cromatográficos, que se han nombrado anteriormente, es posible conseguir una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,8 y si se combinan los tres, entonces se hace posible una relación de al menos 0,9.

Por ejemplo una realización del procedimiento de la presente invención está representada por un procedimiento para fabricar un producto de Factor VIII, que tiene una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,7 y que proporciona un contenido monomérico de Factor VIII alto de ≥ 98 % y producto de Factor FVIII no agregado esencial usando cromatografía, en el que

etapa (a) se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una resina de cromatografía de afinidad que tiene una afinidad por la unión específica con el Factor VIII que se efectúa por un ligando de afinidad que se inmoviliza en la resina de cromatografía de afinidad, dicho ligando de afinidad es un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII con el procedimiento de la invención, y en el que

etapa (b) se realiza al menos una etapa cromatográfica en una resina de cromatografía de intercambio aniónico. El

orden de las etapas puede ser (b) después de (a) o (a) después de (b).

Según una realización de la invención también es posible realizar el siguiente procedimiento para fabricar un producto de Factor VIII, que tiene una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,7 y que proporciona un contenido monomérico de Factor VIII alto de ≥ 98 % y producto de Factor FVIII no agregado esencial usando cromatografía, en el que

etapa (a) se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una resina de cromatografía de afinidad que tiene una afinidad por la unión específica con el Factor VIII que se efectúa por un ligando de afinidad que se inmoviliza en la resina de cromatografía de afinidad, dicho ligando de afinidad es un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII con el procedimiento de la invención, y

en el que

etapa (c) se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. El orden de las etapas puede ser (c) después de (a) o (a) después de (c).

Una realización adicional más es la combinación de los tres procedimientos cromatográficos como se ha descrito anteriormente en el procedimiento de la invención. Por ejemplo el procedimiento de la presente invención está representado por un procedimiento para fabricar un producto de Factor VIII, que tiene una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,9 y que proporciona un contenido monomérico de Factor VIII alto de ≥ 99 % y producto de Factor FVIII no agregado esencial usando cromatografía, en el que

etapa (a) se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una resina de cromatografía de afinidad que tiene una afinidad por la unión específica con el Factor VIII que se efectúa por un ligando de afinidad que se inmoviliza en la resina de cromatografía de afinidad, dicho ligando de afinidad es un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII con el procedimiento de la invención, y

en el que

etapa (b) se realiza al menos una etapa cromatográfica en una resina de cromatografía de intercambio aniónico, y

en el que

etapa (c) se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. El orden de las etapas puede ser (a), (b), (c); (a), (c), (b); (c), (b), (a); (c), (a), (b); (b), (c), (a); (b), (a), (c).

Según la invención, la molécula de Factor VIII usada en los procedimientos de la invención es un complejo de una cadena ligera y una cadena pesada y la relación mejorada de FVIII:C/FVIII:Ag resulta del agotamiento de la cadena ligera de Factor VIII, la cadena pesada de Factor VIII y/o cadena ligera de Factor VIII/cadena pesada de Factor VIII disociadas del complejo. Las cadenas disociadas de Factor VIII pueden estar presentes originarias del procedimiento de producción de cultivo debido a mutaciones, degeneración proteolítica/física etc., o debido a degradación enzimática/física durante un procedimiento de purificación. La cadena ligera de FVIII y/o cadena pesada de FVIII disociadas formarán fragmentos de Factor VIII y/o agregados de Factor VIII dependiendo del ambiente, por ejemplo, tampón, concentración de proteínas, etc. Es por lo tanto ventajoso retirar todas las formas de Factor VIII que no son monoméricas y/o poseen el potencial de formar agregados más fácilmente que la forma nativa de Factor VIII.

Según otra realización de la invención, la molécula de Factor VIII usada en el procedimiento de la invención podría unirse de forma no covalente y/o covalente con otras sustancias, por ejemplo, vWF, PEG, HES y/o fragmentos F_c de anticuerpos, etc. para mejorar la prolongación de la semivida del producto de Factor VIII, llegando a la misma solución de la invención con alta relación de actividad biológica y alto contenido monomérico del producto final.

En una realización particular de la invención la etapa cromatográfica de afinidad se realiza en condiciones que posibilitan la unión de Factor VIII con la resina de afinidad y la retirada de la cadena ligera disociada por lavado, antes de eluirse el Factor VIII. La resina de afinidad se ha diseñado para unirse con la cadena ligera en lugar de otras partes de la molécula de Factor VIII. Esto se habilitó mediante el uso de un ligando de afinidad de un tamaño específico. Se sabe que ligandos de afinidad demasiado pequeños, por ejemplo moléculas sintetizadas químicas, debido a impedimento estérico en ocasiones tienen dificultades para unirse con la proteína diana. Por lo tanto el tamaño del ligando de afinidad necesario para la invención está en el intervalo de ≥ 10 kDalton. Debido a la fuerte afinidad esperada por una molécula de fragmento Fab de este tamaño⁽¹⁴⁾ y a que el ligando se dirige contra la cadena ligera de FVIII, de hecho, por lo tanto fue sorprendente que la cadena ligera de FVIII pudiera retirarse por lavado antes de eluir el complejo nativo que contiene la cadena pesada de FVIII junto con la cadena ligera de FVIII. En particular, la resina de afinidad se basa en una matriz de agarosa reticulada con un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 74 μm y que el ligando de afinidad del fragmento de anticuerpo F_{ab} obtenido de levadura de aproximadamente 13 kD, se une con la matriz mediante una rama espaciadora hidrófila para hacer al ligando más disponible para la unión con la molécula de Factor VIII. El ligando de afinidad se une con la cadena ligera de Factor VIII de la molécula de Factor VIII biológicamente activa.

En otra realización del procedimiento de la invención las condiciones cromatográficas de afinidad comprenden al menos dos de las siguientes condiciones;

- una carga de resina de Factor VIII biológicamente activo de más de 20.000 UI/ml de resina.
- Condiciones de tampón durante la carga de Factor VIII: NaCl aproximadamente 0,1- aproximadamente 0,5

mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p), Triton X-100 aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 %, TNBP aproximadamente 0,1- aproximadamente 1 % a pH 6,2-6,8

- 5 - Condiciones de tampón durante el lavado: NaCl aproximadamente 0,5- aproximadamente 4 mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p) a pH 6,2-6,8
- 10 - Condición de tampón durante la elución de Factor VIII: NaCl aproximadamente 0,5- aproximadamente 4 mol/kg, etilenglicol aproximadamente 40- aproximadamente 60 %, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p) a pH 6,2-6,8.

15 En otra realización particular del procedimiento de la invención la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en condiciones que proporcionen una unión de Factor VIII con la resina de cromatografía de intercambio aniónico y las formas biológicamente inactivas se retiran de la resina de cromatografía de intercambio aniónico antes o después de la elución de Factor VIII biológicamente activo. El contenido de monómero de Factor VIII en la fracción de elución es de ≥98 %. Según esta realización particular del procedimiento de la invención el Factor VIII se carga en condiciones de baja salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,01 - 0,15 mol/kg para unión de Factor VIII y se retiran formas inactivas de Factor VIII, la resina de cromatografía de intercambio aniónico se lava en condiciones de salinidad media equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,15 - 0,3 mol/kg para retirada de formas inactivas de Factor VIII y el Factor VIII se eluye de la resina de cromatografía de intercambio aniónico y se recoge en una fracción separada empleando condiciones de alta salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,3 - 1 mol/kg.

20 Se eluyen formas inactivas adicionales de Factor VIII de la resina de cromatografía de intercambio aniónico y se recogen en una fracción separada empleando condiciones de alta salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 1-2 mol/kg.

25 En una realización particular del procedimiento de la invención, el Factor VIII biológicamente inactivo se retira mediante la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, que da como resultado un contenido de monómeros de ≥98 % en la fracción de elución del producto, que comprende al menos dos de las siguientes condiciones cromatográficas:

- 30 - una carga de resina de Factor VIII biológicamente activo de al menos 10.000 UI/ml de resina, preferentemente al menos 15.000 UI/ml de resina y más preferentemente más de 20.000 UI/ml de resina;
- Condiciones de tampón durante la carga de Factor VIII: NaCl aproximadamente 0,05- aproximadamente 0,15 mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p) a pH 6,0-7,5;
- 35 - Condiciones de tampón durante el lavado: NaCl aproximadamente 0,15- aproximadamente 0,3 mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p) a pH 6,0-7,5;
- 40 - Condiciones de tampón durante la elución de Factor VIII; NaCl aproximadamente 0,3- aproximadamente 0,5 mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, L-histidina aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005- aproximadamente 0,05 % (p/p) a pH 6,0-7,5.

45 En una realización adicional del procedimiento de la invención, la resina de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico fuerte con un ion de amonio cuaternario como ligando acoplado a una matriz de agarosa 6 % reticulada con un diámetro esférico de aproximadamente 45- aproximadamente 165 μm, con una capacidad de unión a ion total de aproximadamente 0,18- aproximadamente 0,25 mmol/ml.

En otra realización particular del procedimiento de la invención la cromatografía de exclusión por tamaño comprende al menos dos de las siguientes condiciones cromatográficas:

- 50 - una carga de muestra de aproximadamente 4- aproximadamente 8 % del volumen de columna,
- una altura de columna de aproximadamente 60- aproximadamente 90 cm,
- una concentración de Factor VIII biológicamente activo en la carga de muestra de al menos 10.000 UI/ml, preferentemente al menos 15.000 UI/ml y más preferentemente más de 20.000 UI/ml,
- un tampón de equilibrado de columna para agregación de formas inactivas de Factor VIII; NaCl aproximadamente 0,2- aproximadamente 0,7 mol/kg, CaCl₂ aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, citrato sódico aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, sacarosa aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), L-arginina aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), Poloxámero 188 aproximadamente 0,1- aproximadamente 1 % (p/p) a pH 6,0-7,5,
- 55 en el que el Factor VIII biológicamente activo se recoge en la forma monomérica, mientras que el Factor VIII inactivo se encuentra en la fracción que contiene formas inactivas agregadas (podrían ser tanto fragmentos agregados (inactivos) como Factor VIII monomérico agregado (activo cuando es un monómero pero parcialmente inactivo cuando está agregado)) de un etapa de cromatografía de exclusión por tamaño y/o en la fracción que
- 60

- contiene formas fragmentadas de Factor VIII de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño y
- la recogida de monómero de Factor VIII comienza cuando se registra un máximo de absorbancia de aproximadamente 30- aproximadamente 40 mUA en la salida de la columna y se detiene cuando el máximo de absorbancia vuelve a aproximadamente 1- aproximadamente 40 mUA, relacionado con 2-3 veces la cantidad de aplicación de muestra.

En una realización particular del procedimiento de la invención, la resina de cromatografía de exclusión por tamaño es un medio de agarosa/dextrano reticulado esférico con un diámetro medio de aproximadamente 34 μm y un intervalo de separación óptimo entre 10.000 - 600.000 Dalton.

En otra realización particular del procedimiento de la invención el eluato de cromatografía de exclusión por tamaño es estable durante al menos 12 meses, en particular 36 meses comprende al menos dos de las siguientes condiciones:

- Una composición de tampón que comprende; NaCl aproximadamente 0,2- aproximadamente 0,7 mol/kg, CaCl_2 aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, citrato sódico aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, sacarosa aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), L-arginina aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), Poloxámero 188 aproximadamente 0,1- aproximadamente 1 % (p/p) a pH 6,0-7,5,
- Una solución congelada almacenada a ≤ -60 °C,
- La congelación de la solución desde temperatura ambiente hasta ≤ -40 °C se realiza en ≤ 90 minutos.
- La solución congelada según el almacenamiento a ≤ -60 °C, se descongela hasta 18-25 °C a ≤ 90 minutos.
- La solución descongelada se aplica a un procedimiento de liofilización después de ajuste de la concentración de Factor VIII con el tampón anteriormente mencionado y se carga en viales de vidrio a 250 UI, 500 UI, 1000 UI, 2000 UI, 3000 UI, 4000 UI o 5000 UI de Factor VIII por vial.
- El producto liofilizado según lo anterior en el que el contenido de monómero de Factor VIII es ≥ 99 %.
- El producto liofilizado según lo anterior que puede almacenarse al menos 12 meses, preferentemente 24 meses y más preferentemente 36 meses, sin cambios significativos en el monómero de Factor VIII después de reconstitución y uso por el paciente.
- El producto reconstituido de lo anterior que tiene una composición de tampón de; NaCl aproximadamente 0,2- aproximadamente 0,7 mol/kg, CaCl_2 aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, citrato sódico aproximadamente 0,01- aproximadamente 0,05 mol/kg, sacarosa aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), L-arginina aproximadamente 0,5- aproximadamente 2 % (p/p), Poloxámero 188 aproximadamente 0,1- aproximadamente 1 % (p/p) a pH 6,0-7,5

También es materia objeto de la presente invención un producto de Factor VIII que puede obtenerse según el procedimiento de la invención para su uso en el tratamiento de la hemofilia y evitando la formación de inhibidores cuyo producto es estable en condición congelada o liofilizada durante al menos 6 meses, preferentemente durante al menos 12 meses, más preferentemente durante al menos 24 meses y más preferentemente hasta 36 meses.

En una realización de la invención este Factor VIII puede obtenerse por el procedimiento particular de pasar las tres etapas de purificación descritas anteriormente, 1. etapa de afinidad, 2. etapa de intercambio aniónico, 3. etapa de cromatografía de exclusión por tamaño en ese orden.

Proporcionando este orden de esquema de purificación la calidad del producto de FVIII resultante con respecto a alta relación de C/Ag de FVIII y alto contenido monomérico (igual a agregado y fragmentos bajos) se comparó con productos de FVIII recombinantes en el mercado usando esquemas de purificación diferentes⁽²²⁾. El producto de Factor VIII de la presente invención mostró resultados superiores con respecto a alta relación de Factor VIII C/Ag y alto contenido de monómeros y bajo contenido de fragmentos, como se puede ver en la Tabla 1. En una comparación adicional *in vivo* entre el producto de la invención y un producto recombinante en el mercado, podrían observarse cantidades reducidas de incidentes inhibidores en enfermos de hemofilia A previamente no tratados, como se puede ver en la Tabla 2. El producto de rFVIII usando el procedimiento de purificación A⁽²²⁾ de la Tabla 2 no tiene la misma alta capacidad para aumentar la relación C/Ag de FVIII y para revelar un producto con alto contenido monomérico y bajo contenido de fragmentos, que el procedimiento de purificación de la invención, que aparentemente afecta a la cantidad de incidentes inmunológicos en enfermos de hemofilia A previamente no tratados.

Tabla 1

	FVIII/ vial, UI	FVIII:C, UI/ml	FVIII:Ag, UI/ml	C/Ag	SEC-HPLC2, %		
					Agregado	Monómero	Fragmento
rFVIII acc. a proc. pur. A	250	95	132	0,72	0	76	24

(continuación)

	FVIII/ vial, UI	FVIII:C, UI/ml	FVIII:Ag, UI/ml	C/Ag	SEC-HPLC2, %		
					Agregado	Monómero	Fragmento
rFVIII acc. a proc. pur. A	1000	441	573	0,77	0	76	24
rFVIII acc. a proc. pur. A	3000	638	925	0,69	0	76	24
rFVIII acc. a proc. pur. B	1000	242	263	0,92	0	99	1
rFVIII acc. a proc. pur. C	500	104	130	0,8	0	77	23
rFVIII acc. a proc. pur. C	1000	205	270	0,76	0	80	20
rFVIII acc. a proc. pur. C	3000	600	732	0,82	0	77	23
rFVIII acc. a proc. pur. de inv.	250	119	131	0,91	0	100	0
rFVIII acc. a proc. pur. de inv.	1000	494	531	0,93	0	100	0

Tabla 2

	FVIII/ vial, UI	FVIII: C, UI/ml	FVIII: Ag, UI/ml	C/Ag	SEC-HPLC2, %			Inhibidores de pacientes no tratados previamente (PNT), % (n=cantidad de pacientes)
					Agregado	Monómero	Fragmento	
rFVIII acc. a proc. pur. A	250	95	132	0,72	0	76	24	35,2 (128)*
rFVIII acc. a proc. pur. A	1000	441	573	0,77	0	76	24	
rFVIII acc. a proc. pur. A	3000	638	925	0,69	0	76	24	
rFVIII acc. a invención	250	119	131	0,91	0	100	0	11,6 (43)**
rFVIII acc. a invención	1000	494	531	0,93	0	100	0	

*Estudio publicado Collins2014²¹, **Estudio en curso

- 5 En otra realización de la presente invención el rendimiento del producto de la presente invención mejora en comparación con el documento EP2537862A1. Esto se consigue especialmente mediante el procedimiento particular de pasar las tres etapas de purificación anteriormente descritas, 1. etapa de afinidad, 2. etapa de intercambio aniónico, 3. etapa de cromatografía de exclusión por tamaño en ese orden. Además comprende las condiciones de procedimiento específicas de las etapas de exclusión por tamaño de la invención que aseguran la alta relación de Factor VIII C/Ag (>0,9) y contenido de monómero (>99 %) necesarios en los pacientes. Esto se consigue también después de almacenamiento a -70 °C durante 12 meses cuando el Factor VIII se almacena usando las condiciones de tampón específicas de la invención, que son proporcionadas por la última etapa de intercambio de tampón de exclusión por tamaño y liofilización del producto. Esto parece minimizar la relación de Factor VIII C/Ag desfavorable y una reducción del contenido de monómero durante el periodo de almacenamiento, lo que asegura que el producto proporcionado a los pacientes tenga un riesgo reducido para reacciones inmunológicas indeseadas debido al
- 10
- 15

agregado/fragmento en la solución que se inyecta en los pacientes (después de reconstitución del producto liofilizado almacenado). Asimismo, la actividad específica como se mide con la concentración de FVIII:C/proteína usando el procedimiento analítico de Bradford es estadísticamente significativamente mayor (10000 UI/mg, n=9) en comparación con el valor desvelado en el documento EP2537862A1 (8061 UI/mg, n=1). La actividad específica es una indicación de la pureza del producto de FVIII (se sabe que diferentes procedimientos de medición de proteínas proporcionan resultados diferentes, por lo tanto es necesario el mismo procedimiento de proteínas para valores comparables) que indica el rendimiento superior del producto de la invención en comparación con el documento EP2537862A1, ya que las impurezas proteicas son un factor de riesgo para incidentes inhibidores en pacientes. Además, el análisis de identificación de proteínas por isoelectroenfoque como se revela en el documento EP2537862A1 y puede encontrarse en la Figura 17 en la invención indica la diferencia en las propiedades de producto del producto respectivo.

En una realización particular de la invención el Factor VIII se caracteriza por que el cociente de Factor VIII biológicamente activo (FVIII:C) en relación con la cantidad total de Factor VIII (FVIII:Ag) es $>0,7$, preferentemente $\geq 0,8$, más preferentemente $\geq 0,9$ y más preferentemente 1, y el contenido de monómero de Factor VIII es de $\geq 98\%$, preferentemente, $\geq 99\%$ y más preferentemente 100 % después de la última etapa y puede detectarse ese Factor VIII esencial no agregado.

En otra realización de la invención el Factor VIII mantiene su actividad biológica, alto contenido de Factor VIII monomérico y bajo contenido de Factor VIII agregado/fragmentado.

En otra realización más el Factor VIII de la invención se caracteriza por que se obtiene de plasma, se obtiene por recombinación y/o se obtiene por supresión o es una forma truncada de Factor VIII con actividad biológica, en particular FVIII con supresión del dominio B, tal como se describe en ²⁰.

En otra realización más de la invención el Factor VIII se caracteriza por que en caso de que se obtenga de forma recombinante y/o se obtenga por supresión se produce en células humanas.

