

RESUMO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO FACTOR VIII DE COAGULAÇÃO"

Processo de purificação ou enriquecimento de FVII de coagulação empregando cromatografia, compreendendo os passos de proporcionar uma fracção contendo FVIII numa solução aquosa possuindo uma força iónica elevada; colocar em contacto a fracção que contém FVIII com uma resina multimodal; lavar opcionalmente a resina multimodal possuindo FVIII adsorvido com um tampão de lavagem aquoso, eluindo as fracções que contêm FVIII por um tampão de eluição aquoso compreendendo, pelo menos, um aminoácido que está carregado positivamente a pH 6 até 8 e recolher opcionalmente as fracções contendo FVIII na forma purificada ou enriquecida.

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO FACTOR VIII DE COAGULAÇÃO"

A presente invenção refere-se a um processo de purificação do factor VIII de coagulação (abreviado como FVIII) e uma fracção que contém o FVIII que se pode obter pelo processo da invenção.

Antecedentes da invenção

A hemofilia é um grupo de distúrbios genéticos hereditários que prejudicam a capacidade do corpo para controlar a aglutinação ou coagulação sanguínea. Na sua forma mais comum, a Hemofilia A, há uma deficiência de FVIII de aglutinação, a Hemofilia A ocorre em cerca de 1 em cada 5 000-10 000 nascimentos de indivíduos do sexo masculino. A proteína FVIII é um cofator essencial na coagulação do sangue com propriedades multifuncionais. A deficiência de FVIII pode ser tratada com concentrados de FVIII derivados do plasma ou com FVIII produzido de forma recombinante. O tratamento com concentrados de FVIII conduziu a uma vida normalizada dos doentes com hemofilia. Historicamente, a Hemofilia A tem sido tratada com FVIII com origem no plasma de sangue humano. No plasma sanguíneo, em condições normais, a molécula de FVIII está sempre associada com o seu cofator; o factor von Willebrandt (vWF) que estabiliza a molécula de FVIII de diferentes formas de degeneração.

Os produtos de FVIII derivados do plasma ocorrem no mercado com diferentes purezas e com maiores ou menores quantidades de vWF presentes. Normalmente, os produtos com baixa quantidade de vWF contêm albumina humana adicionada e/ou outros estabilizadores que incluem o aumento na concentração de sal para estabilizar a molécula de FVIII). Os métodos utilizados para purificar FVIII eram normalmente uma combinação de diferentes métodos de precipitação, tais como crio precipitação, precipitação de hidróxido de alumínio, etc., e passos de cromatografia principalmente passos de permuta iônica, afinidade e filtração em gel.

De modo a melhorar os produtos de FVIII, foi empregue cromatografia de afinidade que removeu eficazmente os contaminantes até um grau elevado de pureza de FVIII, incluindo a possibilidade de reduzir também vWF (Farrugia et al., Biotechnology and plasma fractionation industry; The impact of advances in the production of coagulation FVIII. *Biotechnology*, Vol. 3, Nº 1, Fevereiro de 1993). A desvantagem com a cromatografia de imunoafinidade foi que é relativamente dispendiosa e que os anticorpos monoclonais utilizados como ligandos de afinidade eram de origem animal.

Nos meados da década de 80 existiam algumas transmissões de vírus associadas com produtos de FVIII derivados do plasma. Mesmo que este problema tivesse sido resolvido através da implementação de passos de redução de vírus específicos, este foi o ponto de partida do desenvolvimento de produtos de FVIII recombinante (rFVIII). Nos anos 90, foi comercializado o primeiro produto rFVIII e até à data existem três produtos de rFVIII diferentes (duas moléculas de tamanho total e uma molécula com o domínio B removido, na qual uma parte inativa da

molécula de FVIII foi removida para aumentar a produtividade da célula hospedeira (Eriksson *et al.*, The manufacturing process for B-domain deleted recombinant FVIII. *Seminars in Hematology*, Vol 38, Nº 2, Supl. 4 (Abril), 20001: pp24-31)) com um grau elevado de pureza (todos sem vWF).

Os métodos de purificação utilizados para purificar o rFVIII consistiam, todos, em combinações de diferentes técnicas de cromatografia (ref. Bhattacharyya *et al.*, Artigo de revisão; Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, Nº 3, Julho-Setembro 2003). Uma foi a conhecida técnica de imunoafinidade (mesmo que existam produtos que resolvam isto, por exemplo, com afinidade para o péptido (Kelly *et al.*, Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of FVIII.) ou um fragmento de anticorpo derivado de levedura (resina de afinidade para FVIII VIIISelect - GE Health care, Cat. Nº 17-5450 presentemente estão a entrar no mercado) como utilizado para o FVIII do plasma.

Como o vWF está ausente em todos os produtos de rFVIII, têm que ser tomadas certas medidas para estabilizar a molécula de FVIII contra a perda de actividade (agregação, proteases, adsorção de superfície, etc.). Num dos produtos, é adicionado um agente quelante (EDTA, etc.) para proteger o FVIII contra a degeneração de metaloproteases (documento US-A-5,831,026). Adicionar albumina, aprotinina, insulina ou mesmo co-expressar rFVIII com vWF (e removê-lo a jusante no ciclo de purificação) são estratégias que foram realizadas para aumentar a estabilidade da molécula de rFVIII (ref. Bhattacharyya *et al.*, Artigo de revisão; Recombinant FVIII for Haemophilia "An

overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, Nº 3, Julho-Setembro de 2003).

Outra estratégia (para manter um processo isento de aditivos de mamífero e agentes quelantes) é descrita no documento EPA-1707634, em que uma combinação de quantidades aumentadas de sais, contribuem para a estabilidade e a elevada recuperação do produto de rFVIII (Wang et. al, Coagulation FVIII, structure and stability. *International Journal of Pharmaceuticals*, 259 (2003), 1-15.). Contudo, esta técnica possui uma certa desvantagem. Por exemplo, o conteúdo de sal relativamente elevado faz com que não seja adequado para processar directamente num permutador iónico sem diluição (e possível desestabilização Parti et al., *In vitro stability of recombinant FVIII. Haemophilia* (2000), 6, 513-522. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 87, Nº 3, 5 de Agosto de 2004.).

O documento WO-A-2009/007451 divulga um método de purificação de FVIII utilizando uma resina de modo misto ou multimodal. O método de purificação é baseado no contacto da proteína FVIII com uma resina de misto modo ou multimodal que contém ligandos que compreendem uma parte hidrofóbica e uma parte carregada negativamente e eluir a referida proteína FVIII com um tampão de eluição que contém, pelo menos, 1,5 M de sal e pelo menos 40% (p/v) de etilenoglicol, propilenoglicol ou uma sua mistura e iões cálcio.

O documento EP-A-1707634 divulga um método para o isolamento de proteínas produzidas de forma recombinante *i. a.*, através de vários métodos, tais como cromatografia de imunoafinidade, cromatografia de afinidade, precipitação de proteína, trocas de tampão, cromatografia de permuta iônica, cromatografia de

interacção hidrofóbica, meio de cromatografia hidrofóbica/permute iónica de modo misto, cromatografia de quelação, cromatografia de afinidade para o hidrato de carbono como a cromatografia de afinidade para lectina ou heparina, cromatografia de exclusão de tamanho, electroforese, diálise, agentes de precipitação diferentes, tais como polietilenoglicol, sulfato de amónio, etanol, adsorção em hidroxiapatite, adsorção em filtro de membrana, ligandos acoplados a partículas magnéticas etc. Todavia, esta identifica passos de purificação cromatográfica particulares.

O documento WO-A-2005-082483 divulga um processo para a purificação de anticorpos de uma ou mais impurezas num líquido, cujo processo compreende colocar em contacto o referido líquido com uma primeira resina cromatográfica compreendida de um suporte ao qual os ligandos multimodais foram imobilizados para adsorver os anticorpos à resina, em que cada ligando multi-modal compreende, pelo menos, um grupo de permute catiónica e pelo menos um sistema de anel aromático ou heteroaromático. É adicionado um eluente para libertar os anticorpos da resina e, para eluir, é colocado em contacto com uma segunda resina cromatográfica.

