

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 920**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/18** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/EP2012/070257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12770496 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.12.2021 EP 2748179**

54 Título: **Purificación de proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

**14.10.2011 US 201161547579 P**

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

**04.05.2022**

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (100.0%)**

**1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku  
Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 908 920 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**

Purificación de proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método en dos etapas para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con alto rendimiento y alta pureza en materiales de resina de intercambio aniónico, a proteínas de unión a cationes divalentes, en particular FIX.

10

**Antecedentes de la invención**

Desde el advenimiento de la tecnología recombinante, muchas proteínas de mamíferos se producen en células huésped, por ejemplo transfectando células con ADN que codifica para dichas proteínas y haciendo crecer las células recombinantes en condiciones favorables para la expresión de dichas proteínas. Las proteínas secretadas por las células en el medio de cultivo celular, o que residen en el interior de las células, pueden separarse del medio de cultivo y otros componentes usando técnicas cromatográficas, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, y similares. Para otras aplicaciones farmacéuticas, la pureza es de particular importancia. Sin embargo, al mismo tiempo, la actividad biológica de la proteína debe conservarse después de una purificación meticulosa de las proteínas de interés.

15

20

El concepto de eluir las proteínas de unión a calcio de resinas de intercambio aniónico mediante cationes divalentes se notificó por primera vez hace casi treinta años. Aunque el factor VII bovino se aisló con éxito del plasma bovino, la purificación del factor VII humano seguía siendo problemática, es decir, el material producido sólo era parcialmente puro o se obtuvo en cantidades tan pequeñas que se caracterizó como actividad sin proteína detectable. Los trabajadores en el campo lograron el aislamiento del factor VII humano a partir de plasma humano en cantidades suficientes (con un rendimiento de aproximadamente el 30%) mediante la adsorción de proteínas a un catión divalente, es decir, citrato de bario, y luego la separación de la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico. Además, había métodos disponibles para recuperar y purificar proteínas dependientes de vitamina K del medio de un cultivo celular que producía proteínas dependientes de vitamina K con diferentes actividades específicas por medio de resinas de intercambio iónico convencionales, por ejemplo resinas de intercambio aniónico, y usando un eluyente que contenía cationes divalentes, por ejemplo iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), iones de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), iones de bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ) e iones de estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ).

25

30

35

Además, se disponía de métodos para la purificación del factor IX (FIX) en disolución, que comprendían las etapas de aplicar la disolución que contenía FIX a una resina de intercambio aniónico, lavar la resina de intercambio aniónico con una disolución que tuviera una conductividad menor que la requerida para eluir FIX de la resina y eluir FIX de la resina de intercambio aniónico con un primer eluyente que incluía cationes divalentes para formar un primer eluato. Luego, el primer eluato se aplica a una heparina o resina similar a heparina para formar un segundo eluato, y el segundo eluato se aplica a hidroxapatita para formar un tercer eluato, usando un agente de lavado a alta conductividad en la etapa de lavado.

40

45

El factor IX (FIX) es una serina proteasa dependiente de vitamina K del sistema de coagulación, perteneciente a la familia de peptidasas S1. FIX está inactivo a menos que se active por el factor XIa o el factor VIIa. Para su activación se requieren calcio y fosfolípidos de membrana. La deficiencia de FIX provoca el trastorno hemorrágico hereditario recesivo hemofilia B, que puede tratarse con éxito mediante la administración de FIX modificado de manera postraduccional, es decir, FIX fosforilado y sulfatado. FIX puede convertirse además en FIX activado, es decir, FIXa. Dado que FIXa puede afectar negativamente a una composición dada de FIX (por ejemplo, aumentando su trombogenicidad tal como se describe en la bibliografía), los productos de FIX deben contener preferiblemente un bajo contenido de FIXa.

50

Además, el factor VII (FVII) es una serina proteasa dependiente de vitamina K que desempeña un papel importante en la cascada de la coagulación, donde inicia el procedimiento de coagulación con el factor tisular (TF). Tras la lesión del vaso, el TF se expone a la sangre y al FVII circulante. Una vez unido a TF, el FVII se activa a FVIIa por trombina, el factor Xa, IXa, XIIa y el complejo FVIIa-TF cuyos sustratos son FX y FIX. Además, la anexina V es una proteína celular del grupo de las anexinas, que tiene la capacidad de unirse a la fosfatidilserina de manera dependiente del calcio y de formar una red cristalina bidimensional unida a membrana. Puede desempeñar un papel en la coagulación de la sangre, la apoptosis, la fagocitosis y la formación de micropartículas derivadas de la membrana plasmática. Por tanto, el problema que subyace a la presente invención es proporcionar un método mejorado para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes con alto rendimiento y alta pureza. La solución al problema técnico anterior se logra mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

55

60

**Sumario de la invención**

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier contenido que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con propósitos informativos.

65

La presente invención se refiere en una realización preferida (punto 1)) a un método para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes que comprende las etapas de:

- 5 (a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una concentración de cationes divalentes de 1000  $\mu\text{M}$  como máximo, seguido opcionalmente de una a tres etapas de lavado;
- 10 (b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un catión divalente y un contraanión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;
- (c) diluir la combinación de eluato obtenida, ((1) para disminuir opcionalmente la conductividad), y aumentar la concentración del catión divalente;
- 15 (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato obtenido después de la etapa (c); y
- (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.

20 En ese sentido, la etapa (a) tal como se describió anteriormente se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de cationes divalentes libres. Cationes divalentes "libres" significarán en ese contexto cationes divalentes no complejados. Es decir, si por ejemplo  $\text{Ca}^{++}$  aproximadamente 1 mM estaba presente complejo con EDTA, eso todavía se consideraría en ausencia de cationes divalentes (libres).

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

30 2. El método según el punto 1, en el que después de la etapa de carga se realiza(n) una o más etapas de lavado (1), (2) y/o (3) con un tampón de lavado (1), (2) y/o (3) en ausencia de un catión divalente pero en presencia de un contraanión.

Los contraaniones preferidos son: cloruro (el más preferido), acetato, fosfato, sulfato, carbonato, aunque no se limitan a estos.