En una realización particular de la invención el Factor VIII se caracteriza por que la cantidad de inhibidores en enfermos de hemofilia A previamente tratados o no tratados, tratados con el producto, es 25 %, preferentemente $<20\%$, más preferentemente $<10\%$ y preferentemente 0 %.

También es materia objeto de la invención un producto de Factor VIII que puede obtenerse según el procedimiento de la invención para su uso en el tratamiento de la hemofilia y evitando la formación de inhibidores.

En particular, el producto según la invención muestra una cantidad de inhibidores en enfermos de hemofilia A previamente tratados o no tratados después de tratamiento con el producto de la invención de $<$ aproximadamente 25 %, preferentemente $<$ aproximadamente 20 %, más preferentemente $<$ aproximadamente 10 % y más preferentemente aproximadamente 0 %.

Se recomiendan criol/lioprotectores para proteger la proteína durante el procedimiento de liofilización y durante el almacenamiento, formando una matriz amorfa que rodea la proteína.

Puede incluirse un agente formador de volumen para actuar como un formador de pastilla para proporcionar apoyo mecánico durante la liofilización y para aumentar el peso seco del producto farmacológico. El agente formador de volumen contribuye por lo tanto a proporcionar una calidad y apariencia uniformes de un producto liofilizado.

Asimismo, puede añadirse un agente tamponante para mantener el pH hasta un valor adecuado para la proteína y para uso terapéutico del producto. Se desvelan ingrediente adecuados para proteínas liofilizadas por ejemplo en el documento WO2010/026186 A.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Transferencia de Western usando anticuerpos de FVIII. Desde el patrón de peso molecular izquierdo, Carril 1; Etapa de afinidad de material de partida, FVIII:Ag 5,0 UI/ml, Carril 2; etapa de afinidad de flujo continuo, FVIII:Ag 132 UI/ml, Carril 3; fracción de lavado de afinidad, FVIII:Ag 26 UI/ml, Carril 4; eluato de afinidad (material de partida Q), FVIII:Ag 5,8 UI/ml, Carril 5; flujo continuo de intercambio aniónico+eq., FVIII:Ag 1,7 UI/ml, Carril 6; lavado de intercambio aniónico, FVIII:Ag 5,0 UI/ml. La Figura 1 muestra la retirada de FVIII:C inactivo en el flujo continuo y fracciones de lavado de la etapa de afinidad y la etapa de intercambio aniónico. La fracción de lavado de la etapa de afinidad contiene casi solamente cadena ligera de FVIII.

Figura 2: Transferencia de Western usando anticuerpos de FVIII. Desde el patrón de peso molecular izquierdo, Carril 1; control de FVIII, FVIII:C 5,0 UI/ml, Carril 2; Eluato de afinidad, FVIII:C 5 UI/ml, Carril 3; eluato de afinidad diluido, FVIII:C 5 UI/ml, Carril 4; eluato de intercambio aniónico, FVIII:C 5 UI/ml, Carril 5; Eluato de exclusión por tamaño, FVIII:C 5 UI/ml. La Figura 2 muestra el patrón de transferencia de Western de FVIII a concentración de FVIII:C igual después de la etapa de afinidad, después de la etapa de intercambio aniónico y después de la etapa de exclusión por tamaño, que muestran todas el mismo patrón que el control de FVIII.

Figura 3: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño preparatoria según el ejemplo 3, que muestra la separación de agregados y fragmento de Factor VIII monomérico para 3 experimentos diferentes usando diferente carga de resina y concentración de Factor VIII. El sistema de tampón de equilibrado y las condiciones de cromatografía según el ejemplo 3 facilitan la agregación y por lo tanto la retirada de agregados de Factor VIII monomérico (eluación). Los máximos de cromatografía reflejan proteínas medidas a una absorbancia a 280 nm.

Figura 4: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra (elución) preparada según el ejemplo 2 y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % con <0,5 % de agregado y <1,5 % de fragmentos.

5 Figura 5: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra (elución) preparada según el ejemplo 3 y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es típicamente >99 % sin ninguna cantidad visible de agregados y <1 % de fragmentos.

10 Figura 6: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño preparatoria según el ejemplo 4, que muestra la separación de agregados y fragmento de Factor VIII monomérico para 5 experimentos diferentes usando diferente carga de resina y concentración de Factor VIII. El sistema de tampón de equilibrado y las condiciones de cromatografía según el ejemplo 4 facilitan la agregación y por lo tanto la retirada de agregados de Factor VIII monomérico (elución). Los máximos de cromatografía reflejan proteínas medidas a una absorbancia a 280 nm.

15 Figura 7: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de intercambio aniónico) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >97 % con <0,7 % de agregados y <2,5 % de fragmentos.

20 Figura 8: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de exclusión por tamaño) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <2 % de fragmentos.

25 Figura 9: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de intercambio aniónico) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <2 % de fragmentos.

30 Figura 10: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de exclusión por tamaño) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <2 % de fragmentos.

Figura 11: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (elución de intercambio aniónico) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <1,5 % de fragmentos.

35 Figura 12: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de exclusión por tamaño) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <1,5 % de fragmentos.

40 Figura 13: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de intercambio aniónico) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >99 % sin señales visibles de agregados y <1,5 % de fragmentos.

45 Figura 14: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de exclusión por tamaño) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <1,5 % de fragmentos.

50 Figura 15: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de intercambio aniónico) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >99 % sin señales visibles de agregados y <1 % de fragmentos.

Figura 16: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC1) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 4 (eluato de exclusión por tamaño) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje. El contenido de monómero de esta muestra es >98 % sin señales visibles de agregados y <1,5 % de fragmentos.

55 Figura 17: Identificación de electroforesis bidimensional analítica (2D-PAGE) de perfil de carga y tamaño de una

muestra procesada según la muestra del ejemplo 4 de la invención después de la cromatografía de exclusión por tamaño.

Figura 18: Aumento de la pureza de Factor VIII durante los procedimientos de purificación de la invención.

Figura 19: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC2) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el ejemplo 7 (purificada y liofilizada según la invención) y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje después de reconstitución del producto liofilizado (vial de 1000 UI). El contenido de monómero de esta muestra es en principio 100 % (el pequeño hombro a la izquierda del máximo de monómero está, basándose en la curva de conservación de patrón de peso molecular (Figura 23), incluido en el máximo de monómero de FVIII) y eluye a aproximadamente 7-10 minutos en el cromatograma de SEC-HPLC2, sin señales visibles de agregados y fragmentos.

Figura 20: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC2) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el procedimiento de purificación A²² y liofilizada y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje después de reconstitución del producto liofilizado (vial de 1000 UI). El contenido de monómero de esta muestra es aproximadamente 76 % sin señales visibles de agregados y aproximadamente 24 % de fragmentos. El producto de rFVIII es un producto de FVIII de longitud completa con dominio B intacto con un peso molecular aproximado de 300 kD, que proporciona una elución de FVIII monomérico en el cromatograma de SEC-HPLC2 a aproximadamente 5-8 minutos. El máximo de fragmento se calcula comenzando directamente después del máximo de monómero a aproximadamente 8 - 13 minutos.

Figura 21: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC2) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el procedimiento de purificación B²² y liofilizada y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje después de reconstitución del producto liofilizado (vial de 1000 UI). El contenido de monómero de esta muestra es aproximadamente 99 % (el pequeño hombro a la izquierda del máximo de monómero está, basándose en la curva de conservación de patrón de peso molecular (Figura 23), incluido en el máximo de monómero de FVIII) sin señales visibles de agregados y aproximadamente 1 % de fragmentos. El producto de rFVIII es un producto de FVIII con supresión del dominio B con un peso molecular aproximado de 170 kD, que proporciona una elución de FVIII monomérico en el cromatograma de SEC-HPLC2 a aproximadamente 7-10,5 minutos. El máximo de fragmento se calcula comenzando directamente después del máximo de monómero a aproximadamente 10,5 - 13 minutos.

Figura 22: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC2) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra preparada según el procedimiento de purificación C²² y liofilizada y su contenido de agregado, monómero y fragmento respectivo en porcentaje después de reconstitución del producto liofilizado (vial de 1000 UI). El contenido de monómero de esta muestra es aproximadamente 80 % sin señales visibles de agregados y aproximadamente 20 % de fragmentos. El producto de rFVIII es un producto de FVIII de longitud completa con dominio B intacto con un peso molecular aproximado de 300 kD, que proporciona una elución de FVIII monomérico en el cromatograma de SEC-HPLC2 a aproximadamente 5-8 minutos. El máximo de fragmento se calcula comenzando directamente después del máximo de monómero a aproximadamente 8 - 13 minutos.

Figura 23: Un cromatograma de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (SEC-HPLC2) que muestra el perfil cromatográfico de una muestra de patrón de peso molecular (15-600 kD, 69385, Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

La expresión "forma de Factor VIII biológicamente inactivo" según la invención significa una forma de Factor VIII que ha perdido su actividad biológica debido a causas químicas, bioquímicas o enzimáticas. El Factor VIII biológicamente inactivo puede ser, por ejemplo, una única cadena ligera o pesada de Factor VIII, forma truncada de Factor VIII o forma activada (pero inestable, como se define por activación en el ciclo de coagulación) de Factor VIII (tal como FVIIIa) y/o formas agregadas o adicionales de Factor VIII fragmentado.

La definición de mol/kg usada en la solicitud es: cantidad de mol añadida a 1.000 g de agua. La definición de Molar es: cantidad de mol añadida a 1.000 ml de agua.

La cantidad total de Factor VIII biológicamente tanto activo como inactivo en una muestra se mide con un procedimiento analítico de ELISA basado en antígeno de (FVIII:Ag). La relación entre contenido de Factor VIII biológicamente activo (FVIII:C) y antígeno de Factor VIII (FVIII:Ag) en una muestra con actividad biológica completa (como *in vivo*) debería ser igual a 1,0. Si la relación es menor de 1, esto es un indicio de que hay formas inactivas de Factor VIII en la muestra. Las formas inactivas podrían ser Factor VIII agregado y/o una molécula de Factor VIII que se ha disociado en su cadena ligera y pesada de Factor VIII individual.

La cadena ligera de FVIII (dominio A3, C1 y C2 de Factor VIII, con un peso molecular de aproximadamente 80 kD) es, en la molécula de Factor VIII biológicamente activo, un complejo metálico/hidrófobo con la cadena pesada de

FVIII (dominio A1 y A2 de Factor VIII, con un peso molecular de 90-210 kD). Este complejo es la molécula de Factor VIII *in vivo* nativa que en condiciones normales circula unida a factor de von Willebrandt (vWF) que protege de la degeneración. Cuando el sistema de coagulación se activa, la molécula de Factor VIII nativa se libera de vWF y se une con plaquetas activadas y se hace proteolítica en FVIIIa (Factor VIII activado), que es la forma activa de la molécula de FVIII nativa, una parte importante del sistema de coagulación. La molécula de FVIIIa se consume rápido por la cascada de coagulación y a continuación se inactiva enzimáticamente por inhibidores de proteasa diferentes.⁽¹⁵⁾ Si el complejo se disocia⁽¹⁶⁾, la cadena ligera o la cadena pesada no tiene o tiene poca actividad biológica y la relación FVIII:C/FVIII:Ag es cercana a cero. Si el complejo nativo está proteolíticamente inactivado, el peso molecular de la cadena tanto ligera como pesada se reducirá, los productos de degradación de Factor VIII tienen inicialmente una actividad biológica restante (por ejemplo FVIIIa) pero son inestables y se inactivarán relativamente rápido *in vivo*.⁽¹⁾ Los productos de degradación de Factor VIII (tanto proteolíticamente degradados como no proteolíticos disociados) pueden detectarse con el procedimiento analítico de transferencia de Western de Factor VIII que muestra específicamente moléculas de Factor VIII biológicamente activas e inactivas basándose en el tamaño. La molécula de Factor VIII nativo tiene un peso molecular de aproximadamente 170 kDalton o 290 kDalton dependiendo de si la molécula tiene supresión del dominio B o no. El dominio B no tiene función biológicamente activa en la molécula de Factor VIII, por lo tanto, una molécula de Factor VIII biológicamente activa puede tener o carecer del dominio B (o carecer de parte de él).

Un producto monomérico de Factor VIII se define en el presente documento como una molécula de Factor VIII biológicamente activa que tiene el mismo peso molecular definido por un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño HPLC analítico realizado en condiciones de tampón nativo. Las formas de Factor VIII fragmentadas son principalmente inactivas mientras que las formas de Factor VIII agregadas tienen actividad biológica reducida. Ambas formas ejercen un riesgo teórico aumentado de formación de inhibidor *in vivo* y deberían ser tan bajas como sea posible en un producto de Factor VIII dirigido a tratamiento de la hemofilia A. El producto de Factor VIII monomérico debería ser tan alto como sea posible al final del procedimiento de purificación y también ser estable antes (estado congelado) del procesamiento farmacéutico del producto de Factor VIII y en el procesamiento farmacéutico actual (lío-filizando o llenando viales con solución líquida) hasta que se reconstituya y sea consumido por los pacientes. Este periodo de tiempo puede ser con frecuencia de varios meses hasta 1-3 años. Un ejemplo de estabilidad en solución congelada de Factor VIII se proporciona en el documento US 8.187.799 B2 en el que se reivindican composiciones de tampón específicas, sin embargo, el contenido de agregado/monómero de Factor VIII no se analiza en esa referencia.

Según una realización de la invención, el Factor VIII recombinante es en particular un derivado por supresión que carece completa o parcialmente del dominio B, proporcionando de este modo una actividad específica que puede superar ampliamente 5.000 UI/mg en el producto purificado final. Se desvelan ejemplos de dichos derivados por supresión que carecen completa o parcialmente de sus dominios B y se preparan en los documentos EP-A-1136553 y EP-A-1739179 de líneas celulares humanas. Se aprecia que las composiciones de la presente invención, como se describen en la siguiente sección, están especialmente bien adaptadas para aplicarse a dichos derivados por supresión de Factor VIII u otros productos de Factor VIII de pureza alta similar.

Descripción detallada de la invención

Descripción detallada de la etapa de cromatografía de afinidad de Factor VIII

El Factor VIII se une a la columna de cromatografía de afinidad de Factor VIII (VIIISelect) en condiciones de tampón de equilibrado (NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,4-6,6, conductividad 30-36 mS/cm) con o sin productos químicos detergentes del disolvente (Triton X-100 1 % + tri-n butil fosfato 0,3 %), que puede aplicarse a la solución de Factor VIII antes de la etapa de afinidad para fines de inactivación de virus (con envoltura lipídica). También pueden estar presentes otros productos químicos de la purificación de Factor VIII corriente arriba en la solución de carga de Factor VIII, tales como sorbitol 0,2 mol/kg y arginina 0,045 mol/kg que pueden añadirse para fines de estabilización de Factor VIII. Normalmente, la carga de Factor VIII es de aproximadamente 10.000 - aproximadamente 25.000 UI/ml de resina de afinidad y en principio cualquier pureza (1-15.000 UI de Factor VIII/mg de proteína) de la solución de Factor VIII podría aplicarse a la columna de afinidad. El procedimiento se realiza a temperatura ambiente, por ejemplo temperatura de la habitación.

Después de procesarse la solución que contiene Factor VIII sobre la columna, la columna se aclara con 15 volúmenes de columna del tampón de equilibrado (NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,4-6,6, conductividad 30-36 mS/cm) para retirar impurezas (relacionadas tanto con el producto como con el procedimiento). Seguido de un lavado con 5 volúmenes de columna con concentración salina aumentada (NaCl 1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,4-6,6, conductividad 83-89 mS/cm) para retirar específicamente cadena ligera de FVIII individual. El Factor VIII biológicamente activo se eluye a continuación de la columna usando 4 volúmenes de columna de un tampón con concentración salina aumentada y etilenglicol (NaCl 1,5 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, etilenglicol 50 % (p/p), Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,4-6,6, conductividad 36-42 mS/cm).

Las proteínas restantes unidas a la resina de afinidad se retiran a continuación por un lavado ácido (pH 2), después de lo cual la resina, después del equilibrado, está lista para otro ciclo de purificación.

Descripción detallada de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico

El Factor VIII se une a una columna de cromatografía de intercambio aniónico fuerte (Q Sepharose FF) en condiciones de tampón de equilibrado (NaCl 0,1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 7,4-7,6, conductividad 12-16 mS/cm). También pueden estar presentes otros productos químicos de la purificación de Factor VIII corriente arriba en la solución de carga de Factor VIII, tales como etilenglicol 5 %. Típicamente la carga de Factor VIII es 10.000 - 100.000 UI/ml de resina de afinidad y la pureza del material de partida es de >5000 UI de Factor VIII/mg de proteína. El procedimiento se realiza a temperatura ambiente, por ejemplo temperatura de la habitación.

Después de procesarse la solución que contiene Factor VIII sobre la columna, la columna se aclara con 15 volúmenes de columna del tampón de equilibrado (NaCl 0,1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 7,4-7,6, conductividad 12-16 mS/cm) para retirar impurezas (relacionadas tanto con el producto como con el procedimiento). Seguido de un lavado con 5 volúmenes de columna con concentración salina aumentada (NaCl 0,30 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 7,4-7,6, conductividad 30-35 mS/cm) para retirar formas inactivas de Factor VIII. El Factor VIII monomérico biológicamente activo se eluye a continuación de la columna usando un volumen de columna de un tampón con concentración salina aumentada (NaCl 0,39 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 5,9-6,1, conductividad 38-42 mS/cm).

Cualquier proteína restante unida a la resina de intercambio aniónico por interacción iónica se retira por lo tanto aumentando la concentración salina hasta 2 mol/kg de NaCl, después de lo cual la resina se limpia usando pH alto (14) y después del equilibrado, la columna está lista para otro ciclo de purificación.

Descripción detallada de la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño

El Factor VIII se carga en 4-8 % del volumen de columna en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 p.g.) con una altura de lecho de 70 cm y se equilibra con; NaCl 30,7 g/kg, CaCl₂ 0,5 g/kg, Na-citrato 2,0 g/kg, clorhidrato de L-arginina 9,2 g/kg, sacarosa 9,2 g/kg Poloxámero 188 2,0 g/kg, pH 6,9-7,1, conductividad 47-51 mS/cm. Típicamente la concentración de Factor VIII en el material de partida es > 10.000 UI/ml y la composición del tampón; NaCl 0,4 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,0-6,5, conductividad 35-42 mS/cm. La pureza del material de partida es >8000 UI de Factor VIII/mg de proteína. El procedimiento se realiza a temperatura ambiente; 18-25 °C.

Después de aplicarse la solución que contiene Factor VIII en la columna de exclusión por tamaño, la columna se procesa con tampón de equilibrado hasta que, en la salida de la columna, la absorbancia medida a 280 nm se eleva hasta 40 mUA, cuando el producto de Factor VIII biológicamente activo monomérico se recoge hasta que la absorbancia vuelve a su origen (40-1 mUA). Se retira Factor VIII agregado biológicamente inactivo delante de (<40 mUA) y se retira fragmento de Factor VIII inactivo después de (<40 mUA), el máximo de Factor VIII monomérico biológicamente activo. La solución de Factor VIII monomérico biológicamente activo después de la etapa de exclusión por tamaño, es típicamente 2-3 veces el volumen del material de partida.

Debe interpretarse que el uso de los términos "un", "una", "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención abarca tanto el singular como el plural, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento sea contradicho claramente por el contexto. A no ser que se indique otra cosa, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, puede considerarse que todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor o una medición particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando sea adecuado).

Se pretende que la descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando expresiones tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye", o "que contiene" en referencia a un elemento o elementos proporcione apoyo para un aspecto o realización similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "sustancialmente comprende" ese elemento o elementos particulares, a no ser que se indique de otro modo o sea contradicho claramente por el contexto (por ejemplo, debería entenderse que una composición que se describe en el presente documento que comprende un elemento particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a no ser que se indique de otro modo o sea contradicho claramente por el contexto).

