(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 752 177**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2015 PCT/US2015/044863**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16025601**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2015 E 15759575 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3180355**

(54) Título: **Activación de factor X**

(30) Prioridad:

12.08.2014 US 201462036402 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

HASSLACHER, MEINHARD;
GATTERNIG, THOMAS;
FIEDLER, CHRISTIAN;
BOHM, EMST;
DOCKAL, MICHAEL y
HORLING, FRANZISKA

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 752 177 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

Activación de factor X

Antecedentes

El factor de coagulación X, también denominado FX, F10, epónimo factor de Stuart-Prower y trombocinasa, es una proteasa plasmática dependiente de la vitamina K que activa la trombina. Inicialmente sintetizado en el hígado como un precursor de cadena sencilla, el FX se activa mediante rutas tanto intrínsecas como extrínsecas para formar FX activado (FXa), que consiste en cadenas ligeras y pesadas unidas por enlaces disulfuro. La cadena ligera contiene dominios de ácido γ-carboxiglutámico (Gla) y dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF), mientras que la cadena pesada corresponde al dominio de serina proteasa. FXa contribuye a la acción del concentrado de complejo de protrombina y se ha identificado como un componente activo en la actividad de derivación del factor ocho (FEIBA). FEIBA puede usarse para tratar pacientes con hemofilia que desarrollan anticuerpos inhibidores de FVIII o FIX.

Si bien FX puede purificarse a partir de plasma humano o producirse de manera recombinante, sólo en su estado activado (FXa) afecta al proceso de coagulación de la sangre. Esta activación se produce a partir de la escisión del enlace peptídico Arg52-Ile53 en la cadena pesada de FX, liberando el péptido de activación. Los métodos convencionales de activación de FX normalmente emplean agentes exógenos tales como proteasas.

Sumario

Los aspectos divulgados en el presente documento incluyen métodos para activar el factor X (FX) sin la adición de agentes exógenos. En una realización, el FX se activa a través de la asociación del FX con una resina de cromatografía.

Los aspectos adicionales incluyen sistemas para activar el FX. En una realización, el sistema incluye FX en un medio líquido y una resina de cromatografía de intercambio aniónico. En una realización, el medio líquido es acuoso.

Los aspectos incluyen eluir el FX activado 2 horas después de comenzar la etapa de carga del FX en la resina de cromatografía.

Los aspectos incluyen eluir el FX activado 5 horas después de comenzar la etapa de carga del FX en la resina de cromatografía.

Los aspectos incluyen eluir el FX activado 10 horas después de comenzar la etapa de carga del FX en la resina de cromatografía.

Los aspectos incluyen eluir el FX activado 20 horas después de comenzar la etapa de carga del FX en la resina de cromatografía.

Los aspectos adicionales divulgados en el presente documento incluyen unir el FX a una conductividad de 8 mS/cm o menos.

Los aspectos adicionales divulgados en el presente documento incluyen unir el FX a un pH de entre 8 y 10.

Los aspectos adicionales divulgados en el presente documento incluyen cargar el FX a más de 0,5 mg por ml de resina de intercambio aniónico. En determinados aspectos, las etapas de unión y elución se realizan a una temperatura de más de 8ºC.

Los métodos divulgados en el presente documento incluyen un tampón de elución que comprende un catión divalente o un contraión. En determinados métodos, el contraión es al menos uno de cloruro, acetato, citrato, sulfato o fosfato. En determinados métodos divulgados en el presente documento, la concentración del catión divalente o contraión o ambos en el tampón de elución aumenta a lo largo del tiempo.

Los aspectos divulgados en el presente documento incluyen un tampón de elución con una conductividad entre 1 y 100 mS/cm a 25ºC. Los aspectos adicionales incluyen ligandos de intercambio iónico que son al menos uno de amonio cuaternario [Q], dietilaminoetilo [DEAE], dietilaminopropilo [ANX] o amina primaria. Los aspectos adicionales incluyen materiales de intercambio iónico que son una matriz derivada de al menos uno de poliestireno, poli(metacrilato de metilo), polivinilbenceno, polivinilpiridina, poli(estireno-divinilbenceno) reticulado, Sepharose y agarosa reticulada. En determinados aspectos, el material de intercambio iónico es un material de intercambio aniónico.

En las realizaciones, el material de intercambio iónico comprende al menos uno de POROS® 50 HQ (medios de