O documento WO-A-2005/121163 divulga um processo para o isolamento de uma ou mais proteínas a partir de uma solução de proteína. O processo compreende os passos de proporcionar uma solução de proteína compreendendo uma ou mais proteínas específicas e possui um pH pré-definido e uma força iónica pré-estabelecida ou condutividade, aplicar a solução de proteína a uma coluna de leito empacotado ou leito expandido compreendendo um absorvente e obter uma ou mais proteínas da coluna; em que a solução de proteína foi suplementada com um álcool.

Descrição da invenção

Um objectivo da invenção foi evitar as desvantagens dos processos de purificação da técnica anterior proporcionando um novo processo. Outro objectivo da invenção foi proporcionar um processo de purificação do FVIII, em particular, de fontes que possuem um conteúdo de sal elevado, em particular, como são utilizados no fabrico de FVIII recombinante.

Isto é realizado através de um processo de purificação de FVIII de coagulação numa sequência de purificação que emprega cromatografia em que, pelo menos, uma cromatografia é realizada utilizando uma resina multimodal. A expressão “resina multimodal”, como aqui utilizada, significa um material cromatográfico que possui um suporte e unidades ligadas ao suporte cujas unidades interactuam com grupos químicos das substâncias a serem separadas e são capazes de interagir com FVIII numa mistura através de interacções iónicas e outros tipos de interacções, tais como ligação de hidrogénio e/ou interacção hidrofóbica.

De acordo com a invenção é proporcionado um processo de purificação ou enriquecimento de FVIII de coagulação empregando cromatografia compreendendo os passos de proporcionar uma fracção que contém FVIII numa solução aquosa possuindo uma força iónica elevada; colocar em contacto a fracção que contém FVIII com uma resina multimodal; lavar, opcionalmente, a resina multimodal possuindo FVIII adsorvido com um tampão de lavagem aquoso; eluir as fracções que contêm FVIII com um tampão de eluição aquoso compreendendo, pelo menos, um aminoácido que é

carregado positivamente a pH 6 até 8; e recolher, opcionalmente, as fracções que contêm FVIII na forma purificada ou enriquecida.

A cromatografia multimodal (ou modo misto) é uma ferramenta para purificar proteínas. Descrito em, por exemplo, Manual de Instruções do Fabricante GE Health Care (11-0035-45AA) Capto Adhere, Manual de Instruções do Fabricante GE Health Care (28-9078-88AA) Capto MMC e pedido de patente EP 07114856.3 "A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins".

As técnicas possuem certas vantagens e desvantagens. Sendo uma vantagem a possibilidade para ligar proteínas numa concentração salina mais elevada, em comparação com a cromatografia de permuta iônica utilizada mais frequentemente. Uma desvantagem é que a eluição inclui, frequentemente, condições relativamente severas como por exemplo um pH abaixo ou acima do pH neutro, isoladamente ou em combinação com outros parâmetros de eluição. O FVIII é uma proteína relativamente instável, por exemplo, em relação aos valores de pH fora do valor neutro; pH 6-8 (Wang et al., FVIII de coagulação, estrutura e estabilidade. *International Journal of Pharmaceuticals*, 259 (2003), 1-15.). A invenção resolve este problema através de condições de eluição suaves num intervalo de pH próximo do neutro que retém a actividade da molécula de FVIII e facilita a utilização de cromatografia multimodal em combinação com os efeitos de estabilização da concentração de sal aumentada, descrito, por exemplo, no documento EP-A-1707634.

De acordo com uma forma de realização da invenção, a cromatografia multimodal pode ser realizada numa coluna cromatográfica. Isto pode ser encarado como um primeiro passo de

captura. O processo da invenção também pode ser realizado de um modo descontínuo. A presente invenção também facilita um processo de purificação sem a adição de aditivos estabilizantes derivados de humanos ou animais e a utilização de um processo total que não os possui (resinas de imunoafinidade à base de anticorpo monoclonal). A utilização da resina multi-modal, em particular, como passo de captura, facilita também uma capacidade de ligação mais elevada em comparação com permutadores de iões convencionais, que resulta num produto mais concentrado eluído do passo, que é vantajoso para a estabilidade do produto.

O processo da invenção está tipicamente relacionado com a purificação de FVIII recombinante (FVIII), em particular FVIII recombinante com o domínio B eliminado.

Tipicamente a solução compreende FVIII numa solução de concentração salina elevada que corresponde a uma condutividade desde cerca de 25 a cerca de 200 mS/cm a 25 °C.

Noutra forma de realização da invenção, o FVIII é aplicado à resina multimodal e, após ligação à resina multimodal, é subsequentemente eluído com um tampão adequado.

Após aplicação da mistura que compreende FVIII e ligação de FVIII à resina multimodal, a molécula de FVIII é eluída da resina multimodal utilizando um tampão de eluição compreendendo, pelo menos, um aminoácido que está carregado positivamente a um pH de 6 até 8, em particular o aminoácido que está carregado positivamente a um pH de 6 a 8 é lisina, arginina e/ou histidina.

Adicionalmente, o tampão pode ser compreendido de, pelo menos, um grupo hidroxilo que contém um composto orgânico, tal como um álcool, pelo menos, um grupo amino contendo um composto orgânico tal como um aminoácido, uma fonte de fornecimento de iões Ca^{2+} , pelo menos, um composto para regular a força iônica do tampão, tal como sais inorgânicos e. g., NaCl , em particular em concentrações $\leq 1\text{M}$, um detergente não iônico e uma substância tamponante para regular o pH desde cerca de 6 a cerca de 8, em particular até cerca de um valor neutro.

Numa outra forma de realização do processo da invenção, o álcool pode ser seleccionado do grupo de metanol, propanol e etilenoglicol; o aminoácido pode ser seleccionado do grupo de arginina, lisina e histidina; a fonte de fornecimento de Ca^{2+} pode ser CaCl_2 ; os sais inorgânicos podem ser seleccionados do grupo de KCll e NaCl ; o detergente não iônico pode ser seleccionado do grupo de Tween 20, Tween 80 e Pluronic F68; uma substância tamponante pode ser seleccionada do grupo de citrato de sódio, histidina, HEPES, MES e acetato de sódio a um pH entre 6-8.

Particularmente, a concentração do aminoácido que está carregado positivamente a um pH de 6 até 8 está presente numa quantidade de, pelo menos, $>0,4\text{ M}$, em particular $>0,5\text{ M}$. Se forem utilizadas concentrações superiores a 1M do aminoácido particular, isto não conduz a outras vantagens adicionais. Tipicamente, a quantidade de arginina está num intervalo desde cerca de 0,4 M a cerca de 1,0 M, em particular num intervalo desde cerca de 0,7 M a cerca de 0,9 M. O grupo hidroxilo que contém um composto orgânico tal como um álcool e. g. etilenoglicol está em particular presente em quantidades desde 0% (v/v) a 30% (v/v), em particular desde cerca de 5% a 15%. A

concentração do ião cálcio deve estar no intervalo desde cerca de 0,0001 M a cerca de 0,1 M, em particular, desde cerca de 0,001 M a cerca de 0,03 M. A concentração do composto para regular a força iônica do tampão deve estar dentro do intervalo para proporcionar uma condutividade desde cerca de 15 a cerca de 200 mS/cm a 25 °C. A quantidade de detergente não iônico está, tipicamente, no intervalo desde cerca de 0,001% até 1%.

Numa forma de realização do processo da invenção, é aplicado um tampão de lavagem à resina multimodal. Isto pode ser utilizado para remover por lavagem os contaminantes e reter FVIII, antes do FVIII ser libertado.