Todos los encabezamientos y subtítulos se usan en el presente documento solamente por conveniencia y no deberían interpretarse como limitantes de la invención en ningún modo. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende únicamente ilustrar mejor la invención y no impone una limitación sobre el ámbito de la invención a no ser que se reivindique otra cosa. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debería interpretarse como indicativo de que ningún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

La cita e incorporación de documentos de patente en el presente documento se realiza solamente por conveniencia y no refleja ninguna opinión sobre la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de dichos documentos de patente. La presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto enumerada en las

reivindicaciones y/o aspectos incluidos en el presente documento permitidos por la ley aplicable.

La invención se describe además pero sin limitación mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1:

Purificación con un ligando de afinidad de Factor VIII obtenido de levadura acoplado en una resina.

- 5 El siguiente procedimiento ilustra la retirada de formas de Factor VIII sin actividad Factor VIII:C en una etapa de cromatografía de ligando de afinidad de factor obtenido de levadura (VIIISelect).

Columna y resina

Se empaquetó una columna BPG140 con la resina VIIISelect a una altura de lecho de once cm proporcionando un volumen de columna de 1,7 litros. La resina VIIISelect se obtuvo de GE Healthcare (Cat. N.º 17-5450).

- 10 Material de partida:

Un material que contenía Factor VIII con una pureza de 1614 UI de Factor VIII/mg de proteína, NaCl 0,34 mol/kg, CaCl₂ 0,035 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, L-arginina 0,045 mol/kg, sorbitol 0,2 mol/kg, polisorbato 80 0,02 % (p/p), Triton X-100 1 % (p/p), 0,3 % tri-n-butyl fosfato (TNBP, p/p), pH 6,5 se usó como material de partida. El material de partida se produjo como se describe adicionalmente en el documento WO2009156430A1. La carga de FVIII:C en la resina fue de 15.529 UI/ml de resina.

- 15

Composiciones de tampón:

Tampón de equilibrado (con Triton X-100 y TNBP)

NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg (2xH₂O), L-histidina 0,02 mol/kg, Triton X-100 1 % p/p, TNBP 0,3 % p/p, pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C

- 20 Tampón de lavado 1 (tampón de equilibrado sin Triton X-100 y TNBP)

NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C

Tampón de lavado 2

- 25 NaCl 1,0 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 85 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Tampón de elución

NaCl 1,5 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), etilenglicol (EG) 50 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 39 ± 3 mS/cm a +25 °C.

- 30 Los tampones de equilibrado, lavado y elución no se limitan al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de carga del material de partida. La resina se sometió después a tampón de lavado 1 y tampón de lavado 2 y a continuación el tampón de elución como se describe en la Tabla 3. Se tomaron muestras de la fracción respectiva (flujo continuo durante la carga del material de partida + lavado 1, lavado 2 y elución) y se analizaron con respecto a FVIII:C, FVIII:Ag y transferencia de Western de FVIII.

- 35 Tabla 3, Resultados del procesamiento de VIIISelect

Muestra	Cantidad (kg)	FVIII:C (UI/ml) / (MUI)	FVIII total: C (%)	FVIII:Ag (UI/ml) / (MUI)	FVIII:Ag Total (%)	Relación (C/Ag)
Material de partida (carga)	23,2	1140/26,4	100	1859/43,1	100	0,61
Flujo continuo + Lavado 1	48,2	0,59/0,02	0,1	132/6,36	17	<0,01
Lavado 2	16,9	<0,5/<0,01	0,03	26,3/0,44	1,2	<0,02
Elución	6,0	3572/21,4	81	4122/24,7	57	0,87

La tabla 3 ilustra la retirada de formas de Factor VIII inactivas del material de partida. La relación de Factor VIII biológicamente activo como se mide con FVIII:C en comparación con la cantidad total de Factor VIII disponible como se mide mediante FVIII:Ag, fue de 0,61 en el material de partida. También se midió la relación de C/Ag en las fracciones de flujo continuo y lavado, que era muy baja (<0,05). En la fracción de eluato la relación de C/Ag ha aumentado de 0,61 en el material de partida, a 0,87. Esto muestra claramente la retirada de formas de Factor VIII inactivas sobre la etapa de afinidad de VIIISelect. Esto se confirma adicionalmente cuando se mira en el análisis de transferencia Western de Factor VIII de la Figura 1, carril 1-4. El carril 1 muestra el "material de partida" antes de la columna de afinidad. El carril 2 muestra un lote de bandas relacionadas con el Factor VIII que muestra que se retiran productos degenerados de Factor VIII en la "fracción de flujo continuo + lavado 1". El carril 3 muestra que en la "fracción de lavado 2" hay una banda de Factor VIII importante definida que tiene el mismo peso molecular como la cadena ligera de Factor VIII (80 kD) individual (disociada). Esta fracción de Factor VIII muestra también ausencia o muy poca actividad Factor VIII:C (como se muestra en la Tabla 3). El carril 4 muestra la fracción de elución de la etapa de afinidad incluyendo la cadena ligera de Factor VIII (80 kD), la cadena pesada de Factor VIII (90 kD) y la molécula de Factor VIII (170 kD).

15 Ejemplo concluyente 1

La etapa de VIIISelect retira moléculas de Factor VIII con actividad FVIII:C reducida o sin actividad FVIII:C en las fracciones de flujo continuo y lavado como se puede ver en la Tabla 3 y la Figura 1 (Carril 1-4).

Ejemplo 2, Etapa de cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose FF)

20 El siguiente procedimiento ilustra la retirada de formas de Factor VIII sin actividad Factor VIII:C en una resina de intercambio aniónico (Q Sepharose FF) dando como resultado un producto de monómero de Factor VIII alto.

Columna y resina

Se empaquetó una columna BPG140 con la resina Q Sepharose FF a una altura de lecho de ocho cm proporcionando un volumen de columna de 1,23 litros. La resina Q Sepharose FF se obtuvo de GE Healthcare (Cat. 17-0510).

25 **Material de partida**

Un material que contenía Factor VIII con una pureza de 9470 UI de Factor VIII/mg de proteína, NaCl 0,1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,5 se usó como material de partida. El material de partida se produjo como se describe adicionalmente en el ejemplo 1 (la fracción de elución del producto). La carga de FVIII:C en la resina fue de 15.383 UI/ml de resina.

30 **Composiciones de tampón:**

Tampón de equilibrado

NaCl 0,1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg (2xH₂O), L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,5 ± 0,1, conductividad: 15 ± 1 mS/cm a +25 °C

Tampón de lavado

35 NaCl 0,32 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,5 ± 0,1, conductividad: 32,5 ± 2,5 mS/cm a +25 °C.

Tampón de elución

NaCl 0,39 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,0 ± 0,1, conductividad: 40 ± 2 mS/cm a +25 °C.

40 Los tampones de equilibrado, lavado y elución no se limitan al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

45 La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de carga del material de partida. La resina se sometió a continuación a tampón de equilibrado de nuevo para permitir que el Factor VIII se uniera y a continuación se aplicó el tampón de lavado seguido del tampón de elución, como se describe en la Tabla 4. Se tomaron muestras de la fracción respectiva (flujo continuo durante la carga del material de partida + Equil., lavado y elución) y se analizaron con respecto a FVIII:C, FVIII:Ag, SEC-HPLC1, transferencia de Western de FVIII, mapeo de identificación de N-glucano y mapeo de identificación de péptido de tripsina.

Tabla 4, Resultados del procedimiento de intercambio aniónico

Muestra	Cantidad (kg)	FVIII:C (UI/ml) / (MUI)	FVIII total: C (%)	FVIII:Ag (UI/ml) / (MUI)	FVIII:Ag Total (%)	Relación (C/Ag)
Material de partida (carga)	58,4	324/18,9	100	412/24,1	100	0,78
Flujo continuo + Equil.	71,8	1,7/0,11	0,6	15,4/1,1	4,6	0,11
Lavado	6,2	130/0,81	4,3	401/2,5	10	0,32
Elución	0,958	16410/15,7	83	18131/17,4	72	0,91

La tabla 4 ilustra la retirada de formas de Factor VIII inactivas del material de partida de la etapa de intercambio aniónico. La relación de Factor VIII biológicamente activo como se mide con FVIII:C en comparación con la cantidad total de Factor VIII disponible como se mide mediante FVIII:Ag, fue de 0,78 en el material de partida. También se midió la relación de FVIII C/Ag en las fracciones de flujo continuo y lavado, que era significativamente menor (<0,35). En la fracción de eluato la relación de C/Ag ha aumentado de 0,78 en el material de partida, a 0,91. Esto muestra claramente la retirada de formas de Factor VIII inactivas sobre la etapa de intercambio aniónico. Esto se confirma adicionalmente cuando se mira en la Figura 1, carril 5-6, en la que ambos muestran que los productos degenerados de Factor VIII se retiran en la fracción de flujo continuo+equilibrado y en la fracción de lavado. La Figura 2, carril 4, muestra el perfil de transferencia de Western de FVIII de la fracción principal de Factor VIII (eluato), sin productos de degeneración de FVIII visibles. El alto contenido monomérico (>98 %), como se analizó con SEC-HPLC1, en el eluato se muestra en la Figura 4.

Ejemplo concluyente 2

La etapa de intercambio aniónico retira moléculas de Factor VIII con actividad FVIII:C reducida o sin actividad FVIII:C en las fracciones de flujo continuo y lavado como se puede ver en la Tabla 4 y la Figura 1 (Carril 5-6). La fracción de producto biológicamente activo (elución) contiene Factor VIII altamente monomérico, como se puede ver en la Figura 4.

Ejemplo 3, Cromatografía de exclusión por tamaño

El siguiente procedimiento ilustra la retirada de formas de Factor VIII sin actividad Factor VIII:C en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 p.g.).

Columna y resina

Se empaquetó una columna BPG100 con Superdex 200 p.g. a una altura de lecho de 69 cm proporcionando un volumen de columna de 5,4 litros. La resina Superdex 200 p.g. se obtuvo de GE Healthcare (Cat. N.º 17-1043).

Material de partida

Un material que contenía Factor VIII con una pureza de 10.200 UI de Factor VIII/mg de proteína, NaCl 0,4 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,2 se usó como material de partida. El material de partida se produjo como se describe en el ejemplo 2 (la fracción de elución del producto). La carga de muestra en la resina fue de 5,5 % del volumen de columna.

Composición de tampón:

Tampón de equilibrado

NaCl 30,7 g/kg, CaCl₂ 0,5 g/kg, citrato sódico 2,0 g/kg, arginina 9,2 g/kg, sacarosa 9,2 g/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,0 ± 0,1, conductividad: 49 ± 2 mS/cm a +25 °C

El equilibrado no se limita al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de carga del material de partida. La resina se sometió a continuación a tampón de equilibrado de nuevo para permitir que la solución de Factor VIII se separe sobre la columna de exclusión por tamaño. Cuando la absorbancia a 280 nm se elevó por encima de 0,035 UA en la salida de la columna, se inició la recogida del eluato y cuando la absorbancia se redujo a 0,05, se detuvo la recogida del eluato. Se tomaron muestras de la carga y el eluato y se analizaron con respecto a FVIII:C, FVIII:Ag, SEC-HPLC1 y transferencia de Western de FVIII.

Tabla 5, Resultados del procedimiento de exclusión por tamaño

Muestra	Cantidad (ml)	FVIII:C (UI/ml) / (MUI)	FVIII total: C (%)	FVIII:Ag (UI/ml) / (MUI)	FVIII:Ag Total (%)	Relación (C/Ag)
Material de partida (carga)	489	14633/7,2	100	17582/8,6	100	0,83
Elución	1190	6399/7,6	106 %	6780/8,1	94	0,94

La tabla 5 ilustra la retirada de formas de Factor VIII inactivas del material de partida sobre la etapa de exclusión por tamaño. La relación de Factor VIII biológicamente activo como se mide con FVIII:C en comparación con la cantidad total de Factor VIII disponible como se mide mediante FVIII:Ag, fue de 0,83 en el material de partida y de 0,94 en la fracción de eluato. Esto indica la retirada de formas inactivas de Factor VIII sobre la columna de exclusión por tamaño debido a agregación y/o fragmentación. La Figura 2, carril 5 muestra un perfil de patrón de bandas de Factor VIII igual para la fracción de elución en comparación con el control. La Figura 5, muestra el contenido de monómero de Factor VIII alto (>99 %) y de agregado bajo (<1 %) del eluato usando el análisis de SEC-HPLC1 en las condiciones nativas. La Figura 3 ilustra la retirada real de agregado y fragmento de un producto de Factor VIII monomérico, como se representa a partir de un cromatograma de exclusión por tamaño de producción.

Ejemplo concluyente 3

La etapa de exclusión por tamaño retira moléculas de Factor VIII con actividad FVIII:C reducida y/o sin actividad FVIII:C mediante separación de moléculas de diferente tamaño. El ambiente de cromatografía y los parámetros del procedimiento facilitan la agregación y retirada de estos durante el procedimiento, dando como resultado un producto de Factor VIII monomérico alto (>99 %) con una actividad biológica alta (C/Ag >0,9), como se puede ver en la Figura 5 y la Tabla 5.

Ejemplo 4, Uso secuencial de cromatografía de afinidad, de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño

El siguiente procedimiento ilustra la retirada de formas de Factor VIII sin actividad Factor VIII:C realizando una secuencia de purificación que consiste en tres técnicas de cromatografía diferentes procesadas en secuencia:

1. Cromatografía de afinidad (VIIISelect)
2. Cromatografía de intercambio aniónico (QSepharose FF)
3. Cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 p.g.)

Columnas y resinas

1. Cromatografía de afinidad (VIIISelect)

Se empaquetó una columna BPG140 con la resina VIIISelect a una altura de lecho de diez cm proporcionando un volumen de columna de 1,5 litros. La resina VIIISelect se obtuvo de GE Healthcare (Cat. N.º 17-5450).

2. Cromatografía de intercambio aniónico (QSepharose FF)

Se empaquetó una columna BPG100 con la resina Q Sepharose FF a una altura de lecho de siete cm proporcionando un volumen de columna de 0,55 litros. La resina Q Sepharose FF se obtuvo de GE Healthcare (Cat. 17-0510).

3. Cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200 p.g.)

Se empaquetó una columna BPG100 con Superdex 200 p.g. a una altura de lecho de 69 cm proporcionando un volumen de columna de 5,4 litros. La resina Superdex 200 p.g. se obtuvo de GE Healthcare (Cat. N.º 17-1043).

Material de partida, composición de tampón, etapa de afinidad:

NaCl 0,34 mol/kg, CaCl₂ 0,035 mol/kg, L-histidina 0,01 mol/kg, L-arginina 0,045 mol/kg, sorbitol 0,2 mol/kg, polisorbato 80 0,02 % (p/p), Triton X-100 1 % (p/p), 0,3 % tri-n-butil fosfato (TNBP, p/p), pH 6,5 se usó como material de partida. El material de partida se produjo como se describe adicionalmente en el documento WO 2009/156430 A1.

Material de partida, composición de tampón, etapa de intercambio aniónico:

NaCl 0,15 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 7,5 se usó como material de partida.

Material de partida, composición de tampón, etapa de exclusión por tamaño:

ES 2 688 144 T3

NaCl 0,39 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,2 se usó como material de partida.

Composiciones de tampón, cromatografía de afinidad:

Tampón de equilibrado (con Triton X-100 y TNBP)

- 5 NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg (2xH₂O), L-histidina 0,02 mol/kg, Triton X-100 1 % p/p, TNBP 0,3 % p/p, pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C

Tampón de lavado 1 (tampón de equilibrado sin Triton X-100 y TNBP)

NaCl 0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C

- 10 Tampón de lavado 2

NaCl 1,0 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 85 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Tampón de elución

- 15 NaCl 1,5 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), etilenglicol (EG) 50 % (p/p), pH: 6,5 ± 0,1, conductividad: 39 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Los tampones de equilibrado, lavado y elución no se limitan al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

Composiciones de tampón, cromatografía de intercambio aniónico:

Tampón de equilibrado

- 20 NaCl 0,1 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg (2xH₂O), L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,5 ± 0,1, conductividad: 15 ± 1 mS/cm a +25 °C

Tampón de lavado

NaCl 0,32 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,5 ± 0,1, conductividad: 32,5 ± 2,5 mS/cm a +25 °C

- 25 Tampón de elución

NaCl 0,39 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 6,0 ± 0,1, conductividad: 40 ± 2 mS/cm a +25 °C.

Los tampones de equilibrado, lavado y elución no se limitan al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

- 30 Composiciones de tampón, cromatografía de exclusión por tamaño:

Tampón de equilibrado

NaCl 30,7 g/kg, CaCl₂ 0,5 g/kg, citrato sódico 2,0 g/kg, arginina 9,2 g/kg, sacarosa 9,2 g/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,0 ± 0,1, conductividad: 49 ± 2 mS/cm a +25 °C

El equilibrado no se limita al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

- 35 La columna respectiva (cromatografía de afinidad, intercambio iónico, exclusión por tamaño) se equilibró con tampón de equilibrado como se ha definido anteriormente.

La resina de cromatografía de afinidad se procesó en primer lugar, cargando el material de partida como se ha definido anteriormente y en la Tabla 6, seguido de lavar la columna con tampón de lavado 1 y tampón de lavado 2, como se ha definido anteriormente. A continuación, el producto de Factor VIII biológicamente activo se eluyó mediante el tampón de elución. El eluato fue, después de la toma de muestras (FVIII:C, FVIII:Ag), el material de partida para la siguiente etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

- 40 El eluato de la etapa de cromatografía de afinidad se diluyó 10 veces para conseguir las condiciones de material de partida como se ha definido anteriormente. El material de partida diluido se procesó sobre la columna de intercambio aniónico seguido del tampón de lavado, como se ha definido anteriormente. A continuación, el producto de Factor VIII biológicamente activo se eluyó aplicando el tampón de elución. El eluato fue, después de la toma de muestras
- 45

(FVIII:C, FVIII:Ag), el material de partida para la siguiente etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

- 5 El eluato de la etapa de intercambio aniónico se descongeló si estaba congelado, se procesó de otro modo directamente sobre la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño, como se ha definido anteriormente y en la Tabla 6. Después de aplicación del producto en la columna, el tampón de equilibrado se procesó sobre la columna hasta que se eluyó la fracción de Factor VIII monomérico. La fracción de Factor VIII monomérico se inició cuando la absorbancia, medida a 280 nm, se elevó por encima de 0,04 UA. Además, la recogida de fracción de Factor VIII monomérico se detuvo cuando la absorbancia, medida a 280 nm, volvió a 0,01 UA. Se tomaron muestras del eluato y se analizaron con respecto a; FVIII:C, FVIII:Ag, transferencia de Western de FVIII, SEC_HPLC y composición de aminoácidos.
- 10 El procedimiento descrito anteriormente se repitió para 5 lotes diferentes en condiciones específicas (Tabla 6) para estudiar la reproducibilidad, cuyo resultado se puede ver en la Tabla 7.

Tabla 6, Propiedades de carga de columna de 5 lotes diferentes

Lote	Afinidad		Intercambio aniónico		Exclusión por tamaño	
	FVIII:C UI/ml	FVIII:C UI/ml de resina	FVIII:C UI/ml	FVIII:C UI/ml de resina	FVIII:C UI/ml	Carga de columna (%)
Lote 1	993	7987	281	13016	12187	8
Lote 2	1165	9003	315	14671	14601	5/4*
Lote 3	652	9355	360	14735	14559	5/5*
Lote 4	775	11114	342	17631	15067	5/5*
Lote 5	628	8423	317	14405	16058	7

* La columna de exclusión por tamaño se realizó en 2 ciclos, para no superar la carga de columna máxima especificada del 8 %, después de lo cual se mezclaron los dos eluatos recibidos en un grupo, del que se extrajeron las muestras analíticas.