35 3. El método según el punto 1 ó 2, en el que al menos uno del tampón de carga y/o el tampón de lavado tiene(n) un pH que es al menos 0,5 unidades de pH menor que el pH del eluyente de la etapa (b), preferiblemente en el que el tampón de carga y/o el tampón en la etapa de lavado (2) tiene(n) un pH que es al menos 0,5 unidades de pH menor que el pH del eluyente de la etapa (b).

40 4. El método según uno o más de los puntos 1 a 3, en el que el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y el tampón de lavado opcional y en el que el eluato complementado en la etapa (c) tiene una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).

45 En una realización preferida, la conductividad del tampón de elución es de entre 16 y 25 mS/cm (TA), preferiblemente 19-20 mS/cm (TA). Si se realiza la etapa de lavado opcional 2 ("lavado ácido"), la conductividad es preferiblemente de entre 14 y 19 mS/cm (RT), más preferiblemente entre 16 y 18 mS/cm (RT), mediante lo cual en todos los casos debe cumplirse el requisito del punto 4 anterior.

50 5. El método según cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que al menos un catión divalente en la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , o combinaciones de los mismos.

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

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

8. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína de unión a calcio.

65 9. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína dependiente de vitamina K.

10. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, particularmente preferido del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIIa (FVIIa) y anexina V.

5 Cualquiera de las proteínas anteriores puede derivar o bien de una fuente natural, por ejemplo plasma, o a partir de tecnologías recombinantes.

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

15 12. El método según uno cualquiera de los puntos 1 - 11, en el que el pH de la etapa de lavado opcional (3) es de entre 7,0 y 8,2, preferiblemente entre 7,3 y 8,0, incluso más preferiblemente de 7,3 - 7,5.

13. El método según uno cualquiera de los puntos 2 a 12, en el que el pH en la etapa de lavado opcional (1) es de 7,3 - 7,5, y el pH de la etapa de lavado opcional (2) es preferiblemente de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,9 a 6,1.

20 14. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 13, en el que el tampón de elución (es decir, eluyente) en la etapa (b) contiene calcio y tiene un pH de 7,5 a 8,5, preferiblemente de 7,8 a 8,2.

25 15. Un método según cualquiera de los puntos 1 - 14 anteriores, particularmente según el punto 3, en el que el pH del tampón de carga en la etapa de carga (d) es mayor que el pH del tampón de carga en la etapa de carga (a) o el pH del lavado, que sigue después de la carga (a).

El "lavado que sigue después de la carga (a)" en el contexto anterior y también como se menciona a continuación, se refiere en este caso al "lavado ácido" o lavado 2.

30 16. Un método según uno cualquiera de los puntos 1 - 15 anteriores, particularmente según el punto 3, en el que la conductividad en la etapa de carga (d) es igual a o menor que la conductividad del lavado, que sigue después de la carga (a).

35 17. Un método según cualquiera de los puntos 1 a 16 anteriores, particularmente según el punto 3 anterior, en el que la concentración de cationes divalentes del tampón de carga en la etapa (d) es mayor que la concentración de cationes divalentes en el tampón de elución de la etapa (b).

40 18. El método de cualquiera de los puntos 1 a 17, en el que la etapa de proporcionar a la combinación de eluato obtenida una baja conductividad se lleva a cabo mediante dilución con un tampón de dilución apropiado, alternativamente cambiando la composición del tampón, o alternativamente mediante diálisis, diafiltración o filtración en gel.

Preferiblemente, la elución (b) se lleva a cabo con un tampón de elución que contiene calcio 1,8-2,2 mM a un pH de 7,8-8,2.

45 Preferiblemente, la etapa (c) se lleva a cabo con un tampón que contiene calcio para ajustar la concentración de calcio a 5-7 mM y reducir la conductividad a 15-18 mS/cm (TA), dando como resultado un pH de 7,4-7,8.

### Descripción detallada de la invención

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes, que comprende las etapas de:

55 (a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una concentración de cationes divalentes de 1000  $\mu$ M como máximo, seguido opcionalmente por una, dos, tres etapas de lavado;

(b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un catión divalente y un contraión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;

60 (c) diluir la combinación de eluato obtenida (para disminuir opcionalmente la conductividad) y aumentar la concentración del catión divalente;

(d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato obtenido después de la etapa (c); y

65 (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.

El presente método inventivo usa un procedimiento en dos columnas de intercambio aniónico, funcionando la primera columna en un modo de unión a producto y funcionando la segunda columna en un modo sin unión a producto. El principio del procedimiento requiere, en una realización preferida, poner en contacto (es decir, cargar) la disolución de proteína de unión a cationes (por ejemplo, rFIX) con (sobre) una primera resina de intercambio aniónico a un pH neutro o ácido (pH = 6,8 - 7,5, pref. 7,0 - 7,4, por ejemplo, 7,0 - 7,2) en presencia de un quelante, por ejemplo EDTA. Puede preferirse EDTA si el rendimiento del producto debe mejorarse adicionalmente. EDTA puede mejorar la unión de la proteína de unión a cationes divalentes, por ejemplo FIX. En una realización preferida, después de un lavado (por ejemplo, a un pH tal como se define con más detalle a continuación) seguido de un lavado a baja conductividad, se eluye el producto (en el que este lavado sería el lavado que precede inmediatamente a la elución) con un tampón que contiene, por ejemplo calcio (con un pH de, por ejemplo, aproximadamente 8,0). La combinación de eluato obtenida se diluye para disminuir la conductividad y aumentar la concentración de calcio. La disolución diluida tiene un pH, por ejemplo, de 7,6 - 7,8. La combinación de eluato acondicionada de la primera etapa de purificación de intercambio aniónico se transfiere entonces (por ejemplo, se bombea) sobre la segunda columna de intercambio aniónico donde la proteína de unión a cationes, tales como por ejemplo rFIX, no se une en las condiciones aplicadas (en particular, presencia de concentraciones aumentadas de cationes divalentes, un pH ligeramente básico y una conductividad de aproximadamente 15 - 21 mS/cm (TA)), mientras que las impurezas de proteína sí se unen. La proteína de unión a cationes resultante, por ejemplo rFIX, contenida en el efluente de la columna de la segunda purificación de intercambio aniónico, tiene una alta pureza y una alta actividad específica.