intercambio iónico fuerte basados en grupo funcional de polietilenimina cuaternizada; Life Technologies), POROS® PI (medios de intercambio iónico débil basados en grupo funcional de polietilenimina; Life Technologies), POROS® D (medios de intercambio iónico débil; Life Technologies), Q SEPHAROSE® FF (Q Sepharose Fast Flow, perlas de agarosa al 6% reticuladas, con grupos de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario, GE Healthcare Life Sciences), Q SEPHAROSE® HP (perlas de agarosa reticuladas con un diámetro medio de 34 μm, modificadas con grupos de intercambio aniónico fuerte cuaternarios, GE Healthcare Life Sciences), ESHMUNO® Q (intercambior aniónico fuerte con grupos funcionales de trimetilamoniometilo reticulado a polímero hidrófilo de polivinil éter rígido injertado en superficie, Merck Millipore), FRACTOGEL® TMAE (intercambiador aniónico fuerte sintético de perlas poliméricas basadas en metacrilato con grupos funcionales de trimetilamoniometilo, EMD Millipore), FRACTOGEL® EMD DEAE (intercambiador aniónico débil sintético de perlas poliméricas basadas en metacrilato con grupos funcionales DEAE, EMD Millipore), FRACTOGEL® EMD DMAE (intercambiador aniónico débil sintético de perlas poliméricas basadas en metacrilato con grupos funcionales dimetilaminoetanol, EMD Millipore), Q Ceramic HYPERD® F (hidrogel de alta capacidad polimerizado dentro de gigaporos de una perla de cerámica rígida con grupos funcionales de amonio cuaternario, Pall Corporation), MUSTANG® Q (soporte de intercambio aniónico con grupos funcionales de amina cuaternaria colgantes en un recubrimiento polimérico reticulado sobre una membrana de tamaño de poro de 0,8 micrómetros, Pall Corporation), DEAE SEPHAROSE® Fast Flow (perlas de agarosa al 6% reticuladas, con grupos de intercambio aniónico débil DEAE, GE Healthcare Life Sciences), ANX SEPHAROSE® 4 Fast Flow (derivado de agarosa al 4% altamente reticulado con grupos de amina terciaria de intercambio aniónico débil, GE Healthcare Life Sciences), Q SEPHAROSE® XL (matriz de agarosa al 6% formada por perlas altamente reticuladas con cadenas de dextrano que están acopladas de manera covalente a la matriz de agarosa y modificadas con grupos de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario, GE Healthcare Life Sciences), perlas grandes de Q SEPHAROSE® (perlas de agarosa reticuladas [100-300 μm] modificadas con grupos de intercambio catiónico fuerte de sulfonato, GE Healthcare Life Sciences), DEAE SEPHADEX® (intercambior aniónico débil de matriz de dextrano reticulado con grupos funcionales DEAE, GE Healthcare Life Sciences), QAE SEPHADEX® (intercambior aniónico fuerte de matriz de dextrano reticulado con grupos funcionales dietil-(2-hidroxipropil)aminoetilo, GE Healthcare Life Sciences), SOURCE™ 15Q (intercambior aniónico fuerte basado en matriz polimérica de poliestireno rígido/divinilbenceno de monotamaño de 15 μm modificada con grupos funcionales de amonio cuaternario, GE Healthcare Life Sciences), Source 30Q (intercambior aniónico fuerte basado en matriz polimérica de poliestireno rígido/divinilbenceno de monotamaño de 30 μm modificada con grupos funcionales de amonio cuaternario, GE Healthcare Life Sciences), Capto Q (matriz de agarosa de alto flujo y rígida modificada con extensores de superficie de dextrano y un intercambior aniónico de amonio cuaternario fuerte, GE Healthcare Life Sciences), Capto DEAE (matriz de agarosa de alto flujo y rígida modificada con extensores de superficie de dextrano y un intercambior aniónico de DEAE débil, GE Healthcare Life Sciences), Mono Q (intercambior aniónico fuerte de monoperlas conjugadas con intercambior aniónico de amonio cuaternario fuerte, GE Healthcare Life Sciences), TOYOPEARL® Super Q (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con grupo funcional de intercambior aniónico fuerte, Tosoh Bioscience), TOYOPEARL® DEAE (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con grupo funcional de intercambior aniónico débil, Tosoh Bioscience), TOYOPEARL® QAE (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con grupo funcional de intercambior aniónico fuerte, Tosoh Bioscience), TOYOPEARL® Q (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con grupo funcional de intercambior aniónico fuerte, Tosoh Bioscience), TOYOPEARL® GigaCap Q (resina polimérica de metacrilato hidroxilado modificada para proporcionar un mayor número de sitios de unión aniónicos con grupo funcional de intercambior aniónico fuerte, Tosoh Bioscience), TSKgel® SuperQ (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con un alto grado de reticulación con grupo funcional de intercambior aniónico fuerte, Tosoh Bioscience), TSKgel® DEAE (resina polimérica de metacrilato hidroxilado con un alto grado de reticulación con grupo funcional de intercambior aniónico débil, Tosoh Bioscience), MACROPREP® High Q (resina de intercambio aniónico fuerte que contiene perlas de copolímero de metacrilato unidas a grupos funcionales de amina cuaternaria, Bio-Rad), MACROPREP® DEAE (resina de intercambio aniónico débil que contiene perlas de copolímero de metacrilato unidas a grupos funcionales de DEAE, Bio-Rad), UNOSPHERE™ Q (resina de intercambio aniónico fuerte que contiene un soporte polimérico hidrófilo unido a grupos funcionales de amina cuaternaria, Bio-Rad) y NUVIA™ Q (resina de intercambio aniónico fuerte que contiene un soporte polimérico hidrófilo con extensores de superficie unidos a grupos funcionales de amina cuaternaria, Bio-Rad).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gel de SDS-PAGE de muestras de FX: se muestran el material de partida recombinante (rFX) para la activación (carril “rFX”), muestras numeradas 1-4 y 1-8 que contienen rFXa (FX recombinante y activado) después de la etapa de activación (carriles “rFX + rFXa n.º 1-4” y “rFX + rFXa n.º 1-8”) y FXa derivado de plasma (pd) (carril “pdFXa”). Después de la electroforesis, se hicieron visibles las bandas de proteína mediante tinción con Coomassie. En el carril más a la izquierda, se muestra un marcador de peso molecular. Las bandas correspondientes a FX y FXa están marcadas.

Descripción detallada

Diversas realizaciones divulgadas en el presente documento incluyen métodos para producir, purificar, almacenar y activar FX. En determinadas realizaciones, el FX puede activarse sin la adición de agentes exógenos. Por ejemplo, el FX puede unirse a un material de cromatografía durante un periodo de contacto para activar el FX. En una

realización, el FX puede unirse a una resina de intercambio iónico. Después de la unión, el FX puede activarse para producir FXa y luego eluirse de la resina.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se han usado números enteros completos por conveniencia y no se pretende que sean limitativos. Por ejemplo, “pH 4” puede incluir pH cercanos a 4 tales como, pero sin limitarse a, 3,8, 3,9, 4,1, 4,2, etc. El término “aproximadamente” se usa para indicar que estos pequeños intervalos inherentes y desviaciones de los números enteros completos se consideran parte de las realizaciones descritas y reivindicadas en el presente documento. Cuando se usa un intervalo, por ejemplo, y no se pretende que sea una limitación, entre aproximadamente 10 y 15 mS/cm, se incluyen todas las fracciones asociadas con los valores intermedios.

Producción de FX

En determinadas realizaciones, el FX puede comprender FX de mamífero, por ejemplo FX de tipo natural o variantes de FX tales como variantes conservadoras de FX. Una variante conservadora se refiere a una proteína o un polipéptido que tiene al menos un aminoácido sustituido por otro aminoácido o un análogo de aminoácido que tiene al menos una propiedad similar a la del aminoácido original de un péptido de referencia a modo de ejemplo. Los ejemplos de propiedades incluyen, sin limitación, tamaño similar, topografía, carga, hidrofobicidad, hidrofilicidad, lipofilicidad, capacidad de formar enlaces covalentes, capacidad de formar enlaces de hidrógeno, una propiedad físicoquímica, o similares, o cualquier combinación de las mismas. Una sustitución conservadora puede evaluarse mediante una variedad de factores, tales como, por ejemplo, las propiedades físicas del aminoácido que va a sustituirse (tabla 1) o cómo el aminoácido original toleraría una sustitución (tabla 2) (se usan los códigos de aminoácido de la IUPAC en las tablas 1 y 2). Las selecciones de qué aminoácido puede sustituirse por otro aminoácido en un péptido divulgado en el presente documento se conocen por un experto habitual en la técnica. Una variante conservadora puede funcionar sustancialmente de la misma manera que la proteína o el polipéptido de referencia a modo de ejemplo, y puede sustituirse por la proteína o el polipéptido de referencia a modo de ejemplo en cualquier aspecto de la presente memoria descriptiva.