Tabla 7. resultados de FVIII C/Ag del procedimiento de purificación secuencial

Lote	Inicio de VIIISelect		Relación		Eluato de VIIISelect			Eluato de intercambio aniónico			Eluato de exclusión por tamaño		
	FVIII:C (UI/ml)	FVIII:Ag (UI/ml)	FVIII:C C/Ag	FVIII:Ag C/Ag	FVIII:C (UI/ml)	FVIII:Ag (UI/ml)	Relación C/Ag	FVIII:C (UI/ml)	FVIII:Ag (UI/ml)	Relación C/Ag	FVIII:C (UI/ml)	FVIII:Ag (UI/ml)	Relación C/Ag
1	1005	1455	0,69	0,80	3087	3841	0,80	13016	15617	0,83	6923	7242	0,96
2	632	924	0,68	0,75	3170	4202	0,75	14671	17533	0,84	5202	5450	0,95
3	755	1027	0,74	0,76	3442	4513	0,76	14735	16276	0,91	5602	5939	0,94
4	966	1433	0,67	0,88	3887	4424	0,88	17631	20076	0,88	7126	6519	1,09
5	755	1020	0,74	0,79	2796	3547	0,79	14405	18406	0,78	7144	8848	0,81
Media	823	1172	0,70	0,80	3276	4105	0,80	14892	17582	0,85	6399	6800	0,95
DT			0,03	0,05									0,10

La tabla 7 ilustra la retirada de formas de Factor VIII inactivas del material de partida, de cinco lotes diferentes, sobre la primera etapa de purificación del procedimiento (cromatografía de afinidad), seguido de la segunda etapa de purificación del procedimiento (cromatografía de intercambio aniónico) y finalmente la última etapa de purificación del procedimiento (cromatografía de exclusión por tamaño).

- 5 La Figura 6 muestra una superposición de los 5 lotes de producción (según la Tabla 6-7) realizados en la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. El inicio y la terminación de la fracción de eluato de exclusión por tamaño recogida se indican en la figura.

- 10 La relación de Factor VIII biológicamente activo como se mide con FVIII:C en comparación con la cantidad total de Factor VIII disponible como se mide mediante FVIII:Ag, fue de 0,70 como un valor medio para el material de partida antes de la etapa de afinidad. La relación de FVIII C/Ag aumenta después hasta 0,80 como un valor medio después de la etapa de afinidad y aumenta además hasta 0,85 como un valor promedio después de la etapa de intercambio aniónico. Además, finalmente termina a 0,95 después de la etapa de purificación de exclusión por tamaño, cercana a la relación de FVIII C/Ag óptima de 1,0. Esto puede estudiarse adicionalmente en la Tabla 7, que muestra todas las concentraciones de FVIII:C y FVIII:Ag y la relación FVIII:C/FVIII:Ag para las etapas respectivas para los 5 lotes realizados.

- 15 Las Figuras 7, 9, 11, 13 y 15 muestran los resultados después de análisis por SEC-HPLC1 del eluato de intercambio aniónico para los lotes 1-5 como se define en la Tabla 6-7. Los resultados de SEC-HPLC1 para todas las muestras de eluato de intercambio aniónico muestran ausencia (4 lotes) o cantidades muy bajas (<1 %) de agregados (valor medio para los 5 lotes de 0,1 %), un contenido de monómero de FVIII de >97 % (valor medio para los 5 lotes de 98,5 %) y contenido de fragmento de <2 % (valor medio para los 5 lotes de 1,4 %). El eluato de intercambio aniónico después de realizar la etapa de afinidad seguida de la etapa de intercambio aniónico, muestra un alto contenido de monómero de Factor VIII y un bajo contenido de partes de FVIII de fragmento/agregado inmunogénico potencial.

- 20 Las Figuras 8, 10, 12, 14 y 16 muestran los resultados después de análisis por SEC-HPLC1 del eluato de exclusión por tamaño para los lotes 1-5 como se define en la Tabla 6-7. Los resultados de SEC-HPLC1 para todas las muestras de eluato de exclusión por tamaño no muestran una cantidad visible o detectable de agregados, un contenido de monómero de FVIII de >98 % (valor medio para los 5 lotes de 98,6 %) y contenido de fragmento de <2 % (valor medio para los 5 lotes de 1,4 %). El eluato de exclusión por tamaño, después de realizar la etapa de afinidad seguida de la etapa de intercambio aniónico y la etapa de exclusión por tamaño, muestra un alto contenido de monómero de Factor VIII, sin señales detectables o visibles de agregado y bajo contenido de fragmentos de FVIII.

30 Ejemplo concluyente 4

- Las tres etapas de cromatografía realizadas en secuencia 1-3 según el ejemplo 4, contribuyen a la retirada de moléculas de Factor VIII inactivas, según la invención. Esto indica que las moléculas de Factor VIII inactivas retiradas mediante las diferentes etapas son diferentes en sus propiedades biofísicas y la realización de las etapas en conjunción secuencial entre sí para proporcionar un producto de Factor VIII purificado final con el menor grado de contenido de Factor VIII inactivo y el mayor grado de contenido de monómero de Factor VIII proporcionaría el menor riesgo de reacciones inmunogénicas en pacientes.

Ejemplo 5, Parámetros de cromatografía de exclusión por tamaño (altura de la columna, concentración de FVIII:C, carga)

- 40 El siguiente ejemplo ilustra parámetros de exclusión por tamaño (concentración de FVIII:C y carga de columna) importantes para la actividad biológica (FVIII:C/Ag).

Columna y resina

Se empaquetó una columna BPG200 con Superdex 200 p.g. a una altura de lecho de 62 cm proporcionando un volumen de columna de 19,5 litros. La resina Superdex 200 p.g. se obtuvo de GE Healthcare (Cat. N.º 17-1043).

Material de partida

- 45 Un material que contenía Factor VIII con la siguiente composición, NaCl 0,4 mol/kg, CaCl₂ 0,02 mol/kg, L-histidina 0,02 mol/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH 6,2 se usó como material de partida. El material de partida se produjo como se describe en el ejemplo 2 (la fracción de elución del producto).

Composición de tampón:

Tampón de equilibrado

- 50 NaCl 30,7 g/kg, CaCl₂ 0,5 g/kg, citrato sódico 2,0 g/kg, arginina 9,2 g/kg, sacarosa 9,2 g/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,0 ± 0,1, conductividad: 49 ± 2 mS/cm a +25 °C

El equilibrado no se limita al pH, las concentraciones y el tipo de tampón, sales o detergente indicados.

5 Se realizaron siete lotes diferentes (A-G) según la Tabla 8 a continuación. La columna se equilibró con tampón de equilibrado seguido de carga del material de partida. La resina se sometió a continuación a tampón de equilibrado para permitir que la solución de Factor VIII se separe sobre la columna de exclusión por tamaño. Cuando la absorbancia a 280 nm se elevó por encima de 0,035 UA en la salida de la columna, se inició la recogida del eluato y cuando la absorbancia se redujo a 0,005 UA se detuvo la recogida del eluato. Se tomaron muestras del material de partida y el eluato y se analizaron con respecto a FVIII:C, FVIII:Ag y SEC-HPLC1.

Tabla 8, Condiciones experimentales y actividad biológica resultante de FVIII:C/Ag

Lote	Concentración de carga de FVIII:C, UI/ml	Carga de columna, %	Actividad biológica, Material de partida de FVIII:C/Ag	Actividad biológica, eluato de FVIII:C/Ag
A	17101	5,5	nd	0,90
B	16685	5,3	0,83	0,81
C	18046	5,0	0,95	0,99
D	21445	5,2	0,97	1,01
E	15925	4,3	0,86	0,81
F	14844	1,9	0,92	0,79
G	9149	3,9	0,91	0,82

10 La tabla 8 ilustra que la retirada de formas de Factor VIII inactivas del material de partida sobre la etapa de exclusión por tamaño depende de diferentes parámetros. Una concentración de Factor VIII:C relativamente baja en combinación con una carga relativamente baja en la columna, como en el lote E (15925 UI/ml, 4.3 %) F (14844 UI/ml, 1,9 % y G (9149 UI/ml, 3,9 %), parece ser negativa para la actividad biológica, como se mide con la relación FVIII:C/FVIII:Ag, en los eluatos respectivos (E-0,81, F-0,79, G-0,82), en comparación con los lotes A-D (A-0,90, B-0,81, C-0,99 y D-1,01)

15 Ejemplo concluyente 5

La concentración de FVIII:C en combinación con la carga de columna es importante para el resultado de la etapa de exclusión por tamaño con respecto a la actividad biológica. Basándose en datos descritos en el ejemplo 3 y el ejemplo 4, ambos usando la altura de lecho de 69 cm, parece que los resultados como se describen en el ejemplo 5 con una altura de lecho ligeramente menor (62 cm), probablemente en combinación con los otros dos factores importantes (concentración de FVIII:C y carga de columna) también afectan al resultado de la etapa de exclusión por tamaño. Se muestra que la etapa de exclusión por tamaño funciona mejor con una alta concentración de Factor VIII:C, una altura de lecho de columna alta y una carga de columna de ≥ 4 %.

Ejemplo 6, Estabilidad de Factor VIII monomérico biológicamente activo en estado congelado.

25 El siguiente ejemplo ilustra la estabilidad de una solución de Factor VIII monomérico biológicamente activo procesada según el ejemplo 4, en estado congelado.

Material de partida: Una solución de Factor VIII según el ejemplo 4, con un contenido de monómero de Factor VIII de >99 %, un contenido de agregado de <1 % y una cantidad de Factor VIII inactivo de >0,9, como se mide con la relación de Factor VIII biológicamente activo en relación con la cantidad total de Factor VIII (FVIII:C/FVIII:Ag)

Ambiente de tampón de Factor VIII:

30 NaCl 30,7 g/kg, CaCl₂ 0,5 g/kg, citrato sódico 2,0 g/kg, arginina 9,2 g/kg, sacarosa 9,2 g/kg, Polisorbato 80 0,02 % (p/p), pH: 7,0 \pm 0,1, conductividad: 49 \pm 2 mS/cm a +25 °C

Condiciones de congelación y almacenamiento:

35 La solución de Factor VIII se carga en un recipiente de polietileno plástico de baja densidad y se congela hasta -40 °C mediante un procedimiento de congelación rápida durante un máximo de 60 minutos. La solución congelada se almacena a continuación a una temperatura entre -60 °C y -80 °C durante 36 meses. Se toman muestras después de 0, 6, 9, 12, 18, 24 y 36 meses de almacenamiento y se analizan con respecto a la actividad biológica y el contenido de monómero, agregado, fragmento.

Tabla 9, Estabilidad de solución de Factor VIII almacenada congelada en una temperatura entre -60 °C y -80 °C

Análisis	0 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses
Actividad biológica (FVIII:C, UI/ml)	5196	5150	5962	5132	5989	5220	5317
Factor VIII monómero agregado fragmento (SEC-HPLC1)	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %	>94 % <3 % <3 %

5 Como se puede ver en la Tabla 9, la solución de Factor VIII es completamente estable durante al menos 36 meses de almacenamiento a temperatura entre -60 °C y -80 °C, con respecto a actividad biológica y contenido monomérico de Factor VIII (formación de agregado y fragmento).

Ejemplo 7, Estabilidad de Factor VIII monomérico biológicamente activo en un producto liofilizado.

El siguiente ejemplo ilustra la estabilidad de una solución de Factor VIII monomérico biológicamente activo procesada según el ejemplo 4 y el ejemplo 6 y a continuación liofilizada.

10 Material de partida: Una solución de Factor VIII congelada producida según el ejemplo 4 y el ejemplo 6, con un contenido de monómero de Factor VIII de >99 %, un contenido de agregado de <1 % y una cantidad de Factor VIII inactivo de >0,9, como se mide con la relación de Factor VIII biológicamente activo en relación con la cantidad total de Factor VIII (FVIII:C/FVIII:Ag).

Contenido de un vial de Factor VIII después de liofilizar:

Sacarosa	13,5 mg
Clorhidrato de arginina	13,5 mg
Poloxámero 188	3 mg
Cloruro sódico	45 mg
Cloruro cálcico dihidrato	0,75 mg
Citrato sódico dihidrato	3 mg
Factor VIII biológicamente activo	250 UI

15 Procedimiento de liofilización:

Se cargan 2,5 ml del material de partida de Factor VIII en un vial de vidrio moldeado de 8 ml (tipo I) hasta una cantidad total de Factor VIII de 250 UI. El vial se somete a un procedimiento de liofilización como se describe en la Tabla 10.

Tabla 10, Procedimiento de liofilización

1. Congelación	Descenso desde temperatura ambiente hasta -5 °C en 30 min Mantenimiento a -5 °C durante 30 min Descenso desde -5 °C hasta -55 °C en 1 h Mantenimiento a -55 °C durante 2 h
2. Hibridación	Aumento desde -55 °C hasta -25 °C en 1 h 15 min Mantenimiento a -25 °C durante 4 h Descenso desde -25 °C hasta -40 °C en 1 h 15 min Mantenimiento a -40 °C durante 2 h
3. Tinción primaria	Reducción de la presión hasta 6,5 Pa Aumento desde -40 °C hasta -30 °C en 30 min Mantenimiento a -30 °C durante 42 h
4. Tinción secundaria	Reducción de la presión hasta 2 Pa Aumento desde -30 °C hasta +25 °C en 4 h Mantenimiento a +25 °C durante 6 h

Después del procedimiento de liofilización, los viales se cierran con tapones de bromobutilo y se encapsulan con tapas de aluminio. Los viales se almacenaron a +5 °C durante 24 meses. Se tomaron muestras después de 0, 6, 9, 12, 18 y 24 meses de almacenamiento por reconstitución del producto liofilizado en 2,5 ml de agua para inyección y a continuación se analizaron con respecto a actividad biológica y contenido de monómero, agregado, fragmento, véase Tabla 11.

5

Tabla 11, Estabilidad de una solución de Factor VIII liofilizada almacenada a +5 °C

Análisis	0 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Actividad biológica (FVIII:C)	267 UI	280 UI	280 UI	281 UI	287 UI	282 UI
Factor VIII monómero agregado fragmento (SEC-HPLC1)	>94 %	>94 %	>94 %	>94 %	>94 %	>94 %
	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %
	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %	<3 %

Como se puede ver en la Tabla 11, el producto de Factor VIII liofilizado es completamente estable durante al menos 24 meses de almacenamiento a temperatura de +5 °C, con respecto a actividad biológica y contenido monomérico de Factor VIII (formación de agregado y fragmento).

10

Ejemplo 8, Determinación de la relación de FVIII C/Ag y agregado, monómero y fragmento en el producto liofilizado final según la invención y en comparación con productos recombinantes usando diferentes procedimientos de purificación.

El siguiente ejemplo ilustra las propiedades superiores del producto según la invención y en comparación con otros productos recombinantes disponibles en el mercado usando diferentes procedimientos de purificación.

15

Material de partida: Un producto de Factor VIII liofilizado producido según el ejemplo 7 de la invención, se reconstituyó y se comparó con 3 productos de rFVIII competidores diferentes purificados según 3 procedimientos de purificación diferentes (A-C) y se estabilizó con tampones de diferentes formulaciones. Se analizaron las potencias de al menos 1 vial (250 UI, 1000 UI o 3000 UI) para una buena comparación entre composiciones de diferentes formulaciones con respecto a estabilizadores/FVIII. Todas las muestras se analizaron con respecto a FVIII C/Ag y con respecto a agregado, monómero y fragmento según el procedimiento analítico de SEC-HPLC2 en condiciones de ejecución nativas.

20

Tabla 12

	FVIII/ vial, UI	FVIII:C, UI/ml	FVIII:Ag, UI/ml	C/Ag	SEC-HPLC2, %		
					Agregado	Monómero	Fragmento
rFVIII acc. a proc. pur. A	250	95	132	0,72	0	76	24
rFVIII acc. a proc. pur. A	1000	441	573	0,77	0	76	24
rFVIII acc. a proc. pur. A	3000	638	925	0,69	0	76	24
rFVIII acc. a proc. pur. B	1000	242	263	0,92	0	99	1
rFVIII acc. a proc. pur. C	500	104	130	0,8	0	77	23
rFVIII acc. a proc. pur. C	1000	205	270	0,76	0	80	20
rFVIII acc. a proc. pur. C	3000	600	732	0,82	0	77	23
rFVIII acc. a proc. pur. de inv.	250	119	131	0,91	0	100	0
rFVIII acc. a proc. pur. de inv.	1000	494	531	0,93	0	100	0

Ejemplo concluyente 8:

La Tabla 12 muestra la calidad superior para FVIII recombinante producido según la invención en un producto purificado y liofilizado, con respecto a 100 % de contenido de monómero y una relación de FVIII C/Ag >0,9. Esto implica ausencia o muy poca cantidad de Factor VIII no biológicamente activo en el producto final en comparación con competidores todos purificados y estabilizados en diferentes condiciones.

Ejemplo 9, Comparación de la formación de inhibidor en enfermos de hemofilia A previamente no tratados de un producto de rFVIII purificado, formulado, liofilizado y almacenado según la invención, en comparación con datos publicados para un producto de FVIII recombinante competidor²¹. Comparación además de la relación de FVIII C/Ag y agregado, monómero y fragmento entre los dos productos.

El siguiente ejemplo ilustra las propiedades superiores del producto según la invención y en comparación con un producto de FVIII recombinante comercial disponible en el mercado.

Material de partida: Un producto de Factor VIII liofilizado producido según el ejemplo 7 de la invención se comparó con un producto de rFVIII competidor disponible comercialmente en el mercado purificado según el procedimiento A como se describe en el ejemplo 8. Los dos productos se administraron a los pacientes y se siguieron con respecto a desarrollo de la formación de inhibidor, según protocolos clínicos convencionales²¹ para enfermos de hemofilia A previamente no tratados. La cantidad de los pacientes que desarrollan inhibidores para el producto respectivo así como la relación de Factor VIII C/Ag y perfil de agregado/monómero/fragmento puede verse en la Tabla 13.

Tabla 13

	FVIII/ vial, UI	FVIII: C, UI/ml	FVIII: Ag, UI/ml	C/Ag	SEC-HPLC2, %			Inhibidores de pacientes no tratados previamente (PNT), % (n=cantidad de pacientes tratados totales)
					Agregado	Monómero	Fragmento	
rFVIII acc. a proc. met. A	250	95	132	0,72	0	76	24	35,2 (128)*
rFVIII acc. a proc. met. A	1000	441	573	0,77	0	76	24	
rFVIII acc. a proc. met. A	3000	638	925	0,69	0	76	24	
rFVIII acc. a invención	250	119	131	0,91	0	100	0	11,6 (43)**
rFVIII acc. a invención	1000	494	531	0,93	0	100	0	

*Estudio publicado Collins2014²¹, **Datos no publicados de estudio en curso

Ejemplo concluyente 9:

La Tabla 13 muestra una cantidad significativamente menor de inhibidores detectados en enfermos de hemofilia A previamente no tratados usando el producto de la invención en comparación con un producto de rFVIII disponible comercialmente en el mercado. Además, la Tabla 13 muestra la relación de Factor VIII C/Ag y el perfil de agregado/monómero/fragmento de ejemplos de productos para 2 (250 UI y 1000 UI) o 3 (250 UI, 1000 UI y 3000 UI) potencias de vial diferentes, respectivamente. Se podría plantear la hipótesis de que una cantidad menor de FVIII biológicamente inactivo en el producto reduciría la cantidad de inhibidor formado en pacientes. Por lo tanto, se implica la importancia de la purificación, la estabilización, la liofilización y el almacenamiento para productos de FVIII recombinantes que minimicen el riesgo del paciente con respecto a reacciones inmunológicas.