Numa outra forma de realização do processo da invenção, a resina de cromatografia "multimodal" contém pelo menos uma das seguintes unidades:

- i) um ligando de N-Benzil-N-metil-etanolamina carregado positivamente
- ii) um ligando de ácido 2-(benzoilamino) butanóico carregado negativamente,
- iii) um ligando de fenilpropilo,
- iv) um ligando de N-hexilo,
- v) um ligando de 4-Mercapto-Etil-Piridina,
- vi) um ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetra-hidrofuran-2-ilmetil)-amino)-fenil)-amino)-benzóico ou suas combinações.

Em particular, no processo da invenção, a resina de cromatografia "multimodal" é seleccionada das seguintes resinas disponíveis comercialmente HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

Noutra forma de realização do processo da invenção, o passo de cromatografia multimodal é combinado com um passo de cromatografia de afinidade para FVIII, em que a afinidade é fornecida por um ligando de proteína, tal como um fragmento de anticorpo que é expresso na levedura.

De acordo com o processo da invenção a sequência de purificação compreende ainda os passos de remoção/inactivação de agentes patogénicos, compreendendo um passo de inactivação de base química, um passo de remoção baseado no tamanho, passos de cromatografia ou suas combinações, cujos passos se baseiam nas propriedades fisiológicas diferentes dirigidas ao agente patogénico a ser removido.

Numa forma de realização particular do processo da invenção, a sequência de purificação compreende ainda os seguintes passos:

- i. a utilização de uma membrana aniónica, tal como Sartobind Q, em particular, para a redução de ADN;
- ii. uma resina catiónica multimodal, tal como Capto MMC;
- iii. uma resina de permutador de catião, tal como SP Sepharose FF;
- iv. a utilização de uma membrana aniónica secundária, tal como Sartobind Q, em particular, para posterior redução de ADN;
- v. um passo de inactivação de base química para vírus encapsulados em lípidos, em particular, a inactivação com

solvente/detergente que emprega tri-n-butil fosfato e Triton X-100 como divulgado no documento EP-A-131740;

vi. uma resina de afinidade baseada num ligando de proteína expresso em leveduras; tal como VIIISelect ou uma resina de cromatografia multimodal aniónica, tal como Capto Adhere;

vii. um passo de remoção por filtração do agente patogénico com um tamanho de poro médio de cerca de 20 nm, tal como Planova 20N;

viii. uma resina de permutador aniónico, tal como Q Sepharose FF;

ix. uma resina de cromatografia de exclusão por tamanho, tal como Superdex 200 pg.

Em particular, no processo da invenção, as condições de eluição do passo de permuta catiónica são baseadas na concentração dos iões Ca^{2+} , variando a concentração desde 0,15-0,25 M e a condutividade total do tampão de eluição não aumentado acima de 25 mS/cm a 25 °C.

Se for empregue o processo da invenção, a pureza do produto que se pode obter é >4000 IU/mg, após o último passo de purificação, de um modo preferido, >9000 IU/mg e, de um modo ainda mais preferido, >10000/mg de proteína e <1000 pg/1000 IU FVIII, de um modo preferido <100 pg/ 1000 IU FVIII e, de um modo ainda mais preferido, <10 pg/1000 IU FVIII em relação à contaminação de ADN.

Por isso, também uma composição de matéria é um tema da invenção cuja composição de matéria compreende um FVIII recombinante purificado, que se pode obter através do processo de acordo com a invenção (sem a adição ou utilização de quaisquer aditivos humanos ou animais como ligandos de imunoafinidade à base de albumina ou de anticorpo monoclonal).

O apêndice 1 apresenta um fluxograma de um processo de acordo com a invenção, em que o passo de captura é realizado numa resina multimodal. Uma suspensão celular é processada através da adição de sal, separação das células, seguida por um passo de redução de ADN, de um modo preferido, numa membrana Q. A membrana Q (por exemplo, Sartobind Q da Sartorius) é um permutador aniónico básico forte com grupos de amónio quaternários como unidades de permuta aniónica. Nos intervalos específicos de pH e de condutividade, a membrana Q liga-se especificamente ao ADN, enquanto o produto (e as proteínas da célula hospedeira) permanecem no fluxo de passagem. Em oposição à cromatografia em coluna de permuta iônica convencional, o ligando carregado está ligado a um suporte de membrana que facilita um alto rendimento e facilidade de utilização. O passo de captura compreende o método da invenção utilizando a resina multimodal. O passo de captura é seguido por uma separação num permutador catiônico, SP Sepharose FF™ (GE HealtCare) seguido por uma redução adicional de ADN para uma membrana Q. É realizado um tratamento de inactivação do vírus pelo método de detergente solvente (método S/D), como por exemplo, divulgado no documento EP-A-131740 e um outro passo de purificação em e. g., resina de afinidade VIII Select™. Um outro passo de concentração/polimento é realizado numa coluna de permutador aniónico, por exemplo, em Q Sepharose FF™ (GE HealtCare). O produto concentrado é posteriormente processado numa coluna de

filtração em gel (e. g., Superdex 200 p.g.TM (GE Healthcare)) para trocar de tampão e remover potenciais agregados e fragmentos. O produto resultante, eluato de GF, é recolhido. Os respectivos passos são explicados em maior detalhe nos Exemplos.

Os apêndices 2 e 3 apresentam uma forma alternativa de realização em que o passo de afinidade específica (VIIISelectTM (GE HealtCare)) como descrito no Apêndice 1, é substituído por uma cromatografia multimodal; Capto AdhereTM (GE HealtCare). Surpreendentemente, a sequência de purificação, como descrito no Apêndice 2, exerceu a mesma pureza que a sequência de purificação descrita no Apêndice 1 (incluindo o passo de afinidade baseado no anticorpo específico). Este resultado foi repetido com o mesmo material de partida, como descrito no Apêndice 3. Isto demonstra o amplo potencial de utilização da técnica de purificação multimodal mais do que uma vez (em ambos o passo de captura; Capto MMCTM (GE HealtCare) e num outro passo de purificação a jusante com Capto AdhereTM (GE HealtCare) como descrito no Apêndice 2 e 3) utilizando as condições de eluição específicas para FVIII, de acordo com a invenção.

A invenção é ainda descrita pelos seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

Em todos os exemplos, o valor de facto de M (Molar) é mol/Kg (i. e., é adicionado 10 grama de sal a 1000 gramas de água – não é 10 gramas de sal aos quais é adicionada água até 1000 mL)

Exemplo 1: Produção de FVIII contendo suspensão de células.

Células

A linha celular utilizada é um derivado da linha de células de rim embrionário humano 293 (HEK 293), que foi adaptada para uma cultura sem soro. Este hospedeiro, HEK 293F, foi transfectado de forma estável com uma cassette de expressão que transporta o gene para FVIII humano como domínio B eliminado sob o controlo de um promotor forte (EP-A-1 739 179).

Método de cultivo

As células foram cultivadas em meio sem soro em equipamento geral e de acordo com métodos gerais bem conhecidos na técnica, por exemplo, culturas com agitação ou com mistura em frascos em t, frascos com agitação e biorreactores (sistemas descartáveis e tanques com agitação convencional) operados como culturas em quimiostato descontínuo, descontínuo com alimentação, de perfusão ou contínuo (Freshney, R I (2000), *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4a ed, Wiley- Liss; Spier, R E ed (2000), *Encyclopedia of cell technology*, Wiley, Nova Iorque; Enfors, S-O e Häggström, L (2000), *Bioprocess technology: fundamentals and applications*, Högskoletryckeriet, Royal Institute of Technology, Stockholm; Vinci, V A e Parekh, S R (2003), *Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells*, Humana Press, EUA). Tipicamente, foi utilizada uma perfusão do meio para aumentar os números das células e os títulos do produto para além de níveis de cultura descontínua convencional. O rendimento do produto e a quantidade

de proteínas da célula hospedeira diferem dependendo do modo de cultivo:

- o título do produto irá aumentar tipicamente com os números das células
- o conteúdo da proteína total e o conteúdo de ADN irão aumentar tipicamente com os números das células
- o conteúdo da proteína total e o conteúdo de ADN também podem aumentar com a longevidade da cultura
- as culturas descontínuas acumulam proteína e ADN; nada é adicionado externamente, nada é removido
- processos de perfusão lavam as culturas celulares de metabolitos, proteína, ADN e outras impurezas; filtros de células ou centrífugas foram tipicamente utilizados para a retenção das células.