Tabla 1. Propiedades de aminoácidos

Propiedad	Aminoácidos
Alifático	G, A, I, L, M, P, V
Aromático	F, H, W, Y
C-beta ramificado	I, V, T
Hidrófobo	C, F, I, L, M, V, W
Pequeño polar	D, N, P
Pequeño no polar	A, C, G, S, T
Grande polar	E, H, K, Q, R, W, Y
Grande no polar	F, I, L, M, V
Cargado	D, E, H, K, R
No cargado	C, S, T
Negativo	D, E
Positivo	H, K, R
Ácido	D, E
Básico	K, R
Amida	N, Q

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos

Aminoácido	Sustitución favorecida	Sustituciones neutras	Sustitución desfavorecida
A	G, S, T	C, E, I, K, M, L, P, Q, R, V	D, F, H, N, Y, W
C	F, S, Y, W	A, H, I, M, L, T, V	D, E, G, K, N, P, Q, R
D	E, N	G, H, K, P, Q, R, S, T	A, C, I, L,
E	D, K, Q	A, H, N, P, R, S, T	C, F, G, I, L, M, V, W, Y
F	M, L, W, Y	C, I, V	A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T

G	A, S	D, K, N, P, Q, R	C, E, F, H, I, L, M, T, V, W, Y
H	N, Y	C, D, E, K, Q, R, S, T, W	A, F, G, I, L, M, P, V
I	V, L, M	A, C, T, F, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, W
K	Q, E, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
L	F, I, M, V	A, C, W, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
M	F, I, L, V	A, C, R, Q, K, T, W, Y	D, E, G, H, N, P, S
N	D, H, S	E, G, K, Q, R, T	A, C, F, I, L, M, P, V, W, Y
P	-	A, D, E, G, K, Q, R, S, T	C, F, H, I, L, M, N, V, W, Y
Q	E, K, R	A, D, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
R	K, Q	A, D, E, G, H, M, N, P, S, T	C, F, I, L, V, W, Y
S	A, N, T	C, D, E, G, H, K, P, Q, R, T	F, I, L, M, V, W, Y
T	S	A, C, D, E, H, I, K, M, N, P, Q, R, V	F, G, L, W, Y
V	I, L, M	A, C, F, T, Y	D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, W
W	F, Y	H, L, M	A, C, D, E, G, I, K, N, P, Q, R, S, T, V
Y	F, H, W	C, I, L, M, V	A, D, E, G, K, N, P, Q, R, S, T
Matthew J. Betts y Robert, B. Russell, Amino Acid Properties and Consequences of the Substitutions, págs. 289-316, en Bioinformatics for Geneticists, (Michael R. Barnes, Ian C. Gray, Wiley, 2003).			

En diversas realizaciones, el FX puede aislarse de plasma, tal como de plasma humano, o puede producirse de manera recombinante, por ejemplo a partir de sistemas de cultivo tisular de mamífero que incluyen células humanas (tales como células HEK293) o células de riñón de hámster bebé (células BHK) o células de ovario de hámster chino (células CHO). Por ejemplo, puede desarrollarse una línea celular que expresa FX recombinante (rFX) en células CHO usando un vector de plásmido que alberga un ADNc que codifica para FX humano y un gen de resistencia a la neomicina para la selección de antibióticos. Los clones celulares que producen rFX pueden aislarse luego mediante clonación por dilución limitada. Determinadas realizaciones pueden comprender proteínas “auxiliares” tales como VKOR o furina. Determinadas realizaciones divulgadas en el presente documento pueden comprender sistemas de expresión de células de insectos, por ejemplo sistemas de expresión de células de insectos infectadas por baculovirus. Las realizaciones pueden comprender la expresión de FX recombinante en sistemas de células de levaduras. En algunas realizaciones, el FX puede expresarse como una proteína “etiquetada”, por ejemplo con una etiqueta de polihistidina en el extremo C-terminal. En algunas realizaciones, el FX producido puede estar presente en el sobrenadante de células del sistema de cultivo tisular.

Purificación/aislamiento de FX

En diversas realizaciones, el FX puede aislarse o purificarse a partir de plasma de mamífero o sobrenadante de células de cultivo tisular usando varias técnicas que incluyen precipitación, ultrafiltración, cromatografía, etc. Por ejemplo, el FX puede purificarse usando métodos de cromatografía tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, o similares. En determinadas realizaciones, el método de cromatografía de intercambio iónico puede comprender una resina de intercambio aniónico fuerte, una resina de intercambio aniónico débil, una resina de intercambio catiónico fuerte, una resina de intercambio catiónico débil, o similares. Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico puede ser Q-SEPHAROSE® (una marca comercial registrada de G.E. Healthcare, Kentwood MI) Fast Flow, o similares.

En determinadas realizaciones, el FX purificado o parcialmente purificado puede cargarse en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Q-SEPHAROSE®. También pueden utilizarse resinas de cromatografía apropiadas en técnicas “discontinuas”, en las que la resina está contenida en un recipiente tal como un matraz o vaso.

En determinadas realizaciones, el FX puede almacenarse después de la purificación (antes de la activación).

En determinadas realizaciones que comprenden el almacenamiento seco del FX, el FX puede resuspenderse antes de la etapa de activación.

En las realizaciones, cualquier forma adecuada de FX, por ejemplo FX purificado o aislado, puede activarse

mediante los métodos descritos en el presente documento.

Producción de FXa

Después de la elución, el FX purificado o parcialmente purificado puede cargarse en una resina cromatográfica, por ejemplo una resina de intercambio iónico. En una realización, el FX purificado puede cargarse en una resina de intercambio aniónico, por ejemplo una resina de intercambio aniónico fuerte, usando un tampón de carga. En una realización, la resina de intercambio aniónico fuerte es Q-SEPHAROSE ® Fast Flow. En determinadas realizaciones, esta carga puede dar como resultado la unión de FX a la resina de intercambio aniónico. En determinadas realizaciones, el pH del tampón de carga puede ser, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más, o similares. En algunas realizaciones, el pH del tampón de carga puede ser, por ejemplo entre 6 y 9, o entre 7 y 8, o similares. En una realización, el pH del tampón de carga es 8 a 25ºC.