Ejemplo 10, Actividad específica (pureza) de un producto de FVIII recombinante purificado según la invención.

El siguiente ejemplo ilustra la excelente pureza de un producto de FVIII recombinante purificado según la invención.

Material de partida: Una solución de Factor VIII congelada producida según el ejemplo 4 y el ejemplo 6, con un contenido de monómero de Factor VIII de >99 %, un contenido de agregado de <1 % y una cantidad de Factor VIII inactivo de >0,9, como se mide con la relación de Factor VIII biológicamente activo en relación con la cantidad total de Factor VIII (FVIII:C/FVIII:Ag) se analizó según FVIII:C y el contenido de proteína total según Bradford.

5 Ejemplo concluyente 10:

La Figura 18 muestra el aumento de la pureza como se mide por FVIII:C/mg de proteína (medido con Bradford) para 9 lotes purificados según la invención (las 3 últimas etapas; eluato de afinidad, eluato de intercambio aniónico y la sustancia farmacológica (=eluato de cromatografía de exclusión por tamaño)) en escala de producción, terminando con una pureza en el entorno de 10.000 UI/mg de proteína, que es esencialmente rFVIII puro.

10 Descripción del análisis

Se mide la actividad biológica de Factor VIII (FVIII:C) con un ensayo cromogénico (kit de FVIII COATEST SP, 82 4086 63, Chromogenix/Instrumentation Laboratory (Estados Unidos)), basándose en un procedimiento fotométrico de dos estadios que mide la actividad biológica de Factor VIII como un cofactor.⁽¹⁷⁾

15 La cantidad de contenido de antígeno de Factor VIII (FVIII:Ag) se mide con un kit de ELISA (ASSERACHROM® VIII:Ag, inmunoensayo enzimático para Factor VIII, kit, Diagnostica Stago (Francia)), como se describe adicionalmente⁽¹⁸⁾ con reemplazo del tampón del kit proporcionado con tampón de Tris-NaCl + albúmina de suero bovino 1 % para diluciones de muestras.

20 Se midió monómero, agregado y fragmento de Factor VIII usando dos columnas analíticas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) diferentes (SEC-HPLC 1, Superdex 200, 10/300 GL, GE Healthcare y SEC-HPLC2, BioSEC-3, Agilent Technologies)

25 Procedimiento de SEC-HPLC1 (Superdex 200) procesado en diferentes condiciones de tampón nativas (HEPES 25 mM, NaCl 0,5 M, arginina 0,3 M, CaCl₂ 50 mM, Polisorbato 80 0,02 %, pH 7,5). La carga de muestra es de aproximadamente 1 % de la columna de exclusión por tamaño y la concentración de Factor VIII:C es aproximadamente 1000 UI/ml. El monómero se definió como el principal máximo del cromatograma de FVIII, el agregado como el máximo que eluía antes y el fragmento como el máximo del cromatograma que eluía después del máximo de monómero de FVIII.

30 Se analizaron muestras de FVIII expresado recombinante del procedimiento de SEC-HPLC2 (BiSEC-3) con respecto a su composición de agregados, monómeros y fragmentos de FVIII usando cromatografía de exclusión por tamaño (BioSEC-3, columna SEC de 30 x 4,6 mm Agilent Technologies) en condiciones de tampón no desnaturizantes (Tris-HCl 25 mM, CaCl₂ 50 mM, NaCl 500 mM; pH 7,0) a un caudal de 0,4 ml/min en un sistema de HPLC Shimadzu. La carga de muestra fue de aproximadamente 0,2-0,4 µg según los valores de actividad de FVIII (FVIII:C) determinados. El monómero se definió como el principal máximo del cromatograma de FVIII, el agregado como el máximo que eluía antes y el fragmento como el máximo del cromatograma que eluía después del máximo de monómero de FVIII. El tiempo de retención para muestras de rFVIII analizadas se comparó también con el tiempo de retención de un muestra de peso molecular (15-600 kD, 69385, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

35 Se mide el producto de degeneración de Factor VIII basado en el tamaño usando transferencia de Western de FVIII. Las proteínas y péptidos de distribución de masa molecular de FVIII en preparación de Factor FVIII se separan según la masa molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de dodecil sulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras. A continuación, las proteínas se transfieren por electroforesis de la matriz de gel a una membrana de nitrocelulosa que se incubaba posteriormente con un agente de bloqueo. Después se añaden anticuerpos monoclonales de oveja comerciales dirigidos a la molécula de Factor VIII humano completa seguido de un anticuerpo secundario marcado con enzima como una sonda. Como una tercera etapa, se añade un sustrato quimioluminiscente y cuando se combina con la enzima, se produce luz como un producto secundario. La producción de luz se captura como una imagen en tiempo real usando una cámara de dispositivo de carga acoplada fría. La intensidad de la señal se correlaciona con la abundancia del antígeno (FVIII) en la membrana de transferencia.

40 Se llevó a cabo electroforesis bidimensional con tinción de plata para estudiar el patrón de bandas electroforéticas de la cadena proteica de Factor VIII. Se realizó isoelectroenfoco como el procesamiento de primera dimensión usando un gradiente de pH lineal de pH 3 a 10. Se procesó el SDS-PAGE de segunda dimensión usando geles de Tris-Acetato (3-8 %). Los geles se tiñeron con tinción de plata después del procesamiento de segunda dimensión.

45 Se realizó análisis de composición de aminoácidos mediante análisis de aminoácidos composicional después de hidrólisis ácida de la proteína. Las proteínas se hidrolizaron en HCl 6 M a 110 °C durante 24 h y a continuación los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico en resinas de poliestireno sulfonadas y se detectaron de forma continua en el eluyente. La detección se basa en derivatización de ninhidrina después de columna usando un fotómetro doble para medición simultánea a 440 nm para prolina y 570 nm para todos los otros aminoácidos. No puede medirse ningún valor de cisteína o triptófano ya que este procedimiento no mide estos restos de forma apropiada. También se omitieron valores para lisina y arginina debido a la interferencia de lisina y arginina

presentes en la formulación de tampón.

5 Se realizó identificación de N-glucano mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica por pulsos (HPAEC-PAD), para determinar glucanos ligados a N.⁽¹⁹⁾ Las cadenas de glucanos ligados a N se liberan de las proteínas por escisión enzimática (N-Glycanase Plus, producto N.º GKE-5010B, de Prozyme) y posteriormente se unen con la columna de intercambio aniónico a pH alto (pH 13), seguido de un gradiente con fuerza iónica aumentada y pH reducido. La separación de las diversas cadenas de glucanos en el sistema de cromatografía se consigue debido a diferencias en la carga, el tamaño y la estructura. La columna de intercambio aniónico fue una columna de cromatografía CarboPac™ PA 200 (250 mm x 3 mm DI, tamaño de partícula 5,5 µm, producto N.º 062896) de Dionex y precolumna CarboPac™ PA 200 (50 x 3 mm DI, producto N.º 062895) de Dionex. El sistema de detección usado fue un detector electroquímico ICS-3000 CD con una membrana de oro de 3 mm (electrodo de trabajo Au ICS-3000, 3 mm, producto N.º 063723), controlado por el software Chromeleon.

15 Se recogieron muestras correspondientes a los diferentes máximos cromatográficos en fracciones correspondiendo cada fracción a un tiempo de retención de 1 min. Los glucanos se desalaron en columnas de carbono grafito poroso y a continuación se concentró cada fracción. Se realizó separación cromatográfica en un sistema de CL capilar, usando una columna PGC, y los glucanos se electropulverizaron en línea con una EM de tiempo de vuelo. Se usó una base de datos de Functional Glycomics [www.functionalgly-comics.org] tecleando las masas y buscando una posible coincidencia. Debido a la alta precisión de masa (aproximadamente 30 ppm) se determinó que la identificación de glucanos respectivos era precisa.

20 Se realizó mapeo de identificación de péptido de tripsina incluyendo dos etapas principales. En la primera etapa se usa tripsina para digerir la proteína para analizar en polipéptidos, que se separan y registran en una segunda etapa usando tecnología de HPLC. De este modo se genera un patrón específico ("identificación"). Los péptidos se detectan por su fluorescencia (principalmente triptófano) produciendo un mapa más simplificado en comparación con detección de UV. El patrón de fluorescencia registrado a lo largo del tiempo representa el mapa de péptidos para la muestra analizada.

25 Se determinó la concentración de proteínas usando el ensayo de Bradford²³.

VIIISelect es un medio de cromatografía de afinidad (resina) diseñado para la purificación de Factor VIII con supresión del dominio B recombinante.

Según el archivo de datos 28-9662-37 AB, las características clave de GE healthcare de VIIISelect incluyen:

- 30
- Purificación eficaz de Factor VIII con supresión del dominio B recombinante, con altos rendimientos y actividad específica conservada
 - Alta selectividad
 - Excelente capacidad de cambio de escala
 - Producción sin animales

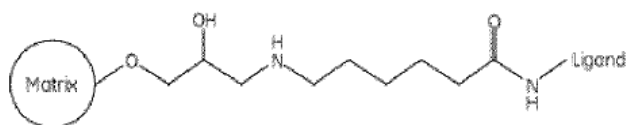
35 Son necesarios procedimientos de purificación eficaces de factores de coagulación de sangre recombinantes para tratar enfermos de hemofilia. VIIISelect es un medio de cromatografía de afinidad diseñado para la purificación de Factor VIII con supresión del dominio B recombinante, un factor de sangre recombinante clave usado para el tratamiento de la hemofilia A. Debido a la naturaleza sensible de la molécula de Factor VIII, es importante limitar el número de etapas en el procedimiento corriente abajo. La alta selectividad y el rendimiento obtenido usando VIIISelect permite un procedimiento de purificación robusto y eficaz con excelente pureza obtenido en una etapa. La producción sin animales y baja filtración de ligandos son propiedades adicionales que hacen a este medio altamente adecuado para producción a gran escala de Factor VIII con supresión del dominio B recombinante. VIIISelect es parte del programa de medios diseñados a petición de GE Healthcare.

Características del medio

45 VIIISelect se basa en una matriz basada en agarosa altamente reticulada, que permite un procesamiento rápido de grandes volúmenes de muestras. El ligando, una proteína recombinante de 13 kD, se une con la matriz de base porosa mediante una rama espaciadora hidrófila haciéndola fácilmente disponible para unión con el Factor VIII con agotamiento de dominio recombinante (Fig 1). La Tabla 14 resume las características principales de VIIISelect.

Principios funcionales

50 La cromatografía de afinidad aprovecha un ligando inmovilizado que adsorbe una molécula o un grupo de moléculas específico en condiciones de unión adecuadas y las desorbe en condiciones de elución adecuadas. Estas condiciones dependen de la molécula diana, la composición de suministro y el medio de cromatografía, y deben estudiarse junto con otros parámetros cromatográficos (por ejemplo, carga de muestras, velocidad de flujo, altura del lecho,



Estructura parcial de VIIISelect.

regeneración y limpieza en el sitio) para establecer las condiciones que unirán la molécula con la mayor recuperación de producto.

- 5 El Factor VIII recombinante puede aplicarse directamente a la columna VIIISelect de lisados celulares clarificados o sobrenadantes.

Tabla 14. Características principales de VIIISelect

Matriz	agarosa altamente reticulada
Tamaño de partícula promedio	75 μm
Ligando	Proteína recombinante (M_r 13.000) producida en <i>S. cerevisiae</i> .
Capacidad	Típicamente 20.000 UI/ml de gel
Caudal y contrapresión recomendados para estabilidad del pH	Hasta 300 cm/h a 30 cm de altura del lecho, Máximo 0,3 MPa, 3 bar
Largo plazo	3-10
Corto plazo	2-12

- 10 Los tampones siempre deberían contener iones Ca^{2+} para promover la formación de la conformación activa de Factor VIII. La presencia de un tensioactivo es necesaria para inhibir la desnaturalización/absorción inducida en superficie. Deberían usarse siempre tampones de pH neutro e histidina para unión, lavado y elución para mantener la actividad de Factor VIII específica. Dependiendo de la naturaleza del material aplicado a VIIISelect, normalmente es necesaria regeneración después de cada ciclo, seguido de reequilibrado en tampón de equilibrado/carga.

Estabilidad

- 15 El ligando se une a la matriz de base altamente reticulada mediante un enlace amida estable. La Figura 2 muestra un estudio en el que se almacenó VIIISelect a temperatura ambiente a diferentes valores de pH durante una semana. La figura muestra que la estabilidad es alta entre pH 3 y 10. GE recomiendan almacenamiento a largo plazo entre pH 3 y 10 y almacenamiento a corto plazo a pH 2 y 12.

Almacenamiento

- 20 Las condiciones de almacenamiento recomendadas son etanol 20 % de 4 °C a 8 °C. Se proporciona VIIISelect prehinchado en una solución de etanol al 20 %.

Limpieza en el sitio

- 25 Un protocolo de limpieza para VIIISelect puede consistir en ácido cítrico 0,1 M o ácido fosfórico 0,5 M. Sin embargo, la exposición prolongada hasta pH < 2 debería evitarse debido a descomposición de la matriz de base de agarosa. Puede usarse hidróxido de sodio (0,01 M) solo o en combinación con sulfato/cloruro sódico como estabilizador.

Referencias

1. Wang y col., Coagulation Factor VIII; structure and stability, International Journal of pharmaceutics 259 (2003) 1-15.
2. Svensson y col., Evaluation of the metal binding site in a recombinant coagulation factor VIII identifies two sites with unique metal binding sites, Biological Chemistry, DOI:10.1515/hsz-2012-0298
3. Peerlinck y col., Factor VIII inhibitors in previous treated Haemophilia A patientse with a double virus inactivated plasma derived Factor VIII concentrate, Thrombosis and Haemostasis 77 (1) 80-86 (1997).
4. Fang y col., The protein structure and effect of Factor VIII, Thrombosis Research (2007) 119, 1-13.
5. Lin y col., Relationship between Factor VIII:Ag and Factor VIII in recombinant and plasma derived Factor VIII concentrate, Haemophilia (2004), 10, 459-469.
6. Mire-Sluis y col., Analysis and immunogenic potential of aggregates and particles, Bioprocess International 9(11) diciembre de 2011 38-43.
7. Grillo y col., Conformational origin of the aggregation of recombinant human Factor VIII, Biochemistry 2001, 40, 586-595.
8. Wang y col., Correlation with rFVIII inactivation with aggregation in solution, Pharmaceutical Research, Vol. 20, N.º 4, abril de 2003.
9. Thim y col., Purification and characterization of new recombinant Factor VIII (N8), Haemophilia (2010), 16, 349-

359.

10. Kelley y col., Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of Factor VIII, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 87, N.º 3, 5 de agosto de 2004.
- 5 11. McCue y col., Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant Factor VIII compounds, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7824-7830.
12. Kusch y col., Factor VIII assay mimicking in vivo coagulation conditions, *Haemophilia* (2013), 1-7.
13. Sommer y col., Comparative field study evaluating activity of recombinant FVIII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostasis laboratories, *Haemophilia* (2013) 1-7.
- 10 14. Muyldermans, Single domain camel antibodies: current status, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74, (2001), 277-302.
- 15 15. Fay, Factor VIII: Function and structure, *International Journal of Hematology* 83 (2006) 103-108.
16. Metal ion-independent association of Factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-sub-unit affinity, *Biochemistry* 2001, 40, 10293-10300.
17. Rosen, Assay of Factor VIII:C with a chromogenic substrate, *Scand J Haematol-Supl* 40, Vol.33, 1984, 139-145.
18. Girma y col., Assay of Factor VIII antigen (FVIII:CAg) in 294 Haemophilia A patients by a new commercial ELISA using monoclonal antibodies, (*Haemophilia* 1998), 4, 98-103.
19. Cataldi y col., Carbohydrate analysis by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing, *Fresenius J Anal Chem* 2000;368:739-58.
- 20 20. Casademunt y col., The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur J Haematol.* 2012;89(2):165-76.
21. Collins y col., Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe haemophilia A, 2000-2011, *Bloodjournal.org*, DOI 10.1182/blood-2014-07-580498
22. Boedeker, Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations, *Seminars in thrombosis and hemostasis* volume 27, número 4, 2001.
- 25 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de un producto de Factor VIII que tiene una relación de FVIII:C/FVIII:Ag de al menos 0,7 en el producto de Factor VIII usando cromatografía, en el que se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una resina de cromatografía de afinidad que tiene una afinidad por la unión específica con el Factor VIII que se efectúa por un ligando de afinidad que se inmoviliza en la resina de cromatografía de afinidad, siendo dicho ligando de afinidad un fragmento de anticuerpo Fab obtenido de levadura de 13 kD dirigido a la molécula de Factor VIII, en el que
- 5
- se produce unión de Factor VIII con la resina de cromatografía de afinidad en condiciones de baja salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,1 - 0,5 mol/kg,
 - 10 - lavado de la resina de cromatografía de afinidad en concentración salina aumentada en el intervalo de 0,3 - 4 mol/kg de cloruro sódico para la retirada de la cadena ligera, y
 - elución y recogida de Factor VIII en una fracción separada empleando una concentración salina en el intervalo de 0,5 - 4 mol/kg de cloruro sódico en combinación con etilenglicol 40-60 %, y
- 15 en el que la carga de la resina de cromatografía de afinidad con Factor VIII biológicamente activo es de al menos 10.000 UI/ml de resina.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de al menos una etapa cromatográfica en una resina de cromatografía de intercambio aniónico, y en el que el producto de FVIII tiene un contenido de monómero de Factor VIII de ≥ 98 % y Factor VIII no agregado esencial.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se realiza al menos una etapa cromatográfica por medio del uso de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.
- 20
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de Factor VIII es un complejo de una cadena ligera y una cadena pesada y la relación mejorada de FVIII:C/FVIII:Ag resulta del agotamiento de la cadena ligera de Factor VIII, la cadena pesada de Factor VIII y/o cadena ligera de Factor VIII/cadena pesada de Factor VIII disociadas del complejo.
- 25
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las condiciones de cromatografía de afinidad comprenden al menos dos de las siguientes condiciones;
- una carga de resina de Factor VIII biológicamente activo de más de 20.000 UI/ml de resina;
 - carga de Factor VIII; NaCl 0,1-0,5 mol/kg, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 0,005-0,05 % (p/p), Triton X-100 0,5-2 %, TNBP 0,1-1 %, a pH 6,2-6,8;
 - 30 - lavado; NaCl 0,5-4 mol/kg, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 0,005 -0,05 % (p/p), a pH 6,2-6,8;
 - Elución de Factor VIII; NaCl 0,5-4 mol/kg, etilenglicol aproximadamente 40 -60 %, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 aproximadamente 0,005 -0,05 % (p/p), a pH 6,2-6,8.
- 35
6. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en condiciones en las que el Factor VIII se une con la resina de cromatografía de intercambio aniónico y las formas biológicamente inactivas se retiran de la resina de cromatografía de intercambio aniónico antes o después de la elución de Factor VIII biológicamente activo, en el que
- carga de Factor VIII en condiciones de baja salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,01-0,15 mol/kg para unión de Factor VIII y retirada de formas inactivas de Factor VIII, y lavado de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en condiciones de salinidad media equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,15 - 0,3 mol/kg para retirada de formas inactivas de Factor VIII, y
 - 40 - elución y recogida de Factor VIII monomérico intacto de la resina de cromatografía de intercambio aniónico en una fracción separada empleando condiciones de alta salinidad equivalentes a una concentración de cloruro sódico de 0,3 - 1 mol/kg.
- 45
7. El procedimiento según la reivindicación 2 o 6, en el que el Factor VIII biológicamente inactivo se retira mediante la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y que da como resultado una fracción de producto monomérico que comprende al menos dos de las siguientes condiciones cromatográficas:
- una carga de resina de Factor VIII biológicamente activo de al menos 10.000 UI/ml de resina, preferentemente al menos 15.000 UI/ml de resina y más preferentemente más de 20.000 UI/ml de resina;
 - 50 - condiciones de carga de Factor VIII; NaCl 0,05-0,15 mol/kg, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 0,005 -0,05 % (p/p), a pH 6,0-7,5;
 - condiciones de lavado; NaCl 0,15-0,3 mol/kg, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 0,005 -0,05 % (p/p), a pH 6,0-7,5;
 - condiciones de elución de Factor VIII; NaCl 0,3-0,5 mol/kg, CaCl₂ 0,01-0,05 mol/kg, L-histidina 0,01-0,05 mol/kg, Polisorbato 80 0,005 -0,05 % (p/p), a pH 6,0-7,5.
- 55