El término "en ausencia de cationes divalentes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la ausencia de cationes divalentes libres en el tampón, en el que pueden estar presentes cationes divalentes que se unen a una proteína o se complejan, por ejemplo por un quelante, por ejemplo EDTA. El término "a una baja concentración de cationes divalentes" se refiere a una concentración de cationes divalentes en el rango  $\mu\text{M}$ , en particular una concentración de 1000  $\mu\text{M}$  como máximo, preferiblemente 800  $\mu\text{M}$  como máximo, incluso más preferiblemente 500  $\mu\text{M}$  como máximo. Para esta aplicación, el término "en ausencia de cationes divalentes" pretende abarcar también la definición anterior de "a una baja concentración de cationes divalentes".

Tal como ya se mencionó anteriormente, el calcio unido a proteínas, por ejemplo calcio unido a EDTA puede tolerarse en una realización. Si el calcio está unido a una proteína, se considera calcio "inactivo" en el contexto de esta invención. Entonces no interfiere con la unión del producto. El calcio libre, por otro lado, podría interferir con la unión del producto.

La carga (a) del primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En particular, las condiciones adecuadas para cargar la proteína de unión a cationes divalentes en el material de resina de intercambio aniónico las conocen bien los expertos en la técnica. Las condiciones específicas para la conductividad del tampón de carga que permiten la unión del producto dependen de las propiedades particulares de la proteína y del material de resina de intercambio aniónico usado (por ejemplo, densidad de ligando, presentación de ligando, etc.). Los cationes divalentes se unen a proteínas en regiones que suelen ser muy ácidas (es decir, cargadas negativamente). Las cargas negativas quedan enmascaradas cuando se une el catión divalente. Sin embargo, al cargar el material de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en ausencia de cationes divalentes, por ejemplo separando el catión divalente unido mediante un quelante, por ejemplo EDTA, la proteína porta parches altamente cargados negativamente en la superficie que permiten una fuerte unión a un ligando de intercambio aniónico. Además, las condiciones para cargar una proteína en un material de resina de intercambio aniónico siempre requieren un equilibrio entre el pH y la concentración de los contraiones, por ejemplo  $\text{Cl}^-$ . La química del contraión también influye en el comportamiento de elución, por ejemplo  $\text{Cl}^-$  porta una carga negativa y el fosfato a pH neutro porta dos cargas negativas. Este último puede tener un mayor poder eluyente en comparación con el  $\text{Cl}^-$ , incluso cuando la conductividad es menor.

La carga de la columna de intercambio aniónico 1 (es decir, la etapa (a)) se realiza preferiblemente a un pH de 6,8 a 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,4, seguida de un lavado 1 a un pH de 7,3 a 7,5 para completar la carga, un lavado 2 en condiciones ácidas (pH 5,5 - 6,5, preferiblemente 5,8 - 6,2, más preferiblemente 5,9 - 6,1). En una realización adicional, puede llevarse a cabo un lavado 3 opcional (lavado a baja conductividad, este es el lavado que se lleva a cabo directamente antes de la elución) a pH 7,0 - 8,2, preferiblemente 7,3 - 8,0, por ejemplo un pH de 7,3 - 7,5, para preparar la columna para la elución. La elución se realiza a un pH de 7,5 - 8,5, más preferiblemente de 7,8 - 8,2. Una de las características de la presente invención es que el pH del tampón de elución es al menos 0,5 unidades de pH mayor que el pH del lavado 2 anterior (lavado a alta conductividad, véanse las condiciones de conductividad descritas anteriormente). Este segundo lavado "ácido" a alta conductividad todavía tiene una conductividad que es menor que la conductividad de la elución.

En la realización más preferida, la etapa de carga del primer intercambio aniónico se lleva a cabo a un pH de neutro a ligeramente ácido, por ejemplo a un pH de 6,8 - 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,4, si se realizan las etapa(s) de lavado opcional(es). Preferiblemente, esta etapa de carga va seguida de un primer lavado a pH = 7,3 - 7,5 para completar la carga, un segundo lavado en condiciones ácidas (pH de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,8 a 6,2) y un lavado 3 a un pH de 7,3 - 7,5 para preparar la columna para la elución. El pH de la etapa de carga de la primera columna de intercambio aniónico se establece a de 5,5 a 6,5, más preferiblemente a un pH de 5,9 - 6,1, si no se realiza(n) la(s) etapa(s) de lavado opcional(es). En particular, es una de las características de la presente invención que es necesario aumentar

el pH, preferiblemente en al menos 0,5 unidades de pH antes de llevar a cabo la etapa de elución. Este aumento puede producirse en todas las etapas, por ejemplo desde la etapa de carga directamente hasta la etapa de elución, si no se llevan a cabo etapas de lavado en el medio. En una realización alternativa, el aumento del pH se produce después de un lavado ácido, tal como se describió anteriormente. La elución se lleva a cabo preferiblemente, tal como se describe a continuación, a un pH de 7,5 - 8,5, más preferiblemente de 7,8 - 8,2.

En caso de que sólo se lleve a cabo una etapa de lavado, es decir, la etapa de lavado (1), esta etapa de lavado se llevará a cabo sin adición de sal; por consiguiente, el pH no tiene una importancia inmediata en la etapa de lavado, siempre que el pH se aumente finalmente en la etapa de elución en al menos 0,5 unidades de pH en comparación con la etapa de carga.

En una realización preferida, en la que se llevan a cabo dos etapas de lavado, es decir, las etapas de lavado (1) y (2), o en la que sólo se lleva a cabo la etapa de lavado riguroso (2) (véase también a continuación), este tampón de carga puede tener un pH en la zona neutra a ligeramente ácida, tal como se definió anteriormente, aunque eso sólo sería admisible según los principios inventivos si la segunda etapa de lavado (es decir, la etapa de lavado 2) tuviera un pH menor de 5,5 - 6,5, o 5,9 - 6,1. Si la etapa de carga ya se llevó a cabo a este menor pH, entonces la etapa de lavado (2) preferiblemente también tendría este menor pH. La etapa de lavado (2) en una realización preferida se lleva a cabo a una alta conductividad, tal como se definió anteriormente.