En algunas realizaciones, una etapa de carga puede comprender equilibrar la resina de cromatografía con un tampón de carga que tiene una conductividad de entre 1 y 10 mS/cm, o entre 2 y 8 mS/cm, o entre 3 y 6 mS/cm, o similares. En determinadas realizaciones, la conductividad del tampón de carga puede ser, por ejemplo, de 4 mS/cm, o 5 mS/cm, o 6 mS/cm, o 7 mS/cm, u 8 mS/cm, o 9 mS/cm, o 10 mS/cm, u 11 mS/cm, o 12 mS/cm, o similares. En una realización la conductividad del tampón de carga es de 7 mS/cm a 25ºC.

En determinadas realizaciones, un tampón de carga puede comprender un catión divalente. En las realizaciones, el catión divalente puede ser Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, o similares. En determinadas realizaciones, la concentración del catión divalente en el tampón puede ser entre 1 y 50 mM, o 2 y 40 mM, o 3 y 30mM, o 4 y 20 mM, o 5 y 15 mM, o 10 y 12 mM, o similares. En las realizaciones, la concentración del catión divalente en el tampón puede ser 5 mM, o 6 mM, o 7 mM, u 8 mM, o 9 mM, o 10 mM, u 11 mM, o 12 mM, o 13 mM, o 14 mM, o 15 mM, o similares. En una realización, el tampón de carga comprende Ca^{2+} a una concentración de 2,5 mM. En determinadas realizaciones, la carga de resina objetivo está entre 5 y 25 mg de FX/ml de resina, o entre 10 y 20 mg/ml, o entre 15 y 18 mg/ml, o entre 14 y 16 mg/ml de resina. En las realizaciones, la carga de resina objetivo está entre 0,1 y 5 mg/ml, o 0,5 y 2 mg/ml. En las realizaciones, la carga de resina objetivo está entre 0,1 y 1 mg/ml; por ejemplo 0,5 mg/ml.

En algunas realizaciones, después de la etapa de carga se lava el FX unido con un tampón de lavado a un pH de aproximadamente 8. La etapa de lavado puede comprender múltiples volúmenes de columna (VC) de tampón de lavado, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 VC de tampón de lavado. En determinadas realizaciones, la conductividad del tampón de lavado puede ser, por ejemplo, de 1 mS/cm, o 2 mS/cm, o 3 mS/cm, o 4 mS/cm, o 5 mS/cm, o 6 mS/cm, o 7 mS/cm, u 8 mS/cm, o 9 mS/cm, o similares.

En una realización, la conductividad del tampón de lavado puede ser de 4 mS/cm a 25ºC. En determinadas realizaciones, la conductividad del tampón de lavado puede estar, por ejemplo, entre 0,5 mS/cm y 7 mS/cm, o entre 1 mS/cm y 6 mS/cm, o entre 2 mS/cm y 5 mS/cm, o entre 3 mS/cm y 4 mS/cm, o similares.

En diversas realizaciones, un tampón de lavado puede comprender un catión divalente. En algunas realizaciones, el catión divalente puede ser Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, o similares. En las realizaciones, la concentración del catión divalente en el tampón de lavado puede estar entre 0,1 y 50 mM, o 0,2 y 40 mM, o 0,3 y 30 mM, o 0,4 y 20 mM, o 0,5 y 15 mM, o 1 y 12 mM, o similares. En las realizaciones, la concentración del catión divalente en el tampón de lavado puede ser de 0,5 mM, o 0,6 mM, o 0,7 mM, o 0,8 mM, o 0,9mM, o 1 mM, o 1,1 mM, o 1,2 mM, o 1,3 mM, o 1,4 mM, o 1,5 mM, o similares. En una realización, el tampón de lavado puede comprender Ca^{2+} a una concentración de 1 mM.

Después de la etapa de lavado, el FX puede permanecer unido a la resina cromatográfica durante un periodo de contacto. En determinadas realizaciones, durante el periodo de contacto el FX se autoactiva, produciendo FXa. En algunas realizaciones, el periodo de contacto puede ser de al menos 5 horas, o al menos 6 horas, o al menos 7 horas, o al menos 8 horas, o al menos 9 horas, o al menos 10 horas, o al menos 11 horas, o al menos 12 horas, o al menos 13 horas, o al menos 14 horas, o al menos 15 horas, o al menos 16 horas, o al menos 17 horas, o al menos 18 horas, o al menos 19 horas, o al menos 20 horas, o al menos 21 horas, o al menos 22 horas, o al menos 23 horas, o al menos 24 horas, o al menos 25 horas, o al menos 26 horas, o más, o similares. En determinadas realizaciones, el periodo de contacto puede estar entre 5 y 9 horas, o 6 y 10 horas, o 7 y 11 horas, u 8 y 12 horas, o 9 y 13 horas, o 10 y 14 horas, u 11 y 15 horas, o 12 y 16 horas, o 13 y 17 horas, o 14 y 18 horas, o 15 y 19 horas, o 16 y 20 horas, o 17 y 21 horas, o 18 y 22 horas, o 19 y 23 horas, o 20 y 24 horas, o similares.

Después del periodo de contacto, el FXa se eluye de la columna usando un tampón de elución. En determinadas realizaciones, el tampón de elución puede comprender un catión divalente o un contraión o ambos. En determinadas realizaciones, el catión divalente puede ser Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, o similares. En las realizaciones, el contraión puede ser, por ejemplo, cloruro, o acetato o sulfato, o fosfato, o similares. En algunas realizaciones, la concentración en el tampón de elución del catión divalente o contraión puede variar a lo largo del tiempo, por ejemplo la concentración puede aumentar a lo largo del tiempo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración del catión divalente puede aumentar de manera constante o de manera gradual desde 1-40 mM, o 1-30 mM, o 1-20 mM, o 1-15 mM, o 1-10 mM, o 1-9 mM, o 1-8 mM, o 1-7 mM, o 1-6 mM, o 1-5 mM, o similares. En una realización, la concentración del catión divalente puede aumentar de manera gradual desde 1-10 mM. En determinadas realizaciones, la