Uma vez que o produto recombinante está associado com as células, a suspensão celular é a colheita. As propriedades da colheita (títulos do produto e impurezas, como mencionado acima) diferem dependendo do modo de cultivo utilizado.

Exemplo 2: Produzir o material de partida FVIII sem células

O material de partida FVIII sem células para a purificação cromatográfica foi alcançado como se segue. Uma solução de armazenamento de cloreto de sódio e cloreto de cálcio foi adicionada à suspensão celular, produzida de acordo com o exemplo 1, para produzir concentrações finais de 0,3 M e 30 mM

respectivamente e uma condutividade de 30-40 mS/cm a 25 °C. A solução foi misturada durante cerca de 30 minutos, em que após as células serem removidas por centrifugação e seguido por um passo de filtração para remover quaisquer resíduos celulares que tenham permanecido (para inibir a aglomeração dos passos de coluna seguintes).

Exemplo 3: Condições de eluição para a resina catiónica multimodal Capto MMC

A seguinte série de experiências foi realizada para comparar diferentes condições de eluição na resina catiónica multimodal Capto MMC.

Exemplo 3a, avaliação da concentração salina diferente e pH para eluir FVIII da resina Capto MMC (exemplo de referência).

Coluna e Resina

A resina Capto MMC foi empacotada para uma altura de leito de 10 cm numa coluna C10/20 (1 volume de coluna (CV) = 8 mL). A resina Capto MMC foi obtida a de GE Healthcare (Cat. N° 17-5317).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2.

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% em p/p de Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido por carregamento do material de partida com uma taxa de fluxo de 5 mL/min. O FVIII ligado à resina durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição, como descrito na Tabela 1 e a quantidade resultante de FVIII a sair da coluna foi analisada com um método FVIII:C e calculada numa % em relação à quantidade aplicada de FVIII.

Tabela 1

| Condições de eluição | Volume eluído (CV) | FVIII:C encontrado no eluato, (%) |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 0,1 M de NaCl, pH 6,5* | 10 | 0 |
| 0,3 M de NaCl, pH 7,0* | 90 | 0 |
| 1 M de NaCl. pH 6,5** | 20 | 0 |
| 2 M de NaCl, pH 6,5** (OgHO7-626) | 15 | 0 |

*Os tampões de eluição incluíram 0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂ e 0,02% p/p de Polissorbato 80

**O tampão de eluição incluiu 0,05 M de L-Histidina, 0,05 M de CaCl₂ e 0,02% em p/p de Polissorbato 80

Exemplo de Referência de Conclusão 3a

Como pode ser observado na tabela 1, a ligação de FVIII à coluna Capto MMC, não é uma interacção iónica.

Exemplo de Referência 3b, avaliar as condições de eluição para Capto MMC, concentração diferente de NaCl com 50% de etilenoglicol constante.

Coluna e Resina

A resina Capto MMC foi empacotada num leito de 2 cm de altura numa coluna XK16/20 (1 volume de coluna (CV) = 4 mL). A resina Capto MMC foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-5317).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtidos como descritos no exemplo 2.

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido do carregamento do material de partida com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. O FVIII ligado à resina durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição, como descrito na Tabela 2 e a quantidade resultante de FVIII que saiu da coluna foi analisada com um método de FVIII:C e calculado em % em relação com a quantidade aplicada de FVIII.

Tabela 2

| Condições de eluição* | Volume eluído (CV) | FVIII:C encontrado no eluato, (%) |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| 0,5 M de NaCl + 50% de etilenoglicol, pH 6,5 | 3 | 23 |
| 1 M de NaCl + 50% de Etilenoglicol pH 6,5 | 6 | 52 |
| 1,5 M de NaCl + 50% de Etilenoglicol pH 7,5 | 4 | 73 |
| 1,5 M de NaCl + 50% de Etilenoglicol pH 6,5 | 2 | 82 |
| 2,5 M de NaCl + 50% de Etilenoglicol pH 6,5 | 3 | 84 |

*Todos os tampões de eluição incluíram 0,02 M de L-Histidina, 0,02 M de CaCl₂ e 0,02% p/p de Polissorbato 80

Exemplo de Referência de Conclusão 3b

Como pode ser observado na tabela 2, a ligação de FVIII à coluna Capto MMC pode ser inibida por uma combinação de

etilenoglicol e NaCl. É normalmente utilizado 50% de etilenoglicol como tampão de eluição para resinas de afinidade à base de proteína convencionais. A eluição de FVIII é melhorada se o etilenoglicol for combinado com um aumento da concentração de cloreto de sódio até 1,5 M. Os dois pH diferentes testados (pH 6,5 e 7,5) não alteram a recuperação de FVIII, indicando que o pH não pode ser utilizado como um parâmetro de eluição para FVIII, dentro dos limites de estabilidade para a proteína (aproximadamente 6-8). Um aumento da concentração de NaCl para 2,5 M não melhorou a recuperação de FVIII:C no eluato.

Exemplo 3c variação da arginina como um componente de eluição para Capto MMC

Coluna e Resina

A resina Capto MMC foi empacotada num leito de 8 cm de altura numa coluna Tricorn 5/100 (1 volume de coluna (CV) = 1,6 mL). A resina Capto MMC foi obtida em GE Healthcare (Cat. N° 17-5317-10).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2.

Tampão de equilíbrio

0,01 M L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% (p/p) Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido pelo carregamento do material de partida com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. O FVIII é ligado à resina durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição sequencial (aproximadamente 10 volumes de coluna (CV) cada) como descrito na Tabela 3 e a quantidade resultante de FVIII que eluiu da coluna foi analisada com o método FVIII: C e calculada em % em relação à quantidade de FVIII aplicada.

Tabela 3

| Condições de eluição* | FVIII encontrado no Eluato, (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 20% Etilenoglicol | 0 |
| 0,1 M arginina + 20% Etilenoglicol | 0 |
| 0,2 M arginina + 20% Etilenoglicol | 0 |
| 0,3 M arginina + 20% Etilenoglicol | 0 |
| 0,4 M arginina + 20% Etilenoglicol | 1 |
| 0,5 M arginina + 20% Etilenoglicol | 10 |
| 0,6 M arginina + 20% Etilenoglicol | 37 |
| 0,7 M arginina + 20% Etilenoglicol | 32 |
| 0,8 M arginina + 20% Etilenoglicol | 8 |
| 0,9 M arginina + 20% Etilenoglicol | 1 |

(continuação)

| Condições de eluição* | FVIII encontrado no Eluato, (%) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 1,0 M arginina + 20% Etilenoglicol | 0 |

*Todos os tampões de eluição incluíram 0,01 M de L-Histidina, 0,3 M de NaCl, 0,01 M de CaCl₂ e 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH 6,5

Exemplo de Conclusão 3c (de acordo com a invenção)

Como pode ser observado na tabela 3, a ligação de FVIII à coluna Capto MMC pode ser inibida, surpreendentemente, por uma combinação de etilenoglicol e arginina. A eluição de FVIII é observada nos eluatos que contêm até 0,9 M de arginina juntamente com 20% (p/p) de etilenoglicol.

Exemplo 3d (de acordo com a invenção), comparação de arginina e lisina como um componente de eluição para a coluna e resina Capto MMC

Coluna e resina

A resina Capto MMC foi empacotada num leito de 4-8 cm de altura numa coluna Tricorn 50/100 ou C10/20 (1 volume de coluna (CV) = 1,6-3 mL). A resina Capto MMC foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-5317).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2.

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido pelo carregamento do material de partida com uma taxa de fluxo que representa um tempo de contacto de 1-2 minutos. O FVIII ligou-se à resina durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição como descrito na Tabela 4 e a quantidade de FVIII resultante que saiu da coluna foi analisada com o método FVIII:C e calculada em % em relação à quantidade aplicada de FVIII.