En otra realización preferida, en la que se llevan a cabo tres etapas de lavado, es decir, las etapas de lavado (1), (2) y (3), la etapa de lavado (3) preferiblemente no contendrá sal; por consiguiente, el pH en esta etapa no sería relevante, siempre que se cumplan las condiciones mencionadas anteriormente para el caso de dos etapas de lavado y se aumente el pH en la etapa de elución en al menos 0,5 unidades de pH, en comparación preferiblemente con la etapa de carga y/o de lavado (2). El lavado (3) es preferiblemente un lavado a baja conductividad (en ese caso, no es necesario realizar la etapa c(1), si la conductividad del eluato resultante ya es baja).

En una realización especialmente preferida, el valor de pH en la etapa de lavado (3) ya puede aumentarse al nivel del valor de pH de la etapa de elución. Por lo tanto, el pH preferido de la etapa de lavado (3) es de entre 7,0 y 8,2, preferiblemente entre 7,3 y 8,0, incluso más preferiblemente de 7,3 - 7,5. Si la etapa de lavado (3) se realiza en esta condición particular de pH, los presentes inventores hallaron que el grado de impurezas que se encuentran comprendidas en el producto deseado eluido se reduce adicionalmente en comparación con una situación en la que no se realiza la etapa de lavado (3) o en la que dicha etapa se realiza a un pH diferente, por ejemplo a un pH que sigue siendo tan bajo como el pH usado durante las etapas de carga y/lavado (1) y (2). Los inventores creen, aunque no desean restringirse a esa hipótesis, que ajustando el pH de la etapa de lavado (3) al mismo pH que la elución evita un gradiente de pH durante la elución. Un gradiente de pH durante la elución podría ser una fuente de interferencia que permita que algunas impurezas se eluyan conjuntamente con el producto. El lavado 3 tal como se describió anteriormente acondiciona la columna ventajosamente para la elución. Un alto pH y una baja conductividad de este lavado impiden la elución conjunta de impurezas durante la siguiente elución.

Incluso más preferiblemente, la etapa de lavado (3) debe tener una conductividad, y en particular un poder de elución que sea muy bajo o incluso cercano a cero. Una conductividad tan baja sería preferiblemente de 1 - 15 mS/cm (TA), más preferiblemente por debajo de 5 mS/cm (TA).

En una realización preferida, la etapa de carga (a) comprende una disolución que comprende proteínas, el producto deseado y todos los compuestos de los medios de cultivo celular, incluyendo aminoácidos, vitaminas, azúcares, metales traza, etc. (incluyendo KCl, NaCl, Ca, aprox. 13 mS/cm (TA)). Después de la etapa de carga, se lleva a cabo preferiblemente una etapa de lavado 1 que luego completa la carga (preferiblemente cerca de o a pH neutro y con una baja conductividad). Después de eso, sigue preferiblemente una segunda etapa de lavado 2, que se considera un lavado riguroso, y se lleva a cabo preferiblemente con un bajo pH y de 150 a 210, preferiblemente de 170 a 190 mM, lo más preferiblemente 180 mM (si se lleva a cabo con NaCl, las condiciones preferidas para diferentes sales estarían dentro del conocimiento del experto en la técnica), seguido en una realización preferida adicional por una etapa de lavado 3 que prepara la columna cargada para la elución. Esta tercera etapa de lavado se lleva a cabo preferiblemente a baja conductividad y a un pH tal como se definió anteriormente. Esta etapa de lavado tiene la tarea principal de reducir la conductividad en la columna y devolver el pH a la neutralidad, ya que el lavado anterior tenía un bajo pH, e incluso llevar la columna cerca del pH de la elución, tal como se explicó anteriormente. Estas medidas preparan la columna para la elución de pseudoafinidad con calcio e impiden la elución conjunta de impurezas en la interfase entre el tampón de elución y el tampón de lavado 2.

La elución se lleva a cabo preferiblemente con un tampón que contiene un catión divalente y NaCl de 150 a 210, preferiblemente de 170 a 190 mM y lo más preferiblemente 180 mM. Serían posibles otros contraaniones, además del cloruro anterior (el más preferido), por ejemplo acetato, fosfato, sulfato, carbonato, aunque sin limitarse a estos, y a un pH de 7,5 a 8,5, preferiblemente de 7,8 a 8,2 y lo más preferiblemente un pH de 8,0, en cualquier caso un pH que sea al menos 0,5 unidades de pH mayor que el pH usado durante la carga y, opcionalmente, durante el lavado, preferiblemente durante el lavado 2.

Además, se conocen bien en la técnica tampones de carga adecuados para cargar una proteína de unión a cationes

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

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

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

La elución de la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un catión divalente puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. En particular, los eluyentes adecuados que contienen contracaciones adecuados se conocen bien en la técnica. Los contracaciones preferidos incluyen  $Ca^{2+}$ ,  $Be^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , o combinaciones de los mismos. El más preferido es el calcio. El tampón de elución tiene preferiblemente un pH que es mayor que el pH del tampón de lavado. El pH se aumenta preferiblemente en al menos 0,5, preferiblemente 1,0 unidades de pH. Muy preferiblemente, el tampón de elución tiene un pH de entre 7,5 y 8,5, incluso más preferiblemente de 7,9 a 8,1. Puede contener cualquier concentración de sal adecuada para eluir la proteína de unión a cationes divalentes del primer material de resina de intercambio aniónico sin eluir impurezas en una cantidad significativa que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, puede contener un agente tampón adecuado como, por ejemplo, HEPES, Tris, preferiblemente Tris 20 mM, Tris/acetato, histidina, Gly-Gly, MOPS o tricina, en concentraciones que oscilan normalmente entre 5 y 50 mM. También puede contener una sal adecuada, por ejemplo sales de los siguientes cationes y aniones:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $NH_4^+$  y aniones como cloruro, fosfato, sulfato, carbonato, acetato, para regular la conductividad del tampón, tales como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de 150 - 200 mM.

La siguiente es una lista de tampones particularmente preferidos:

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

HEPES: tampones a pH =  $7,7 \pm 1,0$ ,

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

Tricina: tampones a pH =  $8,3 \pm 1,0$ ,

Histidina: tampones a pH =  $7,6 \pm 1,0$ ,

Gly-Gly: tampones a pH =  $7,4 \pm 1,0$ ,

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

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

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

MES: tampones a pH = aprox. 6.0.