concentración del contraión puede aumentar de manera constante o de manera gradual desde 1-300 mM, o 2-280 mM, o 3-260 mM, o 4-240 mM, o 6-230 mM, o 7-220 mM, u 8-215 mM, o 9-200 mM, o 10-180 mM, u 11-160 mM, o 12-140 mM, o 13-120 mM, o 14-100 mM, o 15-80 mM, o 16-60 mM, o 17-40 mM, o 20-30 mM, o similares. En una realización, la concentración del contraión puede aumentar de manera gradual desde 9-200 mM. En las realizaciones, el pH del tampón de elución puede ser, por ejemplo, 6, 7, 8, 9 10 o más, o similares. En una realización, el pH del tampón de elución puede ser 8. En algunas realizaciones, el tampón de elución puede tener una conductividad de entre 10 y 100 mS/cm a 25ºC, o entre 20 y 90 mS/cm, o entre 30 y 80 mS/cm, o entre 40 y 70 mS/cm, o entre 50 y 60 mS/cm, o similares. En una realización, el tampón de elución tiene una conductividad de entre 50 y 60 mS/cm. El FXa eluido puede recogerse en fracciones, que pueden someterse a prueba para determinar la presencia y actividad de FXa.

En determinadas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento se realizan entre 8ºC y 30ºC, sin embargo determinadas realizaciones divulgadas pueden ponerse en práctica a otras temperaturas. En las realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento se realizan a una temperatura de más de 8ºC, por ejemplo a de 22ºC a 25ºC, de 20ºC a 25ºC, de 18ºC a 22ºC, de 16ºC a 25ºC, de 20ºC a 25ºC, o similares.

Determinadas realizaciones divulgadas en el presente documento específicamente excluyen el uso de enzimas unidas a resinas de cromatografía.

Determinadas realizaciones divulgadas en el presente documento específicamente excluyen la adición de enzimas exógenas en el procedimiento de activación.

FXa

Las realizaciones divulgadas en el presente documento incluyen FX activado, por ejemplo FXa obtenido mediante un procedimiento divulgado en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan sólo con fines ilustrativos para facilitar una comprensión más completa de las realizaciones representativas. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de ninguna de las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 1

Se desarrollaron líneas celulares que expresan factor X recombinante (rFX) en la línea celular CHO-S usando un vector de plásmido que alberga un ADNc que codifica para FX humano y un gen de resistencia a la neomicina para la selección de antibióticos. Se aislaron los clones de células que producen rFX mediante clonación por dilución limitada, y se transfectaron con un vector que codifica para la endopeptidasa furina. Se clonaron las células transfectadas con furina que producen rFX por segunda vez. Se seleccionaron los clones productores basándose en parámetros de crecimiento y la productividad de rFX a alta actividad después de la activación mediante tenasa extrínseca y veneno de víbora de Russell (RVV), y se activaron mediante la ruta extrínseca en un ensayo de coagulación en plasma deficiente de FX (ensayo de coagulación de tiempo de protrombina (PT)). Se verificó la calidad de las proteínas midiendo las impurezas mediante un ensayo cromogénico específico para FXa, y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para el rFX infracarboxilado, las formas no procesadas de rFX (cadena sencilla o que contienen propéptido) y los productos de degradación. Se usó un clon que cumplía con todos los criterios de calidad para producir rFX en un biorreactor de 10 l en medios de POWERCHO™ (una marca comercial de Lonza Grupo, Basilea, Suiza) comercialmente disponibles, y se realizaron las recogidas del sobrenadante de manera periódica a lo largo de 48 h recogiendo el flujo del fermentador.

Se cargó el sobrenadante de cultivo libre de células en una columna de intercambio aniónico (Q-SEPHAROSE®) en condiciones de pH neutro y una conductividad de aproximadamente 10-15 mS/cm (25ºC). La carga de la columna aplicada fue de aproximadamente 1,5 mg de antígeno de FX por ml de resina. Después de completarse la carga, se lavó la resina con 5 VC de un tampón de lavado ácido (pH= 6,0) con una conductividad de aproximadamente 19 mS/cm (25ºC). Posteriormente, se eluyó el producto con un tampón de elución que contenía calcio 10 mM y que tenía un pH de aproximadamente 8,0 (25ºC) y una conductividad de aproximadamente 19 mS/cm (25ºC). Se recogió el producto en un volumen de 5 VC. Las velocidades de flujo aplicadas fueron >50 cm/h para todas las etapas y la temperatura del procedimiento fue de 2-8ºC.

Se cargó la preparación de FX purificado a lo largo de 20 horas en una columna de intercambio aniónico fuerte (Q-SEPHAROSE® FF o POROS® [una marca comercial registrada de Life Technologies, Grand Island NY] 50 HQ) a una conductividad de aproximadamente 7 mS/cm (25ºC) y un pH de aproximadamente 8 (25ºC). La carga de la columna objetivo estaba en un intervalo de 2-10 mg de FX/ml de resina.

Durante la carga, la concentración de calcio fue de aproximadamente 2,5 mM, y la concentración de NaCl fue de 40 mM. Después de la carga, se lavó la columna con 5 VC de un tampón de lavado con una conductividad de

aproximadamente 4 mS/cm (25ºC), un pH de 8,0 y una concentración de calcio de 1 mM. Se realizó la elución usando un aumento gradual simultáneo de la concentración de Ca^{2+} en el tampón de elución desde 1 hasta 10 mM, y la concentración de NaCl desde 9 hasta 200 mM a una conductividad de aproximadamente 24 mS/cm (25ºC) y un pH de 8. Se realizaron todas las etapas a una velocidad de flujo lineal de 37 cm/h a una altura de lecho de resina de aproximadamente 10 cm. La temperatura para la activación fue temperatura ambiente (20-25ºC).

Se sometieron a pruebas analíticas la carga y las fracciones del conjunto de eluatos. En la tabla 3 se enumeran los volúmenes y las cantidades de rFX cargado en las columnas, y los tiempos de activación en las columnas. Se analizaron ambos productos de cada muestra de la etapa de activación mediante un ensayo cromogénico de FX con activación por RVV para medir la cantidad total de FX eluido más FXa en la muestra, y mediante un ensayo cromogénico específico de FXa para medir FXa de manera selectiva. Se calcularon los contenidos de FXa en porcentaje del FX total presente después de la activación, y también se enumeran en la tabla 3. También se analizaron las muestras después de la purificación en una etapa y después de la activación mediante SDS-PAGE. Los patrones de electroforesis se muestran en la figura 1.