Tabela 4

| Condições de eluição* | Volume eluído, (CV) | FVIII encontrado no Eluato, (%) |
|---|---------------------|---------------------------------|
| 0,5 M de Lisina + 20% de Etilenoglicol | 40 | 3 |
| 0,65 M de Lisina + 20% de Etilenoglicol | 40 | 16 |

(continuação)

| Condições de eluição* | Volume eluído, (CV) | FVIII encontrado no Eluato, (%) |
|---|---------------------|---------------------------------|
| 0,75 M de Lisina + 20% de Etilenoglicol | 40 | 13 |
| 0,4 M de Arginina + 20% de Etilenoglicol | 20 | 4 |
| 0,75 M de Arginina + 20% de Etilenoglicol | 20 | 89 |

*Todos os tampões de eluição incluíram 0,01 M de L-Histidina, 0,3M de NaCl, 0,01 M de CaCl₂ e 0,02% (p/p) de Polissorbato 80 pH 6,5

Exemplo de Conclusão 3d (de acordo com a invenção)

Como pode ser observado na tabela 4, a ligação de FVIII à coluna Capto MMC foi estudada com 20% de etilenoglicol em combinação com lisina e arginina de diferentes concentrações. A arginina elui FVIII melhor do que a lisina, uma concentração de 0,75 M parece produzir uma recuperação de aproximadamente 90%. Parece ser possível utilizar quantidades inferiores de qualquer um dos aminoácidos em combinação com etilenoglicol, como um passo de lavagem para remover impurezas da molécula de FVIII, antes de eluir FVIII com, por exemplo, 0,75 M de arginina.

Exemplo 3e, avaliação da pureza e da recuperação utilizando diferentes condições de lavagem e de eluição para a resina Capto MMC.

Coluna e Resina

A resina Capto MMC foi empacotada em diferentes tamanhos de coluna (altura do leito 2-9 cm, volume 1,6 - 48 mL). A resina Capto MMC foi obtida de GE Healthcare (Cat. Nº 17-5317).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram soluções de proteína contendo rFVIII, obtidas como descrito no exemplo 2, com uma pureza típica de app. 100 IU FVIII/mg de proteína (como pode ser observado no exemplo 9, tabela 18).

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido por carregamento do material de partida com taxas de fluxo apropriadas (dependendo do tamanho da coluna, aproximadamente 13-300 cm/h). O FVIII liga-se à resina durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a diferentes

condições de lavagem e de eluição, como descrito na Tabela 5 e a quantidade de FVIII resultante que saiu da coluna foi analisada com o método FVIII:C e calculada em % em relação à quantidade aplicada de FVIII.

Tabela 5

| Tampão de lavagem | tampão de eluição | Recuperação de FVIII, (%) | Pureza** eluato, (IU/mg) |
|--|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 20% etilenoglicol + 0,4 M arginina, 40 CV | 0,8M Arginina + 20% etilenoglicol | 83 | 5741 |
| 20% etilenoglicol + 0,45 M arginina, 20 CV | 0,8 M Arginina | 69 | na |

*Todos os tampões incluem 0,01 M L-Histidina, 0,3 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ e 0,02% (p/p) Polissorbato 80, pH 6,5 ** Medido com Bradford

Exemplo de Conclusão 3e

Como pode ser observado na tabela 5, a combinação de 20% de etilenoglicol e 0,4 M de arginina num passo de lavagem antes de aplicar uma concentração elevada de arginina no tampão de eluição produz um rendimento elevado e produto puro, a concentração de arginina no tampão de lavagem não deve exceder 0,4 M devido à recuperação relativamente baixa de FVIII resultante.

Exemplo de conclusão 3

Torna-se claro que a resina catiónica multimodal (Capto MMC) não pode ser eluída utilizando condições de eluição de permutação iónica (sal elevado) ou resinas de interacção hidrofóbica (sal baixo) convencionais. Uma quantidade aumentada

de aminoácido carregado isoladamente ou em combinação com etilenoglicol pode libertar, surpreendentemente, a molécula de FVIII ligada da resina Capto MMC. Adicionalmente, as concentrações de NaCl, arginina, lisina e etilenoglicol podem variar durante a lavagem e a eluição da resina, para optimizar a recuperação e a pureza do eluato de Capto MMC.

Exemplo 4: Condições de eluição para a resina aniónica multimodal Capto Adhere (comparativas)

A seguinte série de experiências foi realizada para avaliar diferentes condições de eluição na resina aniónica multimodal Capto Adhere.

Coluna e Resina

A resina Capto Adhere foi empacotada num leito de 13,5 cm de altura numa coluna a C10/20. A resina Capto Adhere foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-5444).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 6C.

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 30 ± 3 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido pelo carregamento do material de partida. A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição como descrito na Tabela 6 e a quantidade de FVIII resultante que saiu da coluna foi analisada.

Tabela 6

| Amostra | Volume, mL | FVIII, IU/mL | FVIII Total, IU | FVIII Total, (%) |
|---|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Material de partida (carregamento) | 184 | 140 | 25760 | 100 |
| A (Tampão de equilíbrio) | 159 | 0,0 | 0 | 0 |
| B (Sal elevado) | 212 | 0,0 | 0 | 0 |
| C (Sal baixo) | 53 | 0,0 | 0 | 0 |
| D (Aminoácido baixo + Etilenoglicol baixo) | 212 | 3.5 | 935 | 4 |
| E (Aminoácido) | 32 | 701 | 22432 | 87 |

Condição de Eluição A

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 30 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condição de eluição B (Sal elevado)

0,05 M de L-Histidina, 0,05 M de CaCl₂, 2,0 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 140 ± 5 mS/cm a 25 °C.

Condição de eluição C (sal baixo)

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6.5, condutividade 13 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condição de eluição D (aminoácido baixo + etilenoglicol baixo)

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,3 M de Cloridrato de Arginina, 20% p/p de etilenoglicol, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6.5, condutividade 28 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Condição de eluição E (Aminoácido)

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,8 M de cloridrato de Arginina, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 53 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Exemplo de Conclusão 4

Torna-se claro que a resina aniónica multimodal (Capto Adhere) não pode ser eluída utilizando condições de eluição de permutador iónico convencional (sal elevado) ou resinas de interacção hidrofóbica (sal baixo). Uma quantidade aumentada de um aminoácido carregado isoladamente ou em combinação com etilenoglicol pode libertar, surpreendentemente, a molécula de FVIII ligada,

Exemplo 5, Comparação de um passo de permuta catiónica convencional (SP Sepharose FF) com uma resina catiónica multimodal (Capto MMC) como um passo de purificação (passo de captura)

Coluna e Resina

A resina Capto MMC foi empacotada com um leito de 11 cm de altura numa coluna C10/20 (1 volume de coluna (CV) = 8,5 mL). A resina Capto MMC foi obtida a partir de GE Healthcare (Cat. N° 17-5317).

A resina SP Sepharose FF foi empacotada num leito de 18 cm de altura numa coluna XK26/20 (1 volume de coluna (CV) = 100 mL). A resina SP Sepharose FF foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-0729).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2 (foi utilizado material de partida idêntico para ambas as experiências). Para a resina de SP Sepharose FF, o material de partida foi diluído com tampão de diluição para uma condutividade de 12 mS antes da aplicação à resina, para o FVIII ser capaz de se ligar.

Tampão de diluição SP

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,07 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5

Tampão de equilíbrio MMC

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,3 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 7,0, condutividade 31 ± 3 mS/cm a 25 °C.

Tampão de equilíbrio SP

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

As colunas foram equilibradas com tampão de equilíbrio seguido por carregamento do material de partida a uma taxa de fluxo de 5 mL/min, respectivamente, 40 mL/min. O FVIII ligou-se às resinas durante estas condições de tampão (não foi possível detectar FVIII no fluxo de passagem). A resina foi posteriormente sujeita a condições de lavagem e de eluição diferente, o princípio descrito no exemplo 3d (lavagem 0,75 M de lisina + 20% de etilenoglicol) e no exemplo 3b (eluição a 1,5 M de NaCl + 50% de etilenoglicol) para o passo de Capto MMC e no exemplo 6b para o passo de SP Sepharose FF (lavagem com 0,15 M de NaCl e eluição com 0,36 M de NaCl). Na Tabela 7 podem ser estudadas as diferenças entre os dois passos de purificação.