8. El procedimiento según la reivindicación 2, 6 o 7, en el que la resina de intercambio aniónico es un intercambiador aniónico fuerte con un ion de amina cuaternaria como ligando acoplado a una matriz de agarosa 6 % reticulada con un diámetro esférico de 45-165 μm , con una capacidad de unión a ion total de aproximadamente 0,18 - 0,25 mmol/ml.
- 5 9. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño comprende al menos dos de las siguientes condiciones:
- una carga de muestra de 4-8 % del volumen de columna,
 - una altura de columna de 60-90 cm,
 - una concentración de Factor VIII biológicamente activo en la carga de muestra de al menos 10.000 UI/ml, preferentemente al menos 15.000 UI/ml y más preferentemente más de 20.000 UI/ml,
 - un tampón de equilibrado de columna para agregación óptima de formas inactivas de Factor VIII; NaCl 0,2-0,7 mol/kg, CaCl_2 0,01-0,05 mol/kg, citrato sódico 0,01-0,05 mol/kg, sacarosa 0,5-2 % (p/p), L-arginina 0,5-2 % (p/p), Poloxámero 188 0,1-1 % (p/p), a pH 6,0-7,5,
- 10 en el que el Factor VIII biológicamente activo se recoge en la forma monomérica, mientras que el Factor VIII inactivo se encuentra en el máximo agregado y/o en la fracción de máximo fragmentado de una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño, y
- 15 - la recogida de monómero de Factor VIII comienza cuando se registra un máximo de absorbancia de 30-40 mUA después de la columna y se detiene cuando el máximo de absorbancia vuelve a 1-40 mUA, relacionado con 2-3 veces la cantidad de aplicación de muestra.
- 20 10. El procedimiento según la reivindicación 3 o 9, en el que la resina de cromatografía de exclusión por tamaño es un medio de agarosa/dextrano reticulado esférico con un diámetro medio de 34 μm y un intervalo de separación óptimo entre 10.000 - 600.000 Dalton.
11. Un producto de Factor VIII que puede obtenerse según el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de la hemofilia y que evita la formación de inhibidores, siendo dicho producto estable, en particular manteniendo su actividad biológica, alto contenido de Factor VIII monomérico y bajo contenido de Factor VIII agregado, en condición congelada y/o liofilizada durante al menos 6 meses, preferentemente durante al menos 12 meses, más preferentemente durante al menos 24 meses y más preferentemente hasta 36 meses.
- 25 12. El producto de Factor VIII para su uso según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el cociente de Factor VIII biológicamente activo (FVIII:C) en relación con la cantidad total de Factor VIII (FVIII:Ag) es $\geq 0,7$, preferentemente $\geq 0,8$, más preferentemente $\geq 0,9$ y más preferentemente 1, y el contenido de monómero de Factor VIII es de ≥ 98 %, preferentemente, ≥ 99 % y más preferentemente 100 % después de la última etapa y puede detectarse ese Factor VIII esencial no agregado.
- 30 13. El producto de Factor VIII para su uso según la reivindicación 10 o 12, **caracterizado porque** la molécula de Factor VIII se obtiene de plasma, se obtiene por recombinación y/o se obtiene por supresión o es una forma truncada de Factor VIII con actividad biológica, en particular FVIII con supresión del dominio B.
- 35 14. El producto de Factor VIII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que se produce de forma recombinante, opcionalmente un derivado de supresión, y se produce en células humanas.
- 40 15. El producto de Factor VIII para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizado porque** la cantidad de inhibidores en enfermos de hemofilia A previamente tratados o no tratados, tratados con el producto, es 25 %, preferentemente < 20 %, más preferentemente < 10 % y más preferentemente 0 %.

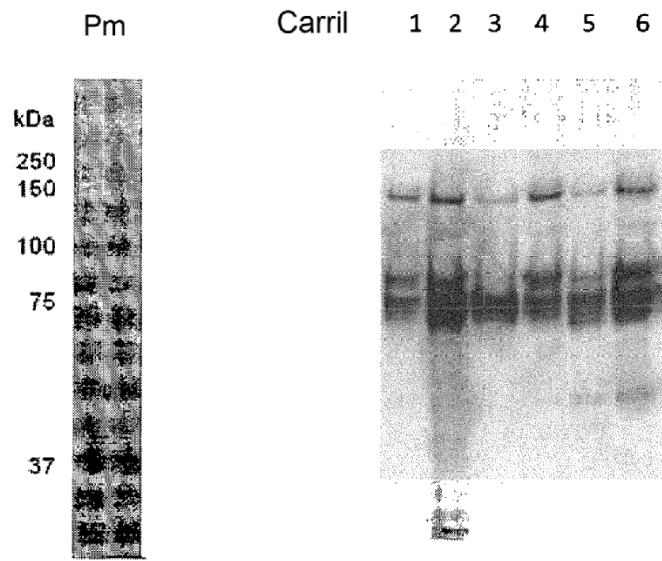


Fig.1

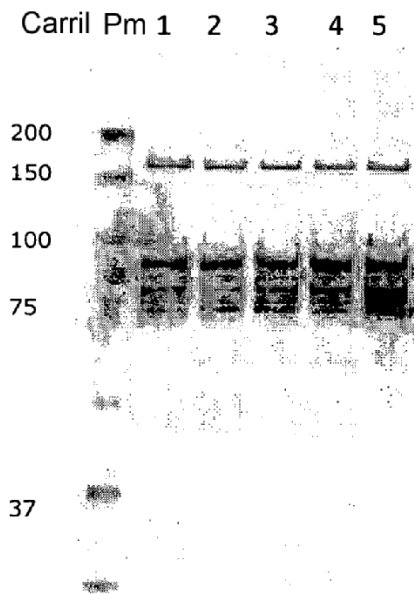


Fig.2

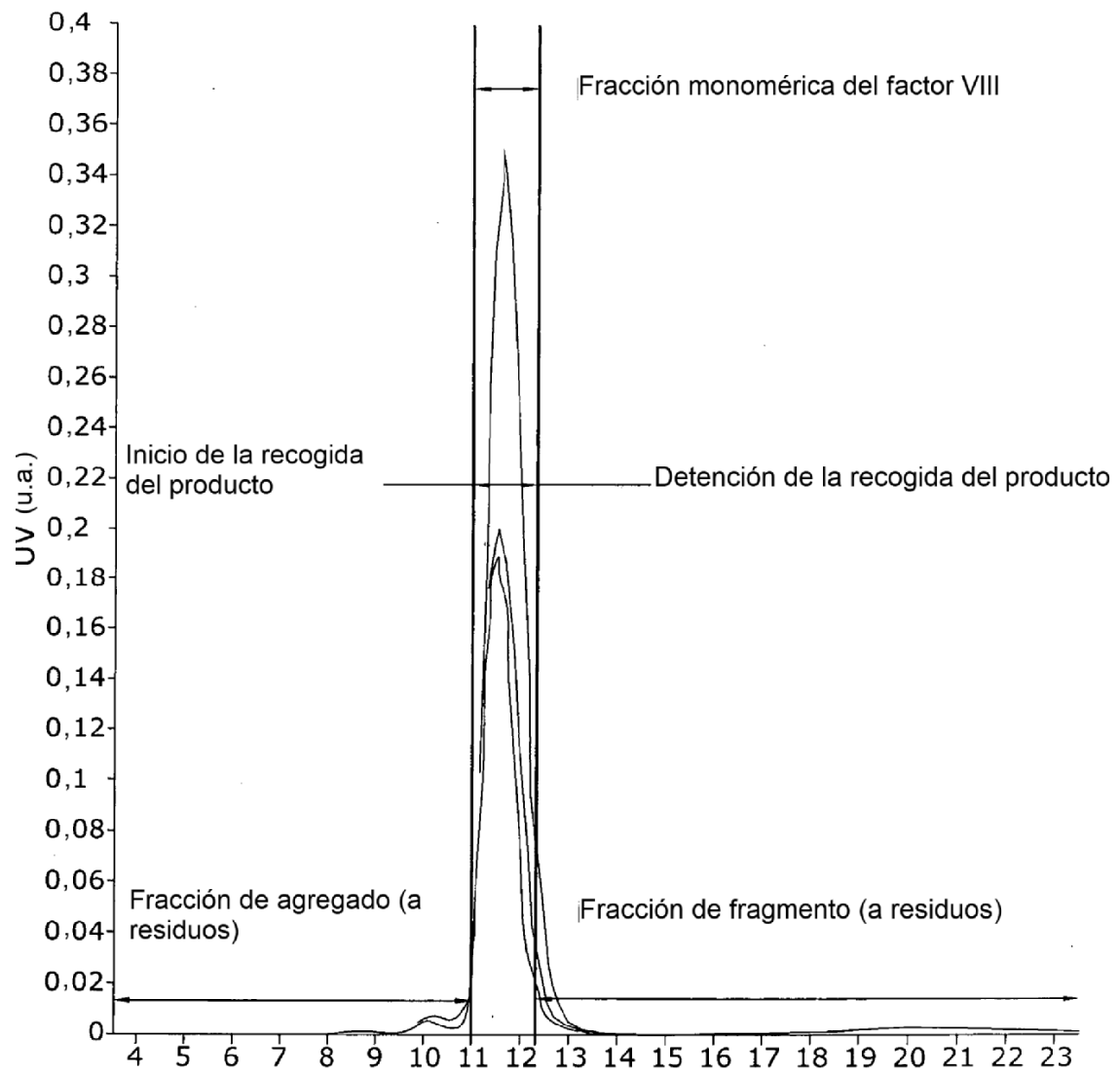
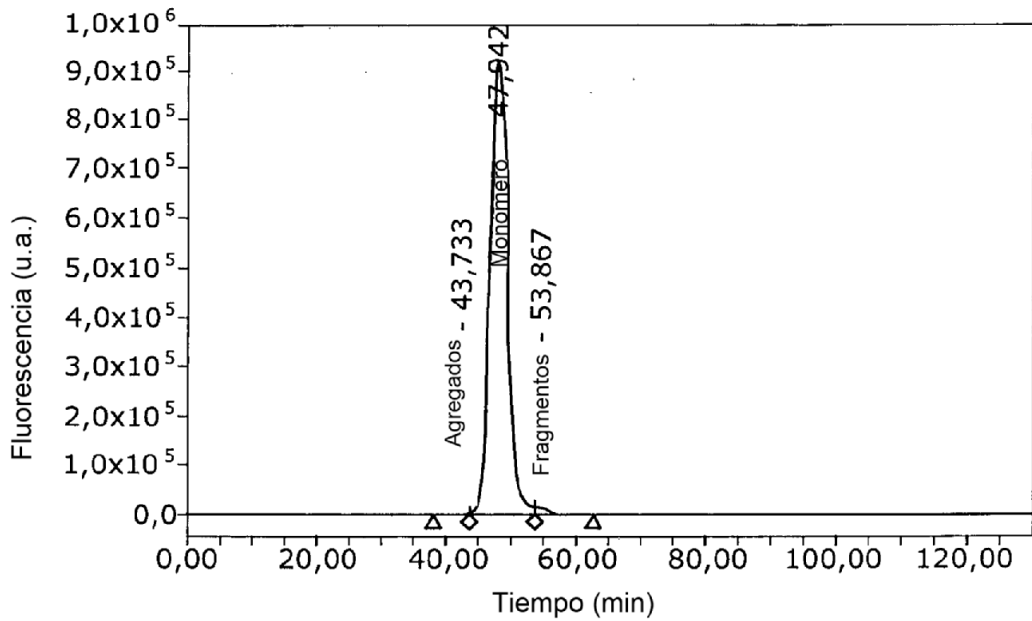


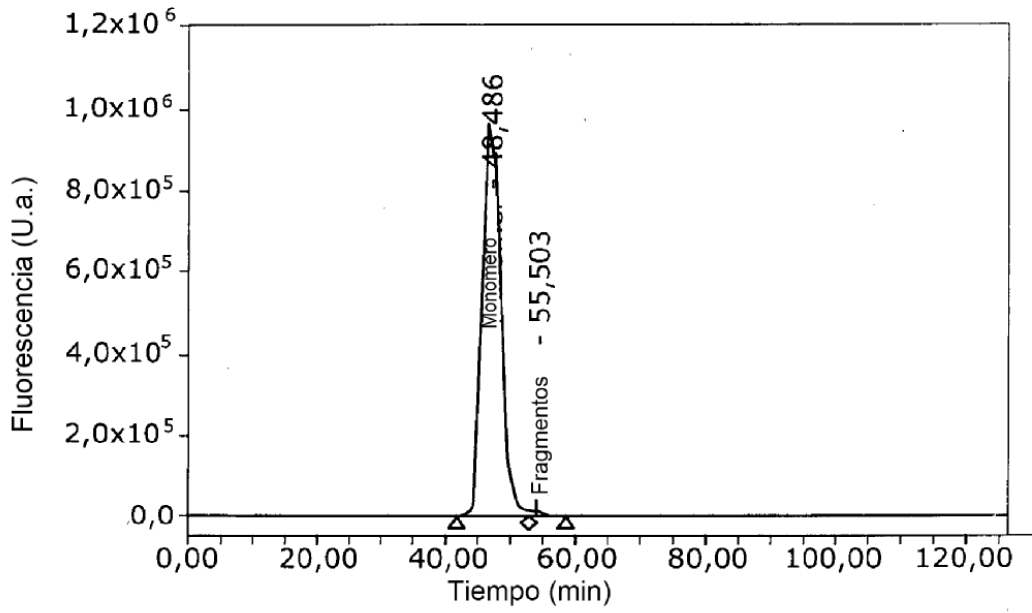
Fig.3



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,733	6227383671	35382918	0,37
2	Mómonero	47,942	1645961644105	8946052109	98,38
3	Fragmentos	53,867	20849064219	131492051	1,25

Fig.4



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	48,486	1731766628142	9310597689	99,13
3	Fragmentos	55,503	15214565882	93748054	0,87

Fig.5

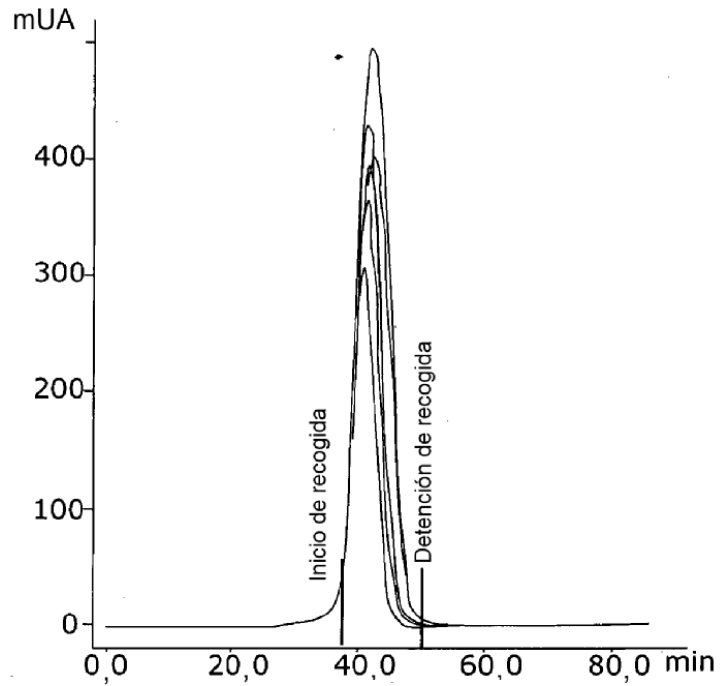
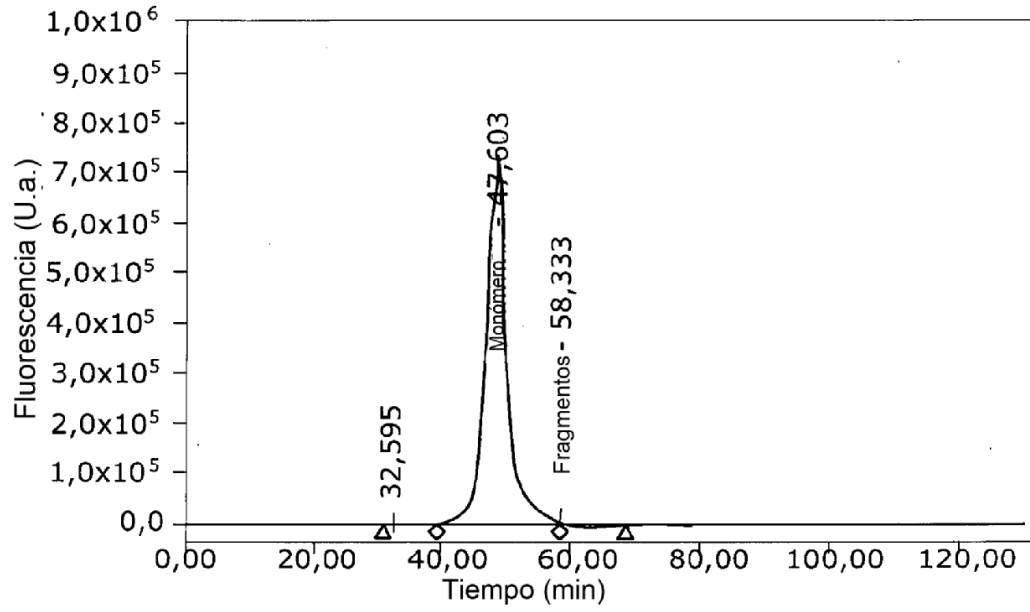


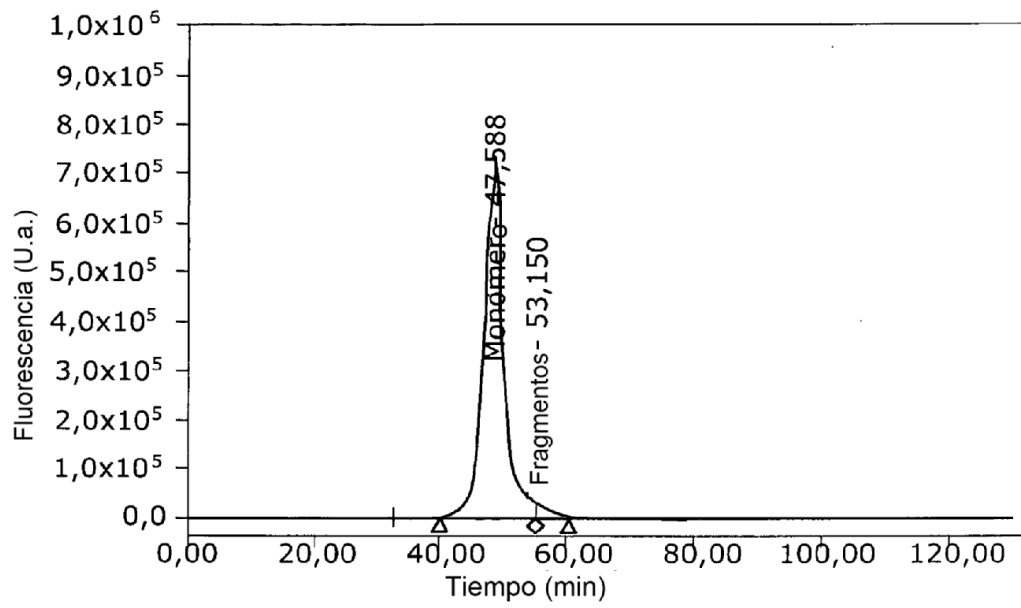
Fig.6



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1		32,595	12485306608	55110837	0,68
2	Agregados	43,000			
3	Monómero	47,603	1787884705383	7152198232	97,21
4	Fragmentos	58,333	38908497096	171225327	2,12