En conclusión, la activación de FX a FXa fue exitosa mediante este procedimiento para ambas muestras, y los rendimientos de FXa fueron ambos de aproximadamente el 5% de FXa del FX eluido total. Aunque se cargó 5 veces más rFX para generar el número de muestra 1-8 que para el número de muestra 1-4, las cantidades absolutas y relativas de FX y FXa en el eluato fueron similares para ambas muestras. Puede observarse una banda con un tamaño similar al de la cadena pesada del FXaα derivado de plasma en los electroferogramas de ambas muestras activadas. Puede observarse que esta banda en comparación con la banda correspondiente a FXaβ estaba presente como la forma de FXa principal.

Tabla 3

		CARGA				ELUATO		
ID de la muestra	Tipo de columna	Volumen de FX cargado hasta la máx. capacidad de la columna alcanzada [ml]	FX cargado según ELISA [μg]	FX cargado según la coagulación de PT [μg]	Tiempo de contacto en la columna [h]	Cantidad de FX/FXa en el ensayo de RVV [μg]	Cantidad de FXa en el ensayo de FXa [μg]	% de FXa en la mezcla FX/FXa
n.º 1-4	AEX en Q-SEPHAROSE® FF (GE Healthcare)	20	993	744	20	702	35	5,0
n.º 1-8	POROS® (Applied Biosystems)	100	4967	3722	20	732	42	5,7

Tabla 3: datos de las dos muestras generadas mediante la activación de FX: se muestran las cantidades de FX cargado basadas en antígeno y actividad medidas mediante ELISA y ensayos de coagulación de PT, y tiempos de contacto en la de columna activación. También se muestran las cantidades de FX/FXa totales medidas en el eluato, y de FXa solo. Se calcularon los rendimientos de FXa en porcentaje de FX/FXa total.

La figura 1 muestra el SDS-PAGE de muestras de FX: se muestra el material de partida de rFX para la activación (carril "rFX"), números de muestra 1-4 y 1-8 que contienen rFXa después de la etapa de activación (carriles "rFX + rFXa n.º 1-4" y "rFX + rFXa n.º 1-8") y FXa derivado de plasma (pd) (carril "pdFXa"). Después de la electroforesis, se hicieron visibles las bandas de proteína mediante tinción con Coomassie. En el carril más a la izquierda, se muestra un marcador de peso molecular. Las bandas correspondientes a FX y FXa están marcadas.

Ejemplo 2

Se desarrollan líneas celulares que expresan factor X recombinante (rFX) en la línea celular BHK usando un vector de plásmido que alberga un FX humano que codifica para ADNc y un gen de resistencia a la neomicina para la selección de antibióticos. Se aíslan los clones de células que producen rFX mediante clonación por dilución limitada, y se transfectan con un vector que codifica para la endopeptidasa furina. Se clonan las células transfectadas con furina que producen rFX por segunda vez. Se seleccionan los clones productores basándose en parámetros de crecimiento y productividad de rFX a alta actividad después de la activación mediante tenasa extrínseca y RVV, y se activan mediante la ruta extrínseca en un ensayo de coagulación en plasma deficiente de FX (ensayo de coagulación de tiempo de protrombina (PT)). Se verifica la calidad de las proteínas midiendo las impurezas mediante un ensayo cromogénico específico para FXa, y mediante SDS-PAGE para el rFX infracarboxilado, las formas de rFX no procesadas (cadena sencilla o que contienen propéptido) y los productos de degradación. Se usa un clon que cumple con todos los criterios de calidad para producir rFX en un biorreactor de 100 l en medios comercialmente disponibles, y se realizan las recogidas del sobrenadante de manera periódica a lo largo de 72 h recogiendo el flujo del biorreactor.

Se carga el sobrenadante de cultivo en una columna de interacción hidrófoba (TOYOPEARL® SuperButyl-550) a un pH de 5,0 y una conductividad de aproximadamente 35 mS/cm (a 25ºC). La carga de la columna aplicada es de aproximadamente 1,5 mg de antígeno de FX por ml de resina. Después de completarse la carga, se lava la resina con 5 VC de un tampón de lavado (pH= 5,0) con una conductividad de aproximadamente 35 mS/cm (25ºC). Posteriormente, se eluye el FX con un tampón de elución que contiene calcio 10 mM y que tiene un pH de aproximadamente 8,0 (25ºC) y una conductividad de aproximadamente 10 mS/cm (25ºC). Se recoge el producto en un volumen de 8 VC.

Se carga la preparación de FX purificado en una columna de intercambio aniónico fuerte (Q-SEPHAROSE® FF o POROS® 50 HQ) a una conductividad de aproximadamente 7 mS/cm (25ºC) y un pH de aproximadamente 8 (25ºC). La carga de la columna objetivo está en un intervalo de 2-10 mg de FX/ml de resina.

Durante la carga, la concentración de calcio es aproximadamente 2,5 mM. Después de la carga, se lava la columna con 7 VC de un tampón de lavado con una conductividad de aproximadamente 6 mS/cm (a 25ºC), un pH de 8,2 y una concentración de calcio de 1 mM. El FX se pone en contacto con la resina durante 10 horas antes de la elución.

Se realiza la elución usando un aumento gradual simultáneo de la concentración de Ca^{2+} en el tampón de elución desde 1 hasta 10 mM, y se aumenta la concentración del contraión de NaCl desde 9 hasta 165 mM a una conductividad de aproximadamente 20 mS/cm (a 25ºC) y un pH de 8. Se realizan todas las etapas a una velocidad de flujo lineal de 50 cm/h a una altura de lecho de resina de aproximadamente 15 cm. La temperatura para la activación es temperatura ambiente (20-25ºC).