Tabela 7

| Resina de captura | Condutividade no material de carregamento mS/cm a 25°C | Volume do material de carregamento, mL | FVIII Total aplicado, IU | FVIII /mL Resina de captura | Recuperação de FVIII *, % | Pureza **, IU/mg | DNA/ FVIII, ng/IU |
|----------------------|--|--|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|
| Capto MMC OgH07-648 | 35 | 1235 | 29022 | 3400 | 68% | 2414 | 2,3 |
| SP-Seph FF OgH07-647 | 12 | 5759 | 20147 | 202 | 59% | 596 | 22.1 |

* Calculado a partir de material de partida não diluído** Medido com Bradford

Exemplo de Conclusão 5 (comparativo)

O resultado da tabela 7 demonstra que a utilização do passo Capto MMC como um passo de captura/purificação para FVIII exerce várias vantagens incluindo:

- Melhor recuperação de FVIII
- Pureza mais elevada em relação às proteínas da célula hospedeira
- Pureza mais elevada em relação ao ADN
- Capacidade de ligação superior de FVIII/mL de resina
- Tempo de processo mais curto devido a menor diluição (a resina MMC pode ser processada com uma condutividade mais elevada)

Exemplo 6, componentes específicos de eluição (Ca) e de lavagem para FVIII e sua purificação numa resina de permuta catiónica (SP Sepharose FF) (comparativa).

A seguinte série de experiências foi realizada para avaliar diferentes condições de eluição na resina de SP Sepharose FF.

Exemplo 6a, Cloreto de sódio e arginina como componente específico de eluição e de lavagem utilizado numa resina de permuta catiónica (SP Sepharose FF).

Coluna e Resina

A resina de SP Sepharose FF foi empacotada num leito de 15 cm de altura numa coluna XK16. A resina SP Sepharose FF foi obtida a partir de GE Healthcare (Cat. N° 17-0729).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2 e ainda processado numa resina Capto MMC, como descrito no exemplo 9. O eluato da coluna Capto MMC foi diluído 12x com um tampão de diluição para baixar a condutividade até aproximadamente 12 mS/cm, que permite a ligação da proteína alvo à resina SP Sepharose FF.

Tampão de diluição

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,07 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido por carregamento do material de partida. A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição como descrito na Tabela 8 e a quantidade de FVIII resultante que saía da coluna foi analisada.

Tabela 8

| Amostra | Volume mL | FVIII IU/ml | Total FVIII, IU | Total % | Actividade específica** IU/mg |
|---------------------------------------|--------------|----------------|--------------------|------------|-------------------------------------|
| Material de partida (carregamento) | 2830 | 5 | 14150 | 100 | 178 |
| Tampão de equilíbrio. Lavagem | 300 | 0,0 | 0 | 0 | na |
| Lavagem A | 600 | 0,0 | 0 | 0 | na |
| eluição | 90 | 153 | 13770 | 97 | 362 |

na- Não analisado ** Medido com Bradford

Lavagem A

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,15 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 16,5 ± 18,0 mS/cm a 25 °C.

Tampão de eluição

0,01 M de L-Histidina, 0,035 M de CaCl₂, 0,34 M de NaCl, 0,2 M de D-sorbitol, 0,045 M de cloridrato de arginina, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 36 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Exemplo de conclusão 6a (comparativo)

O FVIII ligado foi eluído eficazmente da coluna de SP Sepharose FF quando um tampão de eluição com foi utilizada uma condutividade de 36mS/cm. Esta condutividade foi um efeito da concentração de NaCl e parcialmente das concentrações de CaCl₂ e arginina. O sorbitol e a arginina foram incluídos no tampão para estabilizar a molécula de FVIII durante o processamento, congelação e descongelação.

Exemplo 6b, cloreto de sódio como um componente específico de eluição e lavagem utilizado como uma resina de permuta cationica (SP Sepharose FF).

Coluna e Resina

A resina de SP Sepharose FF foi empacotada num leito de 15 cm de altura numa coluna C10/20. A resina de SP Sepharose FF foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-0729).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtida como descrito no exemplo 2 e no exemplo 9. O eluato da coluna Capto MMC foi diluída 12x com um tampão de diluição para baixar a condutividade, que permite a ligação da proteína alvo à resina SP Sepharose FF.

Tampão de diluição

0,01 M de Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,01 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5

Tampão de equilíbrio

0,01 M de Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido pelo carregamento do material de partida. A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição como descrito na Tabela 9 e a quantidade de FVIII resultante que saiu da coluna foi analisada.

Tabela 9

| Amostra | Volume mL | FVIII IU/mL | Total FVIII, IU | Total FVIII, % | Actividade específica** IU/mg |
|---------------------------------------|--------------|----------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Material de partida (carregamento) | 540 | 12,8 | 6912 | 100 | 799 |
| Tampão de equilíbrio de lavagem | 120 | 0,0 | 0 | 0 | na |
| Lavagem B | 490 | 0,0 | 0 | 0 | na |
| Eluição | 27 | 221 | 5967 | 86 | 948 |

** Medido com Bradford

Lavagem B

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,15 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 16,5 - 18,0 mS/cm a 25 °C.

Tampão de eluição

0,01 M de L-Histidina, 0,035 M de CaCl₂, 0,36 M de NaCl, 0,2 M de D-Sorbitol, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 36 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Exemplo de conclusão 6b

Foi utilizado um tampão de eluição com uma condutividade de 36mS/cm. Comparado com aquele utilizado na experiência 5a a arginina foi excluída e a condutividade foi ajustada para 36mS/cm através da adição de uma concentração de NaCl ligeiramente superior. A percentagem de FVIII eluída foi

ligeiramente inferior à da experiência 5a indicando que a arginina possui uma função positiva durante o processo.

Exemplo 6c, Cloreto de cálcio como um componente específico de eluição e lavagem utilizado numa resina de permuta catiônica.

Coluna e resina

A resina SP Sepharose FF foi empacotada num leito de 15,5 cm de altura numa coluna XK26. A resina SP Sepharose FF foi obtida de GE Healthcare (Cat. Nº 17-0729).

Material de partida

Os materiais de partida utilizados foram uma solução de proteína contendo rFVIII, obtidas como descrito no exemplo 2 e no exemplo 9. O eluato da coluna Capto MMC foi diluído 12x com um tampão de diluição para baixar a condutividade, que permite a ligação da proteína alvo à resina SP Sepharose FF.

Tampão de diluição

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,05 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5

Tampão de equilíbrio

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio seguido pelo carregamento do material inicial. A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de eluição como descrito na Tabela 10 e a quantidade de FVIII resultante que saiu da coluna foi analisada.

Tabela 10

| Amostra | Volume mL | FVIII IU/mL | FVIII Total, IU | FVIII Total, % | Actividade específica** IU/mg |
|------------------------------------|-----------|-------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| Material de partida (carregamento) | 2000 | 31,7 | 63400 | 10 | 578 |
| Tampão de equilíbrio e lavagem | 830 | 0.0 | 0 | 0 | na |
| Lavagem B | 3320 | 0,0 | 0 | 0 | na |
| lavagem C (Sorbitol) | 249 | 0 | 0 | 0 | na |
| Eluição (Cloreto de cálcio) | 410 | 149 | 61090 | 96 | 2811 |

** Medido com Bradford

Lavagem B

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,15 M de NaCl, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 16,5-18,0 mS/cm a 25 °C.

Lavagem C (Sorbitol)

0,01 M de L-Histidina, 0,01 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,2 M de D-Sorbitol, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 12 ± 2 mS/cm a 25 °C.