El tampón de elución también puede contener una sal adecuada para regular la conductividad del tampón de lavado, tales como por ejemplo NaCl, que puede estar presente en una concentración de 100 - 200 mM. El valor absoluto de la concentración de sal depende de la proteína de unión a cationes divalentes que va a purificarse, en el que el experto en la técnica tiene conocimientos para determinar qué proteínas de unión de cationes divalentes requieren concentraciones de sal menores o mayores para obtener la pureza óptima.

Después de la etapa de elución, la combinación de eluato obtenida se diluye para disminuir la conductividad y la concentración de cationes divalentes, preferiblemente se aumenta la concentración de calcio. Esta medida proporciona condiciones que impiden la unión del producto a la segunda resina de intercambio aniónico y facilita la unión de las proteínas de célula huésped. Tal dilución la conoce un experto en la técnica y se lleva a cabo según métodos bien conocidos. Por ejemplo, la adición de un tampón de dilución de volumen de columna aumenta el Ca y reduce ligeramente la conductividad. La disolución diluida tiene preferiblemente un pH final de 7 a 8, más preferiblemente de 7,5 a 7,9.

El experto en la técnica entiende que los procedimientos adicionales para proporcionar a la combinación de eluato obtenida la conductividad disminuida también se encontrarían dentro de la definición de diluir la combinación de eluato para disminuir la conductividad. Por tanto, otras posibilidades para disminuir la conductividad de la combinación de eluato serían cambiar la composición del tampón, por ejemplo, mediante dilución con un tampón de bajo contenido en sal o mediante diálisis, o mediante el uso de diafiltración.

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

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

- a) La primera columna de intercambio aniónico se carga con el material de partida, es decir, en una realización preferida con el material de cultivo celular. Este es un material de partida altamente impuro. La segunda columna de intercambio aniónico se carga con material que ya se ha purificado hasta cierto grado, ya que es el material obtenido después de la etapa de elución (y complementación).
- b) La primera etapa de intercambio aniónico se lleva a cabo con cationes divalentes, para la elución del producto, después de haber cargado la primera columna de intercambio aniónico en ausencia de cationes divalentes.

- 5 c) El pH y la concentración de los cationes divalentes de la carga para el segundo intercambio aniónico se seleccionan en una realización preferida de modo que el pH de la carga (d) sea mayor que el pH de o bien el lavado (ácido, por ejemplo, el lavado 2) después de la carga (a) o bien la carga (a) *per se* si no se usa ninguna etapa de lavado. Además, la conductividad de la carga (d) es comparable a la del lavado ácido, pero preferiblemente menor, si se lleva a cabo este lavado. La concentración de cationes divalentes, es decir, la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  es mayor en la carga (d) que en el tampón de elución de la etapa (b).
- 10 d) Por consiguiente, en la primera columna de intercambio aniónico el producto se une a la columna y en la segunda columna de intercambio aniónico el producto no se une.

15 La proteína de unión a cationes divalentes según la presente invención puede ser cualquier proteína de unión a cationes divalentes, tal como por ejemplo una proteína de unión a calcio y/o una proteína dependiente de vitamina K. En una realización preferida, la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, particularmente preferido del grupo que consiste en factor IX, factor VII y anexina V.

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

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

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

50 El método inventivo tal como se describe en el presente documento permite la retirada o separación de formas inactivas y truncadas, por ejemplo, de FIX del producto de FIX activo. El método también permite controlar o mantener la formación de impurezas relacionadas con el producto a un nivel muy bajo (por ejemplo, productos de degradación, agregación de productos, partículas). Aún más, el método proporciona condiciones para mantener la cantidad de FIX activado (FIXa) en un nivel particularmente bajo. Además, el método es particularmente potente para separar las impurezas relacionadas con el procedimiento (PCH de CHP, ADN de CHO, componentes de los medios) del producto de FIX activo.

55 Otra impureza que se encuentra en particular en las preparaciones de FIX, incluso en las preparaciones farmacéuticas de FIX, es el FIX activado, es decir, FIXa. Se ha demostrado que FIXa afecta negativamente a la preparación de FIX resultante deseada ya que aumenta la trombogenicidad. Por tanto, es muy deseable proporcionar métodos para reducir el contenido de FIXa en una preparación de FIX.

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

65 De manera ventajosa y sorprendente, también es posible según la presente invención reducir el contenido de proteína de célula huésped (PCH), en particular PCH de células CHO, si el material de partida usado es un FIX producido de manera recombinante en un cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular.

De una manera ventajosa y sorprendente adicional, es posible adicionalmente disminuir el contenido de ADN de célula huésped, en particular ADN de CHO en la composición que puede obtenerse mediante el presente método inventivo.

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

10 En una realización preferida, la proteína de unión a cationes divalentes que se ha purificado según el método de la presente invención tiene una pureza con respecto a las impurezas de la proteína de célula huésped (PCH) de al menos el 95% p/p, más preferiblemente al menos el 98% p/p, más preferiblemente al menos el 99% p/p, y lo más preferiblemente al menos el 99,5% p/p de proteína de unión a cationes divalentes en la proteína total. Por consiguiente, en una realización preferida, el contenido de impurezas de PCH en la proteína de unión a cationes divalentes purificada es menor del 5% p/p, más preferiblemente menor del 2% p/p, más preferiblemente menor del 1% p/p, y lo más preferiblemente menor del 0,5% p/p. Los valores porcentuales de las impurezas de PCH se refieren al peso/peso del producto, es decir, la proteína de unión a cationes divalentes purificada, y pueden medirse, por ejemplo, mediante HPLC o ELISA.

15 La presente invención se refiere además al uso del método de la presente invención tal como se definió anteriormente.

20 La presente invención proporciona un método eficiente para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes usando materiales de resina de intercambio aniónico que permiten una alta reducción de impurezas relacionadas con el procedimiento de la proteína con altos rendimientos de producto de manera concomitante.

25 La combinación de eluato que se ha diluido en la primera etapa de purificación por intercambio aniónico se carga luego en la segunda columna de intercambio aniónico, en la que la proteína de unión a cationes divalentes no se unirá en las condiciones aplicadas. La proteína de unión a cationes divalentes resultante contenida en el afluente de la columna de la segunda purificación de intercambio aniónico tiene una alta pureza y una alta actividad específica. Además, tiene un bajo contenido de PCH (CHO), un bajo contenido de ADN (CHO) y un bajo contenido de FIXa.