Ejemplo 3

Se desarrollan líneas celulares que expresan factor X recombinante (rFX) en la línea celular 293 usando un vector de plásmido que alberga un FX humano que codifica para ADNc y un gen de resistencia a la ampicilina para la selección de antibióticos. Se aíslan los clones de células que producen rFX mediante clonación por dilución limitada, y se transfectan con un vector que codifica para la endopeptidasa furina. Se clonan las células transfectadas con furina que producen rFX por segunda vez. Se seleccionan los clones productores basándose en parámetros de crecimiento convencionales así como la productividad de rFX a alta actividad después de la activación mediante tenasa extrínseca y RVV, y se activan mediante la ruta extrínseca en un ensayo de coagulación en plasma deficiente de FX (ensayo de coagulación de tiempo de protrombina (PT)). Se verifica la calidad de las proteínas midiendo las impurezas mediante un ensayo cromogénico específico para FXa, y mediante SDS-PAGE para el rFX infracarboxilado, las formas de rFX no procesadas (cadena sencilla o que contienen propéptido) y los productos de degradación. Se usa un clon que cumple con todos los criterios de calidad para producir rFX en un biorreactor de 50 l en medios comercialmente disponibles, y se realizan las recogidas del sobrenadante de manera periódica a lo largo de 36 h recogiendo el flujo del biorreactor.

Se carga el sobrenadante de cultivo libre de células en una resina hidrófoba (TOYOPEARL® [una marca comercial registrada de Tosoh Bioscience, Bélgica] SuperButyl-550) usando una técnica “discontinua” a un pH de 5,0 y una conductividad de aproximadamente 35 mS/cm (a 25ºC). La carga de la proteína aplicada es de aproximadamente 1,5 mg de antígeno de FX por ml de resina. Después de completarse la carga, se lava la resina usando un tampón de lavado (pH=5,0) con una conductividad de aproximadamente 35 mS/cm (25ºC). Posteriormente, se eluye el FX de la resina con un tampón de elución que contiene calcio 10 mM y que tiene un pH de aproximadamente 8,0 (25ºC) y una conductividad de aproximadamente 10 mS/cm (25ºC).

Luego se liofiliza el FX recuperado con los siguientes componentes en la razón indicada:

100 ug de FX / 30 mg de glicina / 20 mg de NaCl / 10 mg de HEPES.

Después del almacenamiento a -70ºC durante dos meses, se reconstituye el FX y se carga en una columna intercambio aniónico fuerte (Q-SEPHAROSE® FF o POROS® 50 HQ) a una conductividad de aproximadamente 8 mS/cm (25ºC) y un pH de aproximadamente 8,1 (25ºC). La carga de la columna objetivo está en un intervalo de 2-10 mg de FX/ml de resina.

Durante la carga, la concentración de calcio es de aproximadamente 2,5 mM. El FX se pone en contacto con la resina durante 16 horas antes de la elución.

Se realiza la elución usando un aumento gradual simultáneo de la concentración de Ca^{2+} en el tampón de elución desde 2,5 hasta 20 mM, y se aumenta la concentración del contraión de NaCl desde 9 hasta 250 mM a una conductividad de aproximadamente 30 mS/cm (a 25ºC) y un pH de 8,5. Se realizan todas las etapas a una velocidad de flujo lineal de 20 cm/h a una altura de lecho de resina de aproximadamente 25 cm. La temperatura para la activación es temperatura ambiente (20-25ºC).

En conclusión, debe entenderse que aunque se destacan aspectos de la presente memoria descriptiva mediante referencia a realizaciones específicas, un experto en la técnica apreciará fácilmente que estas realizaciones divulgadas sólo son ilustrativas de los principios del objeto divulgado en el presente documento. Por tanto, debe entenderse que el objeto divulgado no se limita de ninguna manera a una metodología, protocolo y/o reactivo particular, etc., descritos en el presente documento. Como tal, pueden realizarse diversas modificaciones o cambios a o configuraciones alternativas del objeto divulgado según las enseñanzas en el presente documento sin apartarse del espíritu de la presente memoria descriptiva. Por último, la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir sólo realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente divulgación, que se define únicamente por las reivindicaciones. Por consiguiente, las realizaciones de la presente divulgación no se limitan a las que se muestran y describen de manera precisa.

Se describen determinadas realizaciones en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por el inventor para llevar a cabo los métodos y dispositivos descritos en el presente documento. Por supuesto, serán evidentes variaciones en estas realizaciones descritas para los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Por consiguiente, esta divulgación incluye todas las modificaciones y los equivalentes del objeto mencionado en las reivindicaciones adjuntas a la misma tal como lo permite la ley aplicable. Además, se abarca cualquier combinación de las realizaciones descritas anteriormente en todas las variaciones posibles de las mismas por la divulgación a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

Las agrupaciones de realizaciones, elementos o etapas alternativas de la presente divulgación no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede referirse a y reivindicarse individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo divulgados en el presente documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden incluirse en, o delecionarse de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce cualquier inclusión o deleción, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo como modificado, cumpliéndose así la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan una característica, un elemento, una cantidad, un parámetro, una propiedad, un término, y así sucesivamente, usados en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa que la característica, el elemento, la cantidad, el parámetro, la propiedad o el término así calificado abarca un intervalo de más o menos el diez por ciento por encima y por debajo del valor de la característica, el elemento, la cantidad, el parámetro, la propiedad o el término indicados. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar. Como mínimo, y no como un intento de limitar la solicitud de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada indicación numérica debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significantes informado y aplicando técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos y valores numéricos que establecen el amplio alcance de la divulgación son aproximaciones, los intervalos y valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se

informan con la mayor precisión posible. Cualquier intervalo o valor numérico, sin embargo, contiene de manera inherente determinados errores que necesariamente resultan de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. La mención de los intervalos numéricos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor numérico separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual de un intervalo numérico se incorpora en la presente memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento.

Los términos “un”, “una”, “el/la” y referentes similares usados en el contexto de describir la divulgación (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento simplemente pretende iluminar mejor la divulgación y no plantea una limitación en el alcance reivindicado de otra manera. Ningún lenguaje en la presente memoria descriptiva debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de las realizaciones divulgadas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Método para activar el factor de coagulación X (FX) que comprende;

a) poner en contacto una disolución acuosa que comprende FX con un material de intercambio aniónico en condiciones de unión durante un periodo de contacto de al menos 5 horas; y

b) eluir el FX activado (FXa) del material de intercambio aniónico con un tampón de elución,