Tampão de eluição (Cloreto de cálcio)

0,02 M de L-Histidina, 0,2 M de CaCl₂, 0,1 M de NaCl, 0,2 M de D-sorbitol, 0,02% p/p de Polissorbato 80, pH 6,5, condutividade 18,7 (18,0-19,0) mS/cm a 25 °C.

Exemplo de conclusão 6c (6a, 6b)

Nesta experiência (6c) a concentração de NaCl foi diminuída e foi utilizada uma concentração mais elevada de CaCl₂, no tampão de eluição. Esta alteração resultou numa condutividade de 18,7 mS/cm. A capacidade de eluição do FVIII da SP Sepharose FF era igualmente boa como na experiência 5a na qual a condutividade no tampão de eluição foi de 36 mS/cm. Foi uma verificação inesperada que a recuperação de FVIII foi igual ou melhor com um tampão de eluição com quase metade da condutividade. Na cromatografia de permuta iônica, normalmente, a eluição das proteínas está fortemente dependente da condutividade (força iônica) ou/e o pH. Neste exemplo parece que o ião Ca²⁺ exerce efeitos específicos, para além de apenas a força iônica, na molécula de FVIII. Isto também é verificado pela pureza, que é superior (2811 comparado com 362 e 948

respectivamente em 6a e 6b) quando se utiliza a eluição baseada em Ca com baixa condutividade.

Exemplo 7, Purificação com um ligando de afinidade para FVIII derivado de levedura.

A seguinte experiência foi realizada para avaliar as condições de eluição na resina de afinidade VIIISelect.

Coluna e resina

Uma coluna C10/20 foi empacotada com a resina VIIISelect num leito de sete cm de altura. A resina VIIISelect foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-5450).

Material de partida

O material de partida utilizado foi um eluato de SP Sepharose contendo rFVIII, obtido como o princípio descrito no exemplo 6b para o passo SP Sepharose FF (lavagem 0,15 M NaCl e eluição 0,36 M de NaCl).

Composições do tampão:

Tampão A (Tampão de equilíbrio com químicos S/D adicionados)

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

Lavagem B (Tampão de equilíbrio sem químicos S/D)

0,3 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl₂, 0,02 mol/kg de L-Histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH: 6,5 ± 0,1, Condutividade: 31 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Lavagem C (Tampão de Lavagem com Concentração Salina Elevada)

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

Tampão D (Tampão de eluição)

1,5 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl₂, 0,02 mol/kg de L-Histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, 50% (p/p) de etilenoglicol (EG), pH: 6,5 ± 0,1, Condutividade: 39 ± 3 mS/cm a +25 °C.

Os tampões de equilíbrio, lavagem e eluição não estão limitados aos referidos pH, concentrações e tipo de tampão, sais ou detergente.

A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio A seguido pelo carregamento do material de partida. A resina foi posteriormente sujeita a diferentes condições de lavagem e de eluição como descrito na Tabela 11 e a quantidade de FVIII resultante de saída da coluna foi analisada.

Tabela 11. Resultados da experiência com VIIISelect

| Amostra | Volume (mL) | FVIII (IU/mL) | Total (IU) | Total (%) | Actividade Específica (IU/mg proteína) | Teor de ADN (pg/1000 IU) |
|------------------------------------|-------------|---------------|------------|-----------|--|--------------------------|
| Material de partida (carregamento) | 45 | 483 | 21735 | 100 | 1959* | 1681 |
| Lavagem B, | 127,5 | 0,1 | 13 | 0 | - | - |
| Lavagem C | 55 | 0 | 0 | 0 | - | - |
| Eluição | 27,5 | 642 | 17655 | 81 | 8758* | 1399 |

* Medido com Bradford

Figura 1. SDS-PAGE corado com prata apresentando o perfil de pureza para o material de partida (Pista 1) e eluato de VIIISelect (Pista 2) após o passo de cromatografia de afinidade.

Exemplo de Conclusão 7

O passo de VIIISelect é um passo poderoso de purificação que produz um eluato puro.

Exemplo 8, Comparação de a sequência de purificação com resina de afinidade VIIISelect ou uma resina multimodal (Capto Adhere) em vez daquela (Apêndice 3).

Os dois esquemas de purificação diferentes foram realizados em pequena escala de acordo com o exemplo 7 (VIIISelect) e o exemplo 10 (Capto Adhere)

Tabela 12, Comparação da recuperação e da pureza de FVIII através da utilização do passo de purificação com FVIIISelect ou Capto Adhere

| Esquema VIIISelect | Actividade específica (IU/mg proteína total) | Recuperaçã o de FVIII, IU (%) | Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | Esquema Capto Adhere | Actividad e específic a (IU/mg proteína total) | Recuperaç ão de FVIII, IU (%) | Teor de ADN (pg/ 1000 IU) |
|--|--|--|---------------------------------------|--|---|--|---------------------------------|
| Material de partida (Spfiltrate) | 1588* | 100 | 1442 | Material de partida (Sp- filtrate) | 1588* | 100 | 1442 |
| Eluato de VIIISelect | 8759* | 81 | 1399 | Eluato de Adhere | 5112* | 86 | 504 |
| Q-eluato de VIIISelect | na | 106 | 840 | Eluato de Q (Adhere) | na | 105 | 82 |
| Eluato de GF VIIISelect | 10322** | 88 | 214 | Eluato de GF-Adhere) | 10679** | 103 | 181 |

n.a. = Não analisado

* Medido com Bradford

** Medido com análise de aminoácidos

A Figura 2 apresenta uma SDS PAGE com coloração com prata das amostras descritas na Tabela 12; Comparação do esquema de purificação com VIIISelect e do esquema de purificação com Capto Adhere.

A Pista 1 apresenta a pureza do material de partida (filtrado de SP) antes da coluna VIIISelect carregada a uma concentração de FVIII de 483 IU/mL.

A Pista 2 apresenta a pureza do eluato de VIIISelect carregado a uma concentração de FVIII de 500 IU/mL.

A Pista 3 apresenta a pureza após a sequência de purificação SP-VIIISelect-Q Seph, carregado a uma concentração de FVIII de 500 IU/mL.

A Pista 4 apresenta a pureza após a sequência de purificação SP-VIIISelect-Q Seph-filtração em gel, carregado a uma concentração de FVIII de 385 IU/mL.

A Pista 5 apresenta a pureza do material de partida (filtrado de SP) antes da coluna Capto Adhere carregada a uma concentração de FVIII de 493 IU/mL.

A Pista 6 apresenta a pureza do eluato de Capto adhere carregado a uma concentração e FVIII de 500 IU/mL.

A Pista 7 apresenta a pureza após a sequência de purificação SP-Capto Adhere-Q Seph, carregada a uma concentração de FVIII de 500 IU/mL.

A Pista 8 apresenta a pureza após a sequência de purificação SP-Capto Adhere-Q Seph filtração em gel, carregada a uma concentração e FVIII de 493 IU/mL.

A Pista 9 apresenta um marcador molecular

Exemplo de Conclusão 8

A mesma pureza pode ser alcançada quer através da utilização do passo de afinidade VIIISelect ou do passo de cromatografia Capto Adhere, se a pureza for comparada no produto final (eluato de GF). A pureza após o passo de VIIISelect é superior em comparação com a situação após o passo de Capto Adhere, mas após os restantes passos de purificação (Q e GF) não pode ser observada diferença na pureza com os métodos analíticos utilizados. A recuperação utilizando o passo Capto Adhere é ligeiramente superior em comparação com a sequência utilizando VIIISelect.

Exemplo 9: Sequência de purificação à escala industrial, incluindo a resina de afinidade VIIISelect. Para estudar a reprodutibilidade da recuperação e da pureza, os Passos de purificação 1-9 descritos abaixo, foram realizados em 3-4 sistemas descontínuos à escala piloto. Cada sistema descontínuo originou desde 40-100 L de suspensão de células como descrito no exemplo 1-2.