30 El contenido de factor FIXa se mide en función de su actividad, expresada en porcentaje de actividad con respecto a la actividad del factor IX.

35 La potencia (en unidades internacionales, U.I.) de un producto de FIX recombinante (rFIX), se determina usando un ensayo de coagulación de una etapa *in vitro* ampliamente conocido y aceptado que usa una referencia calibrada frente al patrón internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el concentrado de factor IX. Una unidad internacional es la cantidad de actividad FIX presente en 1 ml de plasma humano normal combinado.

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

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

50 Tomado en conjunto, el contenido relativo de FIXa de todos los lotes fue bajo de manera sistemática y aparentemente hasta 10 veces menor que el del producto comparativo.

55 En particular, el método de la presente invención se basa en los siguientes principios. Generalmente, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico aumenta a menores conductividades y mayores valores de pH. Y viceversa, la unión de proteínas a materiales de resina de intercambio aniónico disminuye a mayores conductividades y menores valores de pH. En el método de la presente invención, la proteína de unión a cationes divalentes se carga y/o se lava preferiblemente a un bajo pH, tal como se explicó con detalle anteriormente, lo que todavía permite la unión de la proteína de unión a cationes divalentes al primer material de intercambio aniónico y no daña la integridad estructural o la actividad de la proteína de unión a cationes divalentes. Muchas impurezas de proteína no se unirán al primer material de resina de intercambio aniónico y, por tanto, la unión de impurezas al primer material de resina de intercambio aniónico se reduce en gran medida mientras que el producto sí se une, en efecto, a la primera columna de intercambio aniónico. Se impide que coeluyan las impurezas de proteína que se unen al primer material de resina de intercambio aniónico en estas condiciones, y no se retiraron por lavado, aumentando el pH

durante la elución. El aumento del pH en el eluyente hace que todas las proteínas se unan incluso más fuerte al primer material de resina de intercambio aniónico, pero el catión divalente interacciona específicamente con el producto provocando la elución. El eluato de la primera columna de intercambio aniónico se acondiciona para ajustar la conductividad (igual a o menor que la del lavado ácido, tal como se ha descrito anteriormente), aumentar el pH (al menos 0,5 mayor que el de la carga (a) o el lavado ácido) y aumentar la concentración de cationes divalentes (para que sea mayor que en la carga (a)). Estas medidas proporcionan las condiciones para la unión selectiva de impurezas y la ausencia de unión selectiva del producto en la resina de intercambio aniónico. Según el método de la presente invención, sólo la proteína de unión a cationes divalentes no se une al segundo material de intercambio aniónico debido a los cationes divalentes presentes en el eluato. En este contexto, debe indicarse que aumentar el pH durante la elución en la etapa (b) es muy atípico para un procedimiento de elución de intercambio aniónico y aumentar el pH para la carga en la etapa (d) en comparación con el lavado ácido es muy atípico para un procedimiento de cromatografía negativa, es decir, una cromatografía de intercambio aniónico en la que se espera la proteína que va a purificarse en la fracción no retenida puesto que, tal como se ha establecido anteriormente, las proteínas generalmente se unen más fuerte a los materiales de resina de intercambio aniónico a mayores valores de pH. Usando el eluato del primer material de resina de intercambio aniónico con al menos un catión divalente, el método de la presente invención logra sorprendente y ventajosamente puridades superiores del producto de proteína de unión a cationes divalentes por cromatografía de intercambio aniónico.

En particular, el aumento del pH durante la elución del producto inducida por Ca de la etapa (b) (el tampón de elución tiene un mayor pH que el tampón de carga de la etapa (a) o el lavado ácido de la etapa (a)) y el ajuste de la carga para la etapa (d) (mayor pH que el lavado ácido de la etapa (a), mayor cantidad de cationes divalentes que el eluyente de la etapa (b)) proporciona una purificación selectiva de proteínas de unión divalente (Ca) y evita la elución conjunta de impurezas. La carga del segundo material de resina de intercambio aniónico a alto pH y alto contenido de calcio (como ejemplo de cationes divalentes) obliga a las impurezas a unirse al segundo material de resina de intercambio aniónico mientras que se inhibe la unión de la proteína que va a purificarse mediante la complementación con cationes divalentes. Según la presente invención, las condiciones anteriores dan como resultado una alta pureza así como altos rendimientos de proteínas de unión a cationes divalentes. El método de la presente invención puede proporcionar una reducción significativa de las impurezas polipeptídicas relacionadas con el procedimiento, por ejemplo cargando la disolución de proteína en un material de resina de intercambio aniónico a pH reducido, eluyendo el producto con un eluyente con al menos un catión divalente a pH aumentado y cargando el eluido en un segundo material de resina de intercambio aniónico a alto pH y una concentración aumentada de cationes divalentes, y recogiendo la fracción no retenida.

La estrategia de purificación se basa en las propiedades bioquímicas únicas de las proteínas dependientes de vitamina K. Por ejemplo en el dominio Gla, aproximadamente 12 cargas negativas están centradas dentro de un tramo corto de aminoácidos. Esta carga negativa puede neutralizarse o incluso convertirse en carga positiva mediante la adición de cationes divalentes (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) al sistema. Basándose en este efecto, por ejemplo rFIX puede unirse a resinas de intercambio iónico en un estado de carga específico y eluirse del gel convirtiendo la carga retirando (o añadiendo)  $\text{Ca}^{2+}$ . Este principio de separación se denomina "cromatografía de pseudoafinidad". Este principio se refleja también en aquellas proteínas dependientes de vitamina K que no comprenden un dominio Gla. El presente método inventivo que se aplica para la purificación de proteínas de unión a cationes divalentes tales como, por ejemplo, rFIX introduce desplazamientos de pH en los tampones de carga, lavado y/o eluato para mejorar significativamente la retirada de impurezas relacionadas con el producto y el procedimiento, tales como especies inactivas de FIX y proteínas de células huésped CHO.