opcionalmente en el que el FX en la disolución acuosa es un FX aislado de plasma de mamífero o sobrenadante de células de cultivo tisular.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el periodo de contacto es de al menos 10 horas, y preferiblemente de al menos 20 horas.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de unión comprenden una conductividad de 8 mS/cm o menos.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las condiciones de unión comprenden un pH de entre 8 y 10.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el FX se carga a más de 0,5 mg por ml de material de intercambio aniónico.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas de contacto y elución se realizan a una temperatura de más de 8ºC.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón de elución comprende al menos uno de un catión divalente y un contraión, opcionalmente en el que el catión divalente es Ca^{2+}, y opcionalmente en el que el contraión es al menos uno de cloruro, acetato o sulfato.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la concentración del catión divalente o contraanión o ambos en el tampón de elución aumenta a lo largo del tiempo, opcionalmente en el que la concentración del catión divalente aumenta desde 1 hasta 100 mM o en el que la concentración del catión divalente aumenta desde 1 hasta 10 mM, preferiblemente en el que la concentración del contraanión aumenta desde 1 hasta 1000 mM o en el que la concentración del contraanión aumenta desde 9 hasta 200 mM.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tampón de elución tiene una conductividad entre 1 y 100 mS/cm a 25ºC, preferiblemente entre 10 y 90 mS/cm a 25ºC, más preferiblemente entre 20 y 80 mS/cm a 25ºC, incluso más preferiblemente entre 30 y 70 mS/cm a 25ºC, incluso más preferiblemente entre 40 y 60 mS/cm a 25ºC, incluso más preferiblemente entre 50 y 60 mS/cm a 25ºC.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa que comprende FX se pone en contacto con el material de intercambio aniónico en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

11. Método según la reivindicación 7, en el que la concentración del contraanión aumenta desde 1 hasta al menos 500 mM, preferiblemente desde 1 hasta al menos 800 mM, más preferiblemente desde 1 hasta al menos 1000 mM.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de intercambio aniónico comprende un ligando que comprende al menos uno de amonio cuaternario [Q], dietilaminoetilo [DEAE], dietilaminopropilo [ANX] o amina primaria.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el material de intercambio aniónico comprende una matriz derivada de al menos uno de poliestireno, poli(metacrilato de metilo), polivinilbenceno, polivinilpiridina, poli(estireno-divinilbenceno) reticulado, Sepharose y agarosa reticulada.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además aislar FX de plasma de mamífero o sobrenadante de cultivo de células de tejido para producir la disolución acuosa.

15. Método según la reivindicación 14, en el que el FX se aísla del plasma de mamífero o sobrenadante de cultivo de células de tejido mediante precipitación, ultrafiltración o cromatografía.

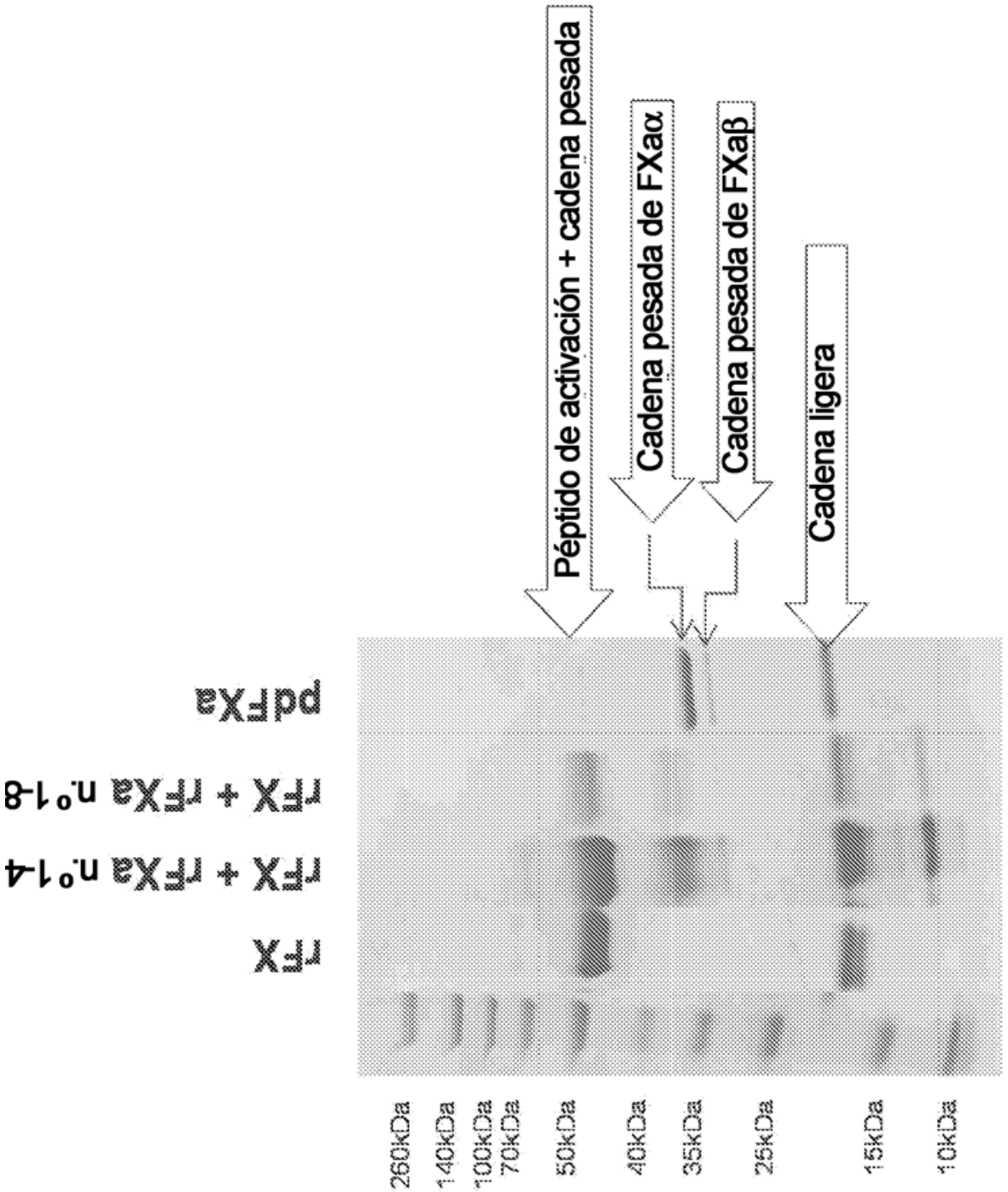
rFX
rFX + rFXa nº14
rFX + rFXa nº18
pdFXa
260kDa
140kDa
100kDa
70kDa
50kDa
40kDa
35kDa
25kDa
15kDa
10kDa
Péptido de activación + cadena pesada
Cadena pesada de FXaα
Cadena pesada de FXaβ
Cadena ligera

FIG. 1