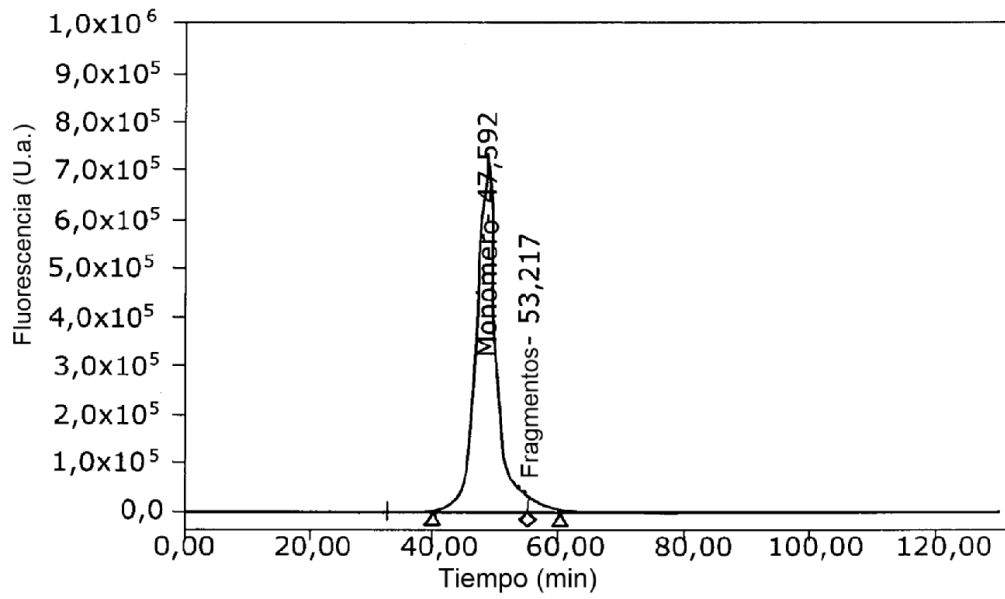
Fig.7



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,588	1768269027462	9172995796	98,42
3	Fragmentos	53,150	28304093640	168373476	1,58

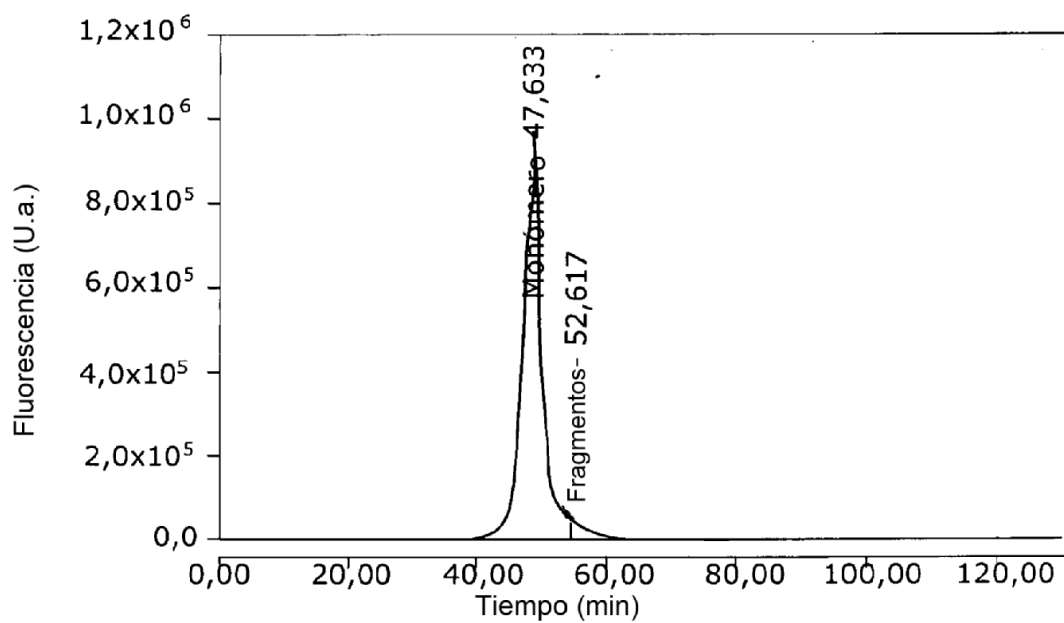
Fig.8



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,592	1719232994028	8904449926	98,31
3	Fragmentos	53,217	29509101684	167045410	1,69

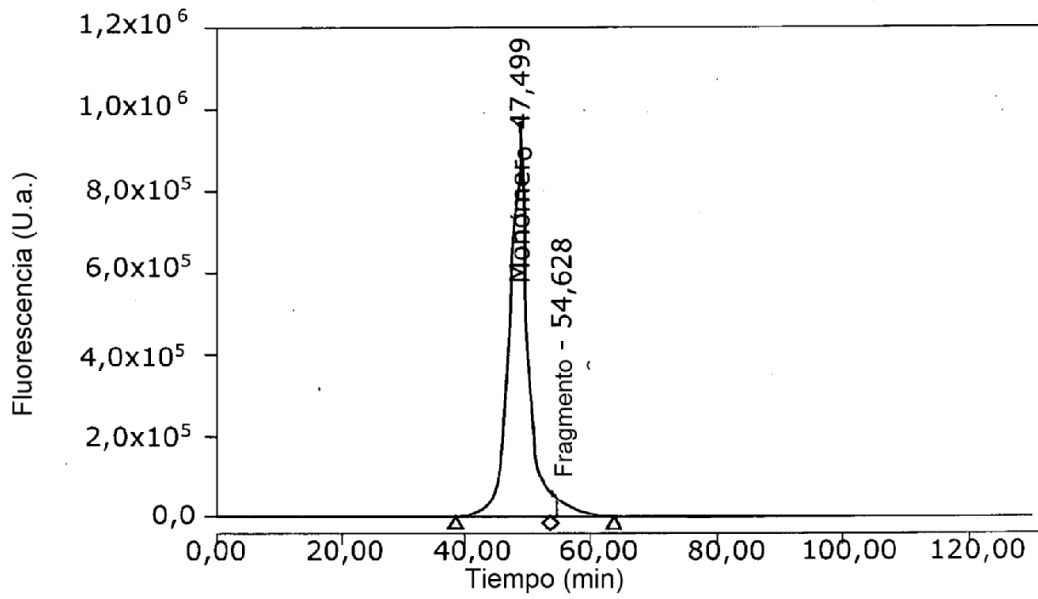
Fig.9



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,633	1893442741446	9902048058	98,50
3	Fragmentos	52,617	28802684958	192960787	1,50

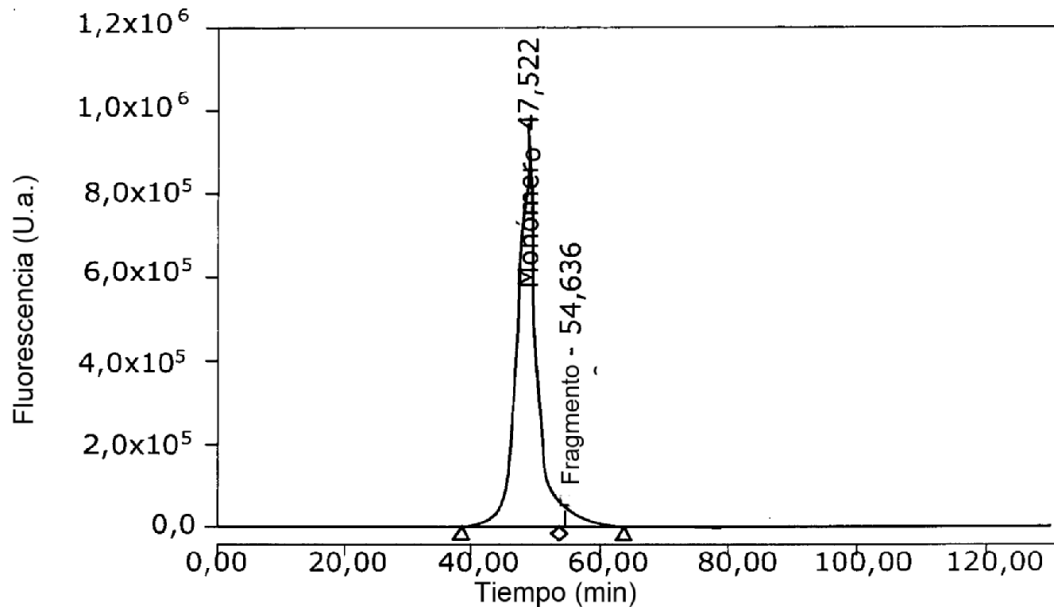
Fig.10



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,499	1773602574318	9231478934	98,96
3	Fragmentos	54,628	18594141020	99103234	1,04

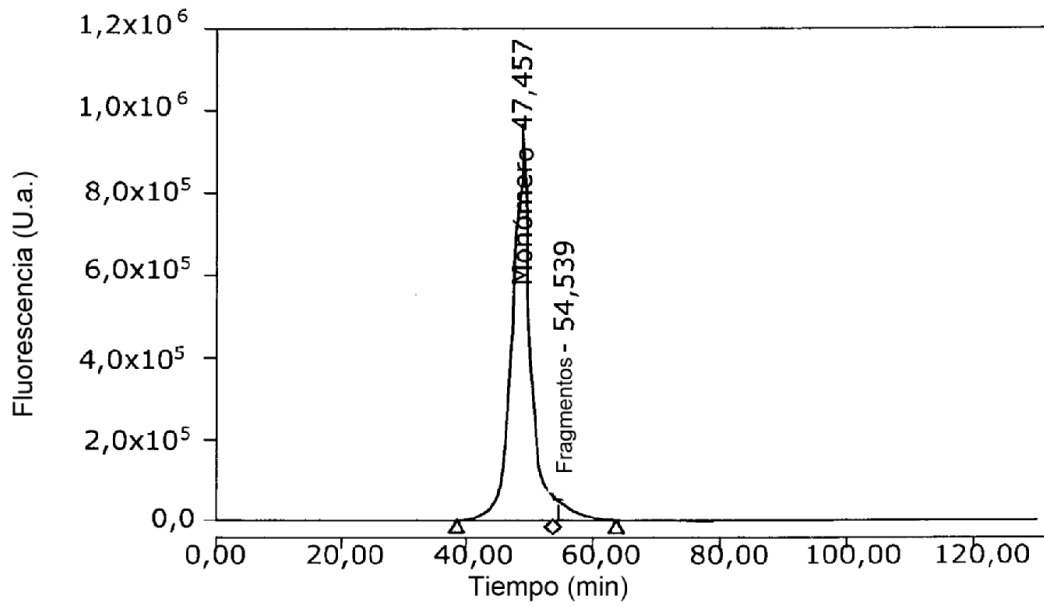
Fig.11



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,522	1719646080820	8891551115	98,85
3	Fragmentos	54,636	19988833478	108669274	1,15

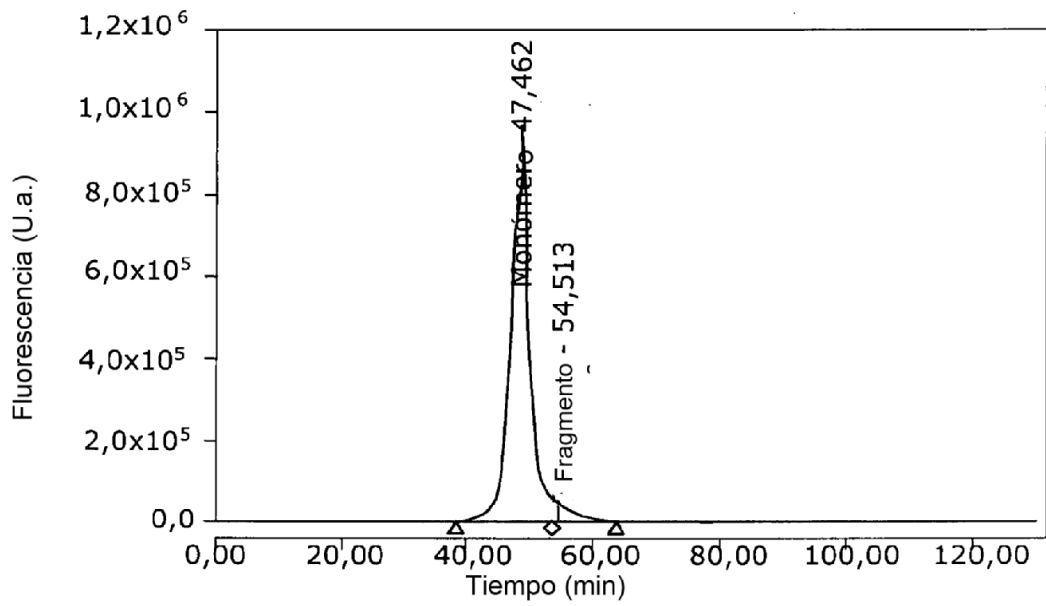
Fig.12



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,522	1723045643516	8891011635	98,83
3	Fragmentos	54,636	20428784717	109598314	1,17

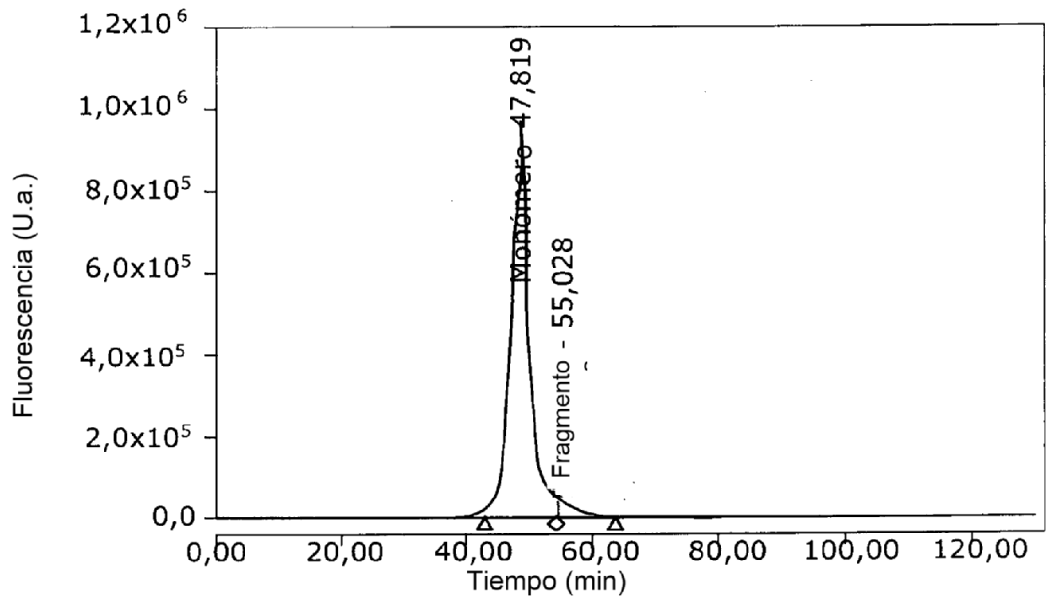
Fig.13



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,462	1723203354445	8844566443	98,63
3	Fragmentos	54,513	23977018029	123642477	1,37

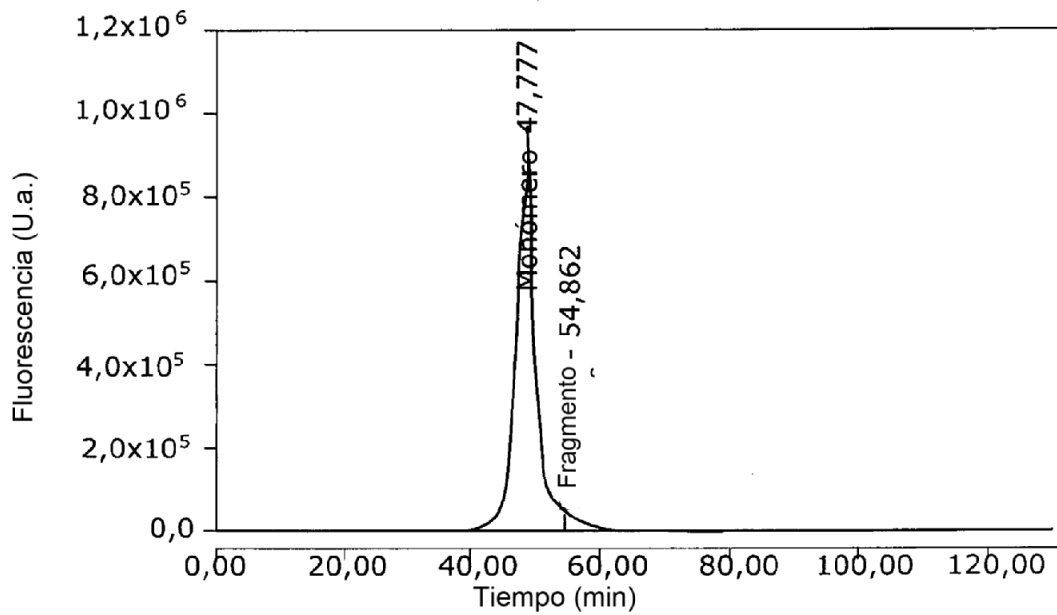
Fig.14



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,819	1988098733983	10056547853	99,21
3	Fragmentos	55,028	15884854019	97214607	0,79

Fig.15



Resultados máximos

	Nombre	RT	Área	Altura	% Área
1	Agregados	43,000			
2	Monómero	47,777	1960828944611	10028945141	98,72
3	Fragmentos	54,862	25412047468	133330008	1,28