#### Procedimiento de purificación de rFIX

Los inventores desarrollaron una línea celular CHO recombinante que expresa el factor IX humano recombinante basándose en la línea celular parenteral CHO DXB11. La línea celular se diseñó de manera que coexpresa furina humana recombinante para mejorar la maduración intracelular de pro-FIX en FIX. Para el procedimiento de producción, se cultivan las células en suspensión en modo quimiostático y se adaptaron a un medio definido químicamente sin ninguna adición de proteínas derivadas de mamíferos o plasma. Se añadió peptona de soja al medio de crecimiento para mejorar la productividad del clon.

En una campaña de producción quimiostática, se clarifica la cosecha de cultivo celular recogido mediante filtración profunda en filtros de profundidad Cuno (con potencial zeta positivo) y filtración de membrana de 0,2 µm en membranas de filtro de PVDF o PES para retirar las células y los restos celulares. La cosecha libre de células filtradas representa el material de partida para desarrollar el procedimiento de purificación de rFIX.

#### **Ejemplo**

El procedimiento de purificación a gran escala aplicado para la producción clínica de rFIX comienza con una etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose Fast Flow cargando la cosecha clarificada con una complementación de EDTA 2 mM (véase la tabla 1) y un pH de aproximadamente 7,0 - 7,4. Después de la carga (la carga era sobrenadante de cultivo celular libre de células de una línea celular CHO que expresa rFIX) y el lavado 1, se realiza un lavado 2 de bajo pH a pH 6,0 para retirar las especies de FIX inactivas y las proteínas CHO unidas.

Se realiza un tercer lavado con baja conductividad y un pH de 7,3 - 7,5 para preparar la columna para la elución. El FIX unido se eluye de la columna con un tampón que contiene calcio y tiene un pH de 8,0 que está significativamente por encima del pH del lavado 2. Este procedimiento da como resultado una elución selectiva de FIX y una elución conjunta muy baja de impurezas relacionadas con el producto y el procedimiento (especies de FIX inactivas y proteína de célula huésped CHO). Se retiró aproximadamente el 99,5% de las proteínas PCH de CHO aplicadas a la columna (factor de reducción de PCH de CHO de aproximadamente 190) en esta etapa y la actividad específica de FIX aumentó en un factor de aproximadamente 1,5. La tabla 2 a continuación resume la composición de los tampones para la etapa de captura con Q-Sepharose (primera etapa de intercambio aniónico).

En la combinación de eluato de la primera etapa de purificación por intercambio aniónico, se realiza una inactivación viral con disolvente/detergente añadiendo Triton X-100 al 1%, fosfato de tri-n-butilo al 0,3% y polisorbato 80 al 0,3%. Luego se diluye la disolución de FIX tratada con S/D con un tampón que contiene calcio para ajustar la concentración de calcio a aproximadamente 6 mM y reducir la conductividad a 15 - 18 mS/cm (TA). El pH de la disolución desciende ligeramente desde 8,0 hasta aproximadamente 7,6 - 7,8.

Luego se aplica la disolución de FIX diluida y tratada con S/D a la primera etapa de pulido en Q-Sepharose Fast Flow, que no se une al FIX en las condiciones aplicadas (véase la tabla 3 a continuación). La proteína de célula huésped CHO residual (PSH de CHO) puede unirse a la resina de intercambio aniónico debido al mayor pH en comparación con el lavado 2 (etapa de captura en Q-Sepharose Fast Flow) y la menor conductividad en comparación con la combinación de eluato de la etapa de captura.

Los resultados que se obtuvieron con este método de purificación mejorado se resumen en las tablas 4 y 5 a continuación; las tablas 4 y 5 representan los resultados de dos ejecuciones realizadas posteriormente.

Tabla 1: Esquema de purificación final para la captura de FIX en Q Sepharose Fast Flow (primera etapa de intercambio aniónico)

Etapa	Tampón	Cantidad	Velocidad de flujo	Comentario	
		VC	cm/h		
1	activación de resina	activación de QFF	2,0	150	
2	Equilibración	Equi. de QFF	4,0	150	
3	carga de muestra	SCC libre de células complementado con EDTA 2 mM	aprox. 125 VC	150	Carga: 0,5 – 1,2 mg de Ag de FIX/ml de resina
4	lavado 1	Equi. de QFF	2,0	150	
5	lavado 2	Equi. de QFF	5,0	100	
6	lavado 3	Equi. de QFF	2,0	100	
7	elución	Equi. de QFF	5,0	50	La recogida comienza después de 0,5 VC y finaliza después de 5 VC

Las velocidades de flujo sugeridas se basan en una altura de lecho de columna de 20 cm; se realizan todas las etapas a 2-8°C.  
CCS: sobrenadante de cultivo celular

Tabla 2: Composición de tampones para la etapa de captura en Q-Sepharose

30

	Tampón/etapa	Composición	Conductividad [mS/cm] a TA
	Activación de resina, act. de QFF	NaCl 2000 mM	n.d.
equilibración	Equilibración, lavado, Equi. de QFF	Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH=7,4 ± 0,2 a TA	1,5 – 2,5
lavado	lavado Lavado de QFF	MES 20 mM, NaCl 180 mM, EDTA 2 mM, pH=6,0 ± 0,2 a TA	16,5 – 19
elución	Elu. de QFF	Tris 20 mM, NaCl 180 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH=8,0 ± 0,2 a TA	17 – 22
Disolución madre de EDTA	EDTA	EDTA 200 mM	
n.d. = no determinado			

## ES 2 908 920 T3

Tabla 3: Esquema de purificación para la etapa de pulido de FIX en Q Sepharose Fast Flow (segunda etapa de intercambio aniónico)

Etapa		Tampón	Cantidad	Velocidad de flujo cm/h	Comentario
			VC		
1	activación de resina	NaCl 2 M	> 5,0	76	
2	equilibración	tampón de equi. de QFF	> 4,0	76	
3	carga de muestra	Combinación de rFIX diluida y tratada con S/D*	aprox. 300 litros	76	Carga: 0,5 – 1,2 mg de Ag de FIX/ml de resina
4	lavado 1	tampón de equi. de QFF	0,75	76	
<p>Las velocidades de flujo sugeridas se basan en una altura de lecho de columna de 20 cm; se realizan todas las etapas a 2-15°C. Durante la carga, no se unirá el producto a la resina y se recogerá en la fracción no retenida de la columna, combinando las fracciones efluente de columna y lavado 1. * conductividad de aproximadamente 18 mS/cm (TA)</p>					