Fig.16

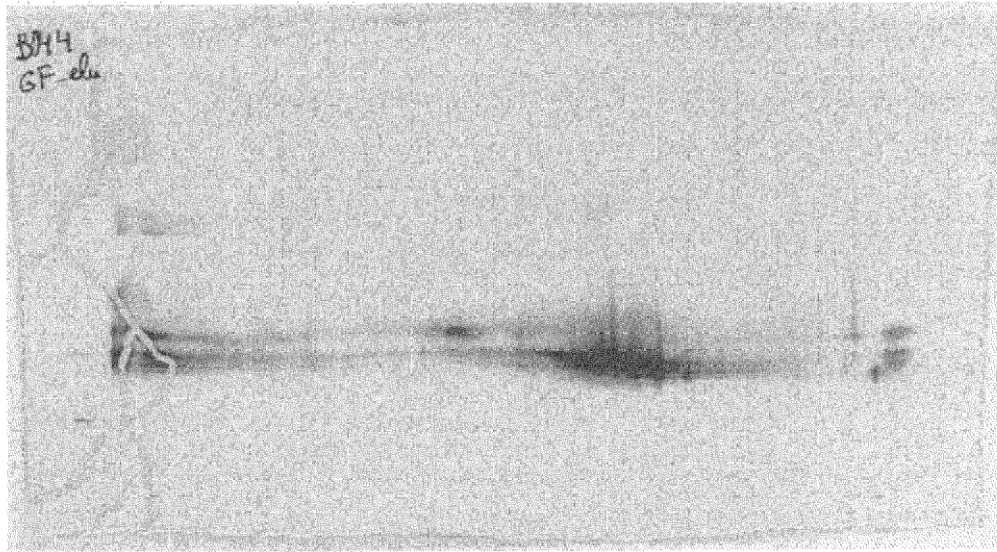


Fig.17

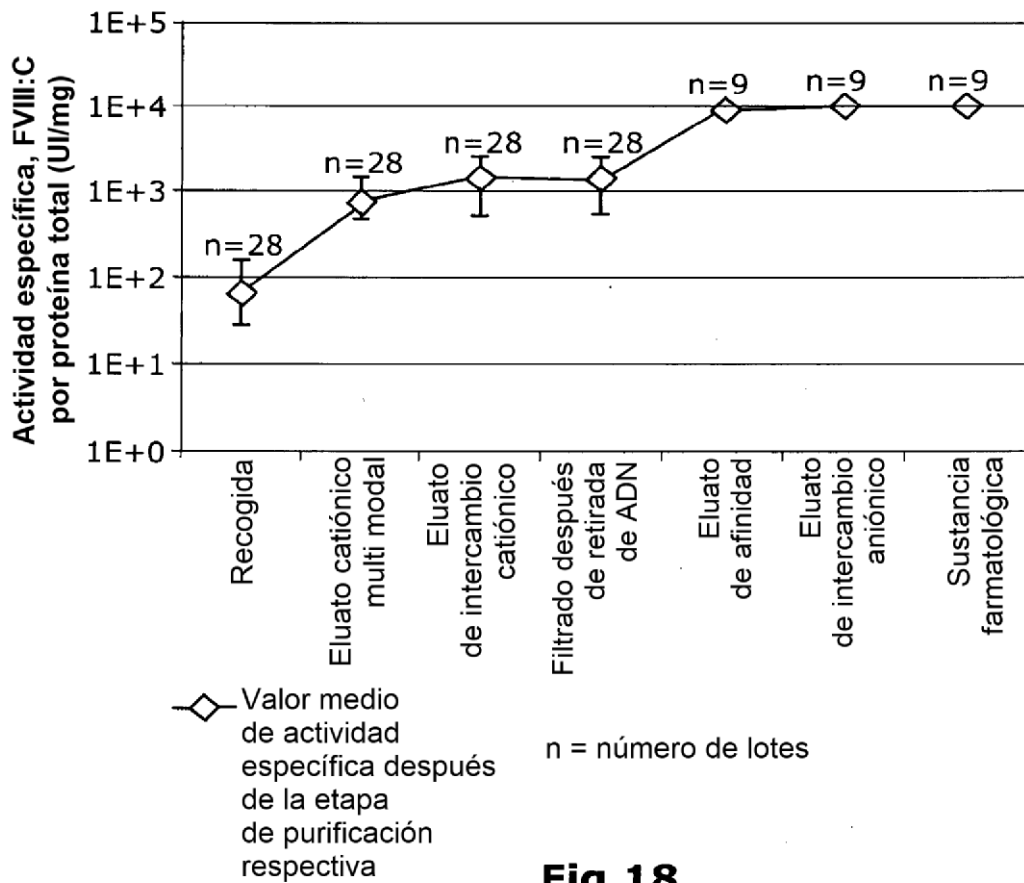
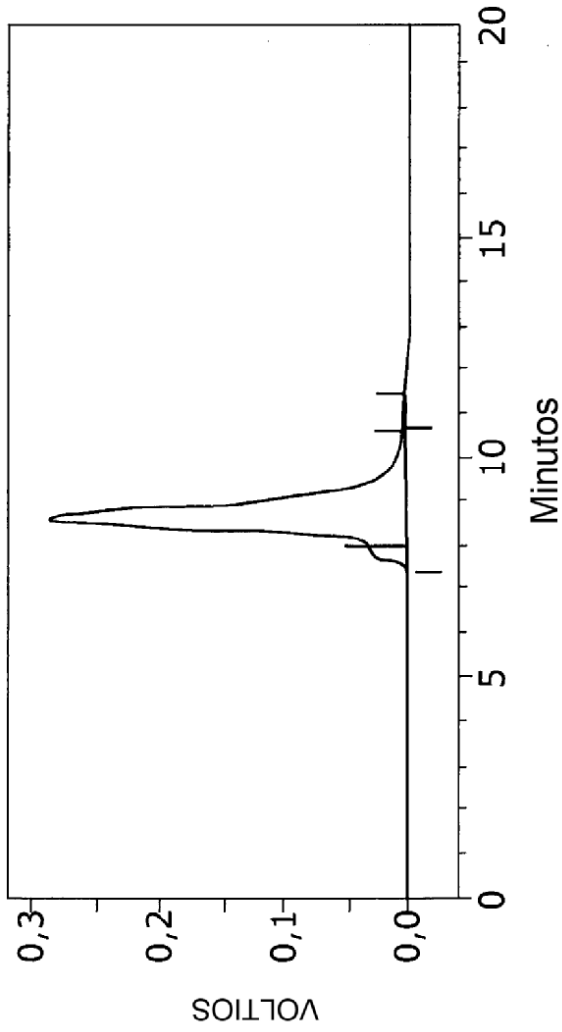


Fig.18



Nombre del N.º de pico	Tiempo de retención	Área	Porcentaje de área	Altura	Porcentaje de altura	Tiempo de inicio de detención	Tiempo de detención
1	7,908	640850	4,73	30498	9,71	7,41	8,03
2	8,650	12885498	95,01	282045	89,81	8,03	10,69
3	10,933	36470	0,27	1500	0,48	10,78	11,56

Fig.19

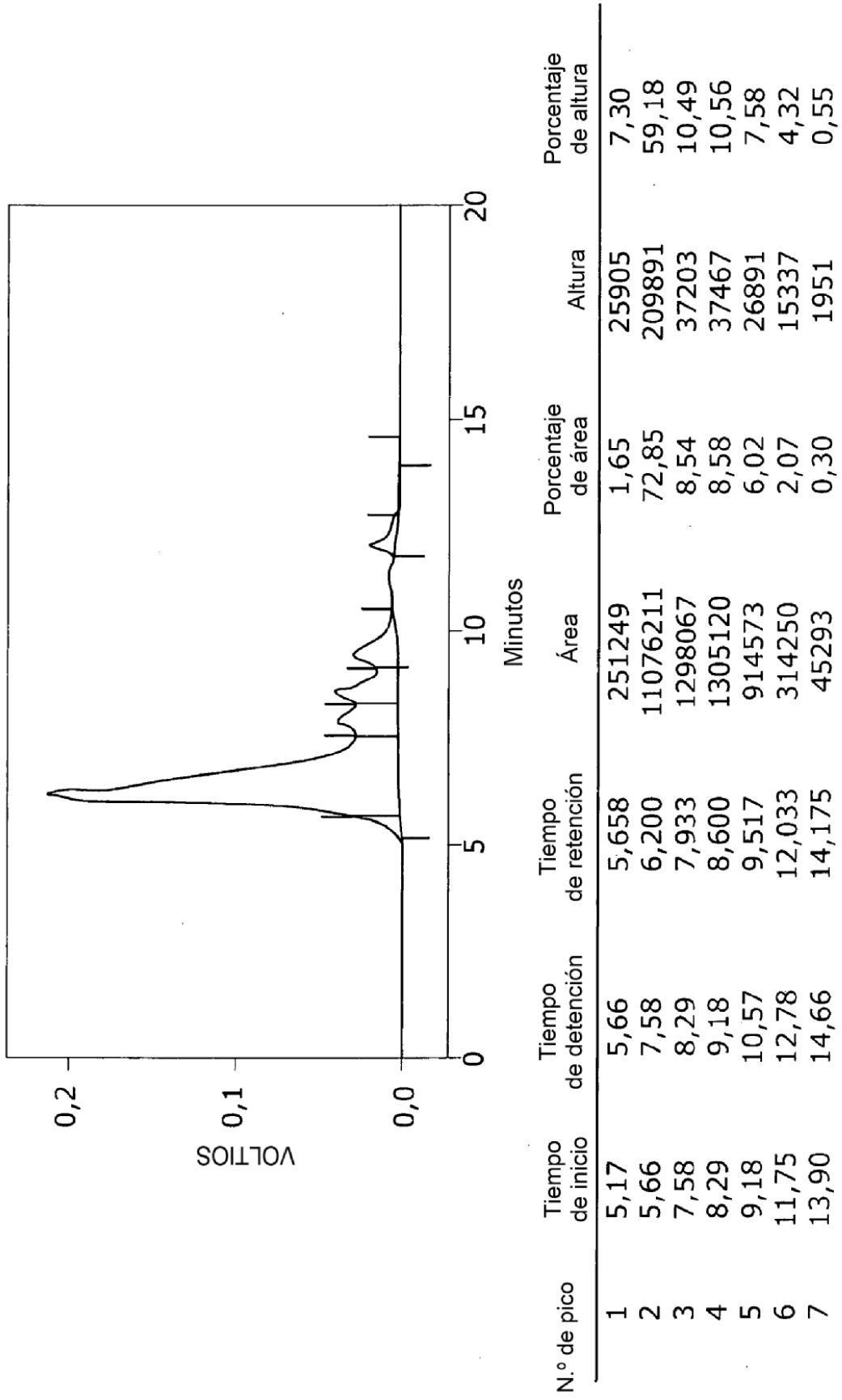


Fig.20

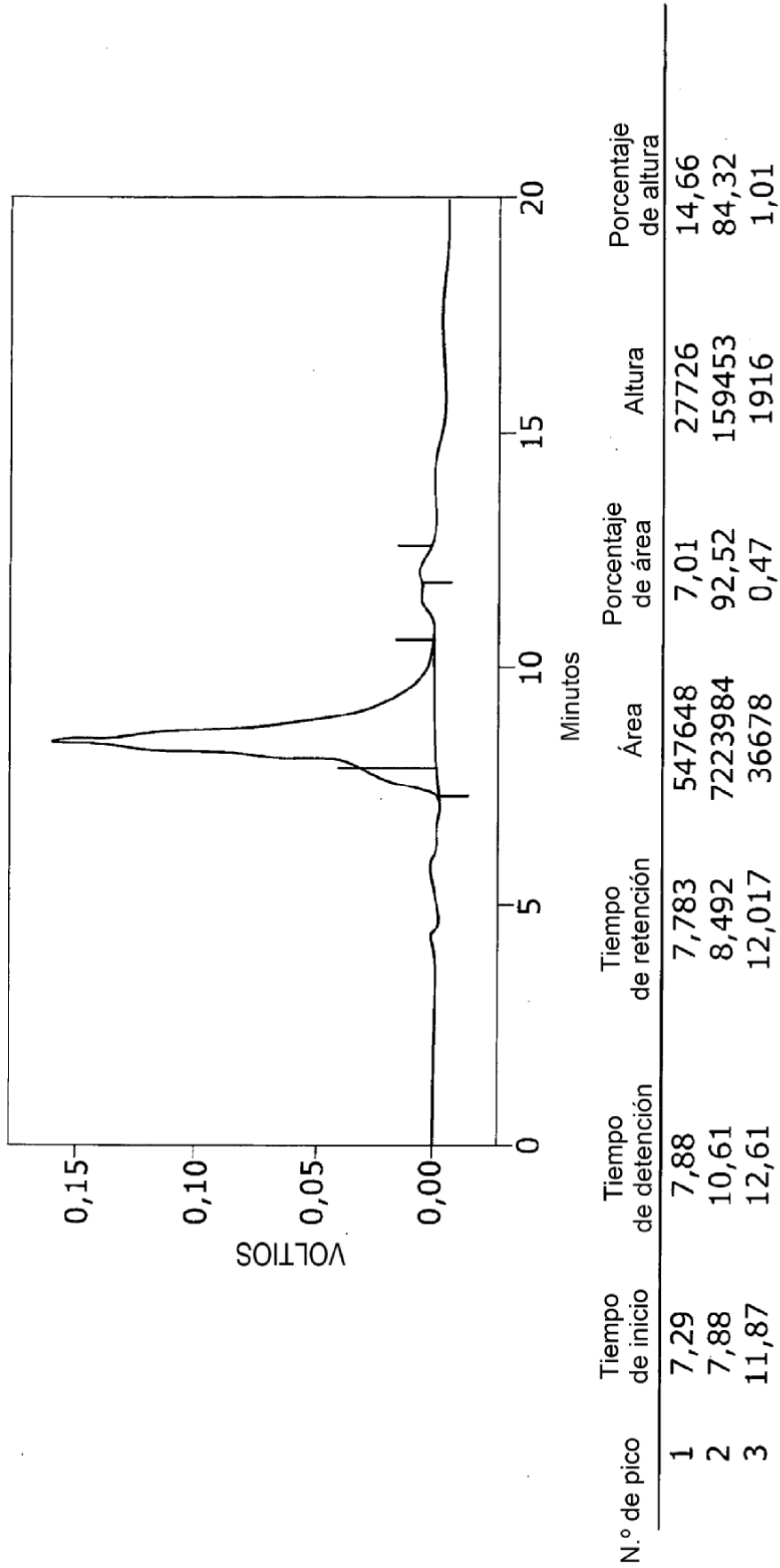


Fig.21

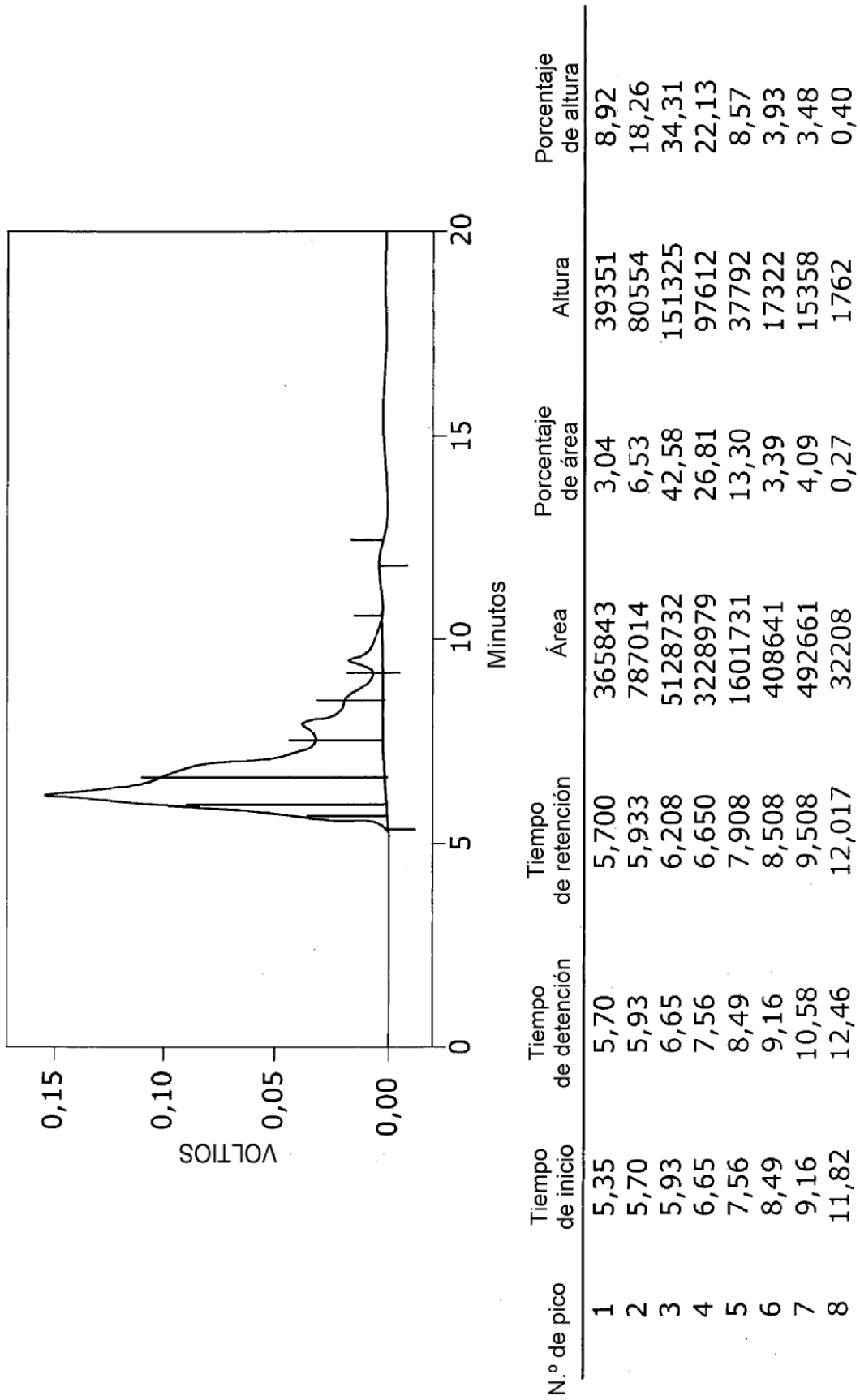


Fig.22

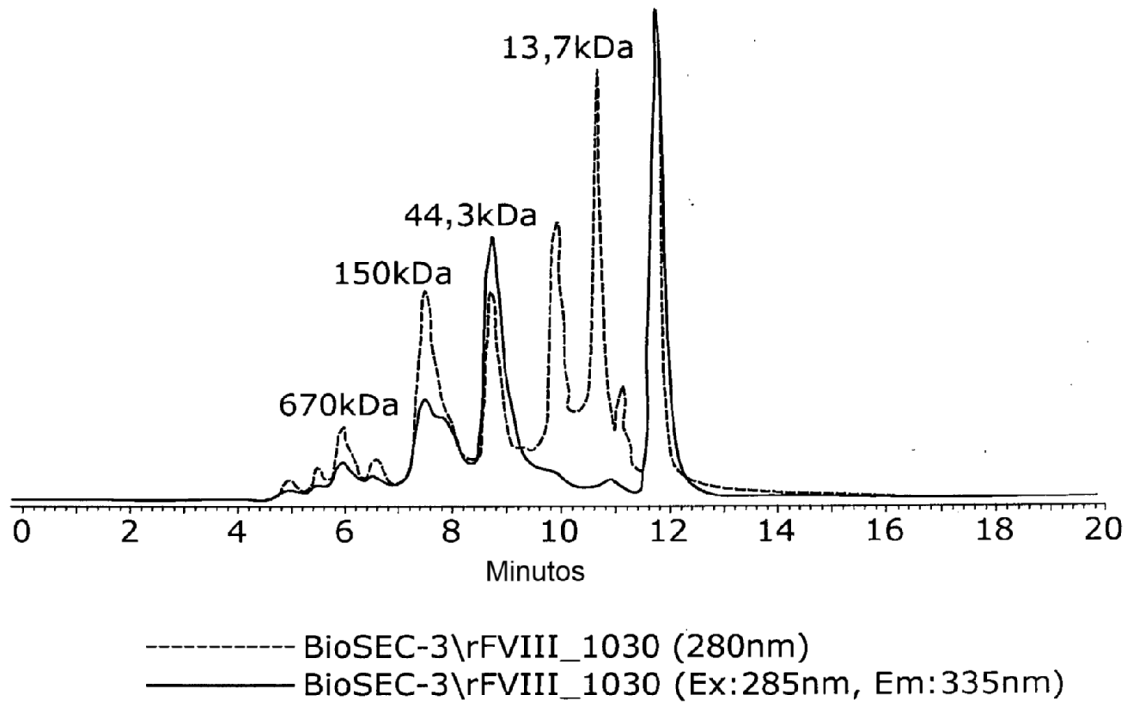


Fig.23