Tabla 4: Resultados después de dos etapas de intercambio aniónico - ejecución A

	Rendimiento de etapa de coagulación de FIX %	Rendimiento de etapa con antígeno de FIX %	Actividad específica de FIX Unidades de coagulación / mg Ag de FIX	Reducción de PCH de CHO*	Impureza PCH de CHO µg/mg de Ag de FIX	ADN de CHO pg/ml
Carga QFF_01	-	-	160	-	1200	28000
Eluato QFF_01	104	93	270	229	7,7	< 1
Efluente QFF_02	98	101	275	1,75	4,6	< 1

Tabla 5: Resultados después de dos etapas de intercambio aniónico - serie B

	Rendimiento de etapa de coagulación de FIX	Rendimiento de etapa con antígeno de FIX	Actividad específica de FIX	Reducción de PCH de CHO*	Impureza PCH de CHO	ADN de CHO
	%	%	Unidades de coagulación / mg Ag de FIX	razón	µg/mg de Ag de FIX	pg/ml
Carga QFF_01	-	-	157	-	1200	3000
Eluato QFF_01	103	90	296	215	9,2	< 1
Efluente QFF_02	101	96	290	1,7	6,4	< 1

\*: razón de reducción de PCH de CHO: calculada como cociente de PCH de CHO cargada en la columna con respecto a proteína PCH de CHO hallada en el eluato calculada a partir de los mg totales

## REIVINDICACIONES

1. Método para la purificación de una proteína de unión a cationes divalentes, que comprende las etapas de:
  - 5 (a) cargar un primer material de resina de intercambio aniónico con la proteína de unión a cationes divalentes en un tampón de carga en ausencia de cationes divalentes o a una concentración de cationes divalentes de 1000  $\mu\text{M}$  como máximo, seguido opcionalmente por de una a tres etapas de lavado;
  - 10 (b) eluir la proteína de unión a cationes divalentes con un eluyente que comprende un catión divalente y un contraanión para formar un eluato que contiene la proteína de unión a cationes divalentes;
  - (c) diluir la combinación de eluato obtenida (para disminuir opcionalmente la conductividad) y aumentar la concentración del catión divalente;
  - 15 (d) cargar un segundo material de resina de intercambio aniónico con el eluato obtenido después de la etapa (c); y
  - (e) recoger la fracción no retenida que contiene la proteína de unión a cationes divalentes.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que después de la etapa de carga se realiza(n) una o más etapas de lavado (1), (2) y/o (3) con un tampón de lavado (1), (2) y/o (3) en ausencia de un catión divalente pero en presencia de un contraanión.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos uno del tampón de carga y/o el tampón de lavado tiene(n) un pH que es al menos 0,5 unidades de pH menor que el pH del eluyente de la etapa (b), preferiblemente en el que o bien el tampón de carga y/o bien el tampón en la etapa de lavado (2) tiene(n) un pH que es al menos 0,5 unidades de pH menor que el pH del eluyente de la etapa (b).
- 30 4. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el eluyente en la etapa (b) tiene una conductividad que es mayor que la conductividad del tampón de carga en la etapa (a) y el tampón de lavado opcional y en el que el eluato complementado, es decir, diluido, en la etapa (c) tiene una conductividad que es menor que la conductividad del eluyente en la etapa (b).
- 35 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos un catión divalente en la etapa (b) se selecciona del grupo que consiste en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , o combinaciones de los mismos.
- 40 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el primer y el segundo materiales de resina de intercambio aniónico tienen cada uno un grupo cargado positivamente que se selecciona independientemente del grupo que consiste en dietilaminoetano (DEAE), dimetilaminoetano (DMAE), trimetilaminoetilo (TMAE), polietilenimina (PEI), aminoalquilo cuaternario, aminoetano cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q).
- 45 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el primer y el segundo materiales de resina de intercambio aniónico portan, cada uno, una amina primaria como ligando que se selecciona independientemente del grupo que consiste en aminohexilo, benzamidina, lisina y arginina.
- 50 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína de unión a calcio, preferiblemente en el que la proteína de unión a cationes divalentes es una proteína dependiente de vitamina K.
- 55 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína de unión a cationes divalentes se selecciona del grupo que consiste en factor II, factor VII, factor IX, factor X, proteína C, proteína S, anexina y calmodulina, particularmente preferido del grupo que consiste en factor IX (FIX), factor VIIa (FVIIa) y anexina V.
- 60 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el pH en la etapa (a) es de 6,8 a 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,4, para un caso en el que se realiza una etapa de lavado opcional y el pH es de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,9 a 6,1 en un caso en el que no se realiza la etapa de lavado opcional, y/o en el que el pH de la etapa de lavado opcional (3) es de entre 7,0 y 8,2, preferiblemente entre 7,3 y 8,0, incluso más preferiblemente de 7,3 - 7,5, y/o en el que el pH en la etapa de lavado opcional (1) es de 7,3 - 7,5, y el pH de la etapa de lavado opcional (2) es preferiblemente de 5,5 a 6,5, preferiblemente de 5,9 a 6,1, y/o en el que el tampón de elución (es decir, el eluyente) en la etapa (b) contiene calcio y tiene un pH de 7,5 a 8,5, preferiblemente de 7,8 a 8,2, y/o en el que el pH del tampón de carga en la etapa de carga (d) es mayor que el pH del tampón de carga en la etapa de carga (a) o el pH del lavado, que sigue después de la carga.
- 65

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10 anteriores, particularmente según la reivindicación 3, en el que la conductividad en la etapa de carga (d) es igual a o menor que la conductividad del lavado, que sigue después de la carga (a), y/o en el que la concentración de cationes divalentes del tampón de carga en la etapa (d) es mayor que la concentración de cationes divalentes en el tampón de elución de la etapa (b), y/o en el que la etapa de proporcionar la combinación de eluato obtenida con una baja conductividad se lleva a cabo mediante dilución con un tampón de dilución apropiado, alternativamente cambiando la composición del tampón, o alternativamente mediante diálisis, diafiltración o filtración en gel.
- 5