PASSO 1 Passo de redução de ADN N° 1 (Cromatografia Aniónica)

A redução primária de ADN é realizada com a filtração através de uma membrana Q (Sartobind Q, Sartorius). A membrana Q é equilibrada com tampão antes da filtração (Tabela 13).

Tabela 13 tampão utilizado para a membrana Q

| | | |
|--------------------------------|-------------------------|---|
| Membrana Q / Redução de ADN | Tampão de equilíbrio | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80, pH 7 |
|--------------------------------|-------------------------|---|

O filtrado celular (do exemplo 2) é processado através da membrana Q-membrane e o fluxo de passagem que contém o produto é recolhido. A membrana é lavada com tampão de equilíbrio para recuperar qualquer FVIII que permaneça na membrana.

PASSO 2 Passo de captura (Cromatografia Multimodal, Capto MMC)

A purificação e concentração primária do produto (captura) é realizada a 500-10000 IU de FVIII/mL de cromatografia de permuta catiónica multimodal (Capto MMC) em gel. O gel é, antes da aplicação do produto, equilibrado com tampão de equilíbrio Capto MMC. O filtrado do passo 1 é carregado na coluna Capto MMC que, posteriormente, é lavada com tampão de equilíbrio Capto MMC e depois lavada sequencialmente com tampão de lavagem 1-3 seguido por eluição do FVIII, como descrito na Tabela 14.

Tabela 14

| | | |
|---|----------------------|---|
| Cromatografia Multimodal /Capto MMC | Tampão de equilíbrio | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 7 |
| | Tampão de Lavagem 1 | 1 mol/kg de NaCl, 0,05 mol/kg de CaCl ₂ , 0,05 mol/kg de L-histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH 6,5 |
| | Tampão de Lavagem 2 | 0,1 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH 6,5, |
| | Tampão de Lavagem 3 | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,4 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 10% (p/p) de etilenoglicol, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |
| | Tampão de Eluição | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02 mol/kg de L-histidina, 0,8 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 10% (p/p) de etilenoglicol, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |

PASSO 3 Cromatografia de Permuta Catiónica, SP Sepharose FF

A solução que contém FVIII (eluato de Capto MMC) do passo 2 é ainda purificada utilizando um gel de SP-Sepharose FF (GE Healthcare Cat. N° 17-0729). Antes da aplicação do produto, a coluna é equilibrada com tampão de equilíbrio de SP-Sepharose e a solução de proteína é diluída para corresponder à força iónica e ao pH do tampão de equilíbrio, para ser capaz de ligar o FVIII ao gel. A solução de proteína diluída é aplicada à coluna de SP Sepharose, que posteriormente é lavada com tampão de equilíbrio e posteriormente lavada com tampão de lavagem seguido pela eluição de FVIII, como descrito na Tabela 15.

Tabela 15 Tampões utilizados para Cromatografia de Permuta Catiónica

| | | |
|--|----------------------|---|
| Cromatografia de Permuta Catiónica (SP Sepharose FF) | Tampão de Equilíbrio | 0,1 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg, de L-histidina, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |
| | Tampão de Lavagem | 0,15 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg, de L-histidina, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |
| | Tampão de Eluição | 0,34 mol/kg de NaCl, 0,035 mol/kg de CaCl ₂ , 0,045 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 0,2 mol/kg de Sorbitol, 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |

PASSO 4 Passo de redução de ADN N°.2 (Cromatografia Aniónica)

A redução secundária de ADN é realizada com filtração através de uma membrana Q (Sartobind Q, Sartorius). A membrana Q é equilibrada com tampão antes da filtração (Tabela 16).

Tabela 16 Tampão utilizado para a membrana Q-Membrane

| | | |
|----------------------------|----------------------|---|
| Membrana Q /Redução de ADN | Tampão de equilíbrio | 0,34 mol/kg de NaCl, 0,035 mol/kg de CaCl ₂ , 0,045 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 0,2 mol/kg de Sorbitol, 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |
|----------------------------|----------------------|---|

O eluato de SP do passo 3 é filtrado através da membrana Q, o fluxo de passagem contendo o produto é recolhido para processamento posterior. A membrana é lavada com tampão de equilíbrio para recuperar qualquer FVIII que permaneça na membrana.

PASSO 5 Inactivação de Vírus (Tratamento com Solvente/Detergente (S/D))

O filtrado do passo 4 é sujeito a inactivação para o vírus através de tratamento com S/D (Solvente/Detergente) com Triton X-100 a 1% e 0,3% de Tri-(N-Butil)-Fosfato (TNBP). A inactivação dos vírus é realizada sob agitação à temperatura ambiente durante aproximadamente 1h.

PASSO 6 Purificação com uma resina de cromatografia de afinidade derivada de levedura.

A solução de FVIII inactivada para vírus do passo 5 é processada através de uma coluna de afinidade VIIISelect de acordo com a descrição no exemplo 7. São carregadas aproximadamente 5-20000 IU por mL de resina.

PASSO 7 Nanofiltração

O eluato de VIIISelect do passo 6 é nanofiltrado para a remoção de potenciais agente adventícios, tais como vírus sem envelope, utilizando um nanofiltro Planova 20N (Asahi Kasei Medical). O fluxo de passagem que contém o produto é recolhido.

PASSO 8 Passo de cromatografia de permuta aniónica (Q-Sepharose FF)

A resina Q Sepharose FF foi obtida de GE Healthcare (Cat. N° 17-0510). O material de partida utilizado é um nanofiltrado

obtido do passo 7, em que o sal e o pH foram ajustados para serem comparáveis ao tampão de equilíbrio na Tabela 17. A solução de proteína diluída é aplicada à coluna de Q Sepharose FF com uma carga de 5000 - 25000 IU/mL gel, que posteriormente é lavada com tampão de equilíbrio e posteriormente lavada com tampão de lavagem seguido pela eluição de FVIII, como descrito na Tabela 17.

Tabela 17 Tampão utilizado para o passo de permuta aniónica (Q-Sepharose FF)

| | | |
|------------------------------------|----------------------|---|
| Permutador aniónico/Q-Sepharose FF | Tampão de Equilíbrio | 0,1 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80, pH 7,5 |
| | Tampão de Lavagem | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 pH 7,5 |
| | Tampão de Eluição | 0,4 mol/kg de NaCl, 0,02 mol/kg de CaCl ₂ , 0,02 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 pH 6,0 |

PASSO 9 Passo de cromatografia de filtração em gel

Uma resina de filtração em gel (Superdex 200 pg, GE Healthcare Cat. N° 17-1043) foi empacotada num leito de 60-75 cm de altura. O material de partida utilizado é o eluato de Q obtido do passo 8. A coluna é equilibrada com uma composição fisiologicamente aceitável que protege o produto de absorção à superfície e estabiliza-o durante a congelação, armazenamento, liofilização, etc. O eluato de Q é aplicado à coluna de filtração em gel com um volume de 2-8% do volume total

da coluna. O eluato que continha FVIII formulado, sem fragmento nem agregados, é recolhido após a coluna (eluato de GF).

Tabela 18, Sumário dos resultados dos passos de purificação descritos nos passos 1-4, de quatro sistemas descontínuos de purificação à escala piloto (com origem em aproximadamente 50 L (BPP077-078) e 100 L (BPP080-081) de material de suspensão celular (descrito no exemplo 1).

| | BPP077 | BPP078 | BPP080 | BPP081 |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|---------|
| <u>Material de partida (descrito no exemplo 2)</u> | | | | |
| Peso (kg) | 81 | 72 | 162 | 160 |
| FVIII Total (IU) | 2327570 | 1699200 | 4032180 | 3870400 |
| Rendimento de FVIII (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Actividade específica * (IU/mg) | 83 | 67 | 107 | 107 |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | $1,4 \times 10^8$ | $5,93 \times 10^9$ | $5,3 \times 10^9$ | - |
| <u>Eluato de MMC (passo 2)</u> | | | | |
| Peso (kg) | 3,5 | 4,4 | 10,9 | 9,6 |
| FVIII Total (IU) | 412654 | 1023103 | 3844487 | 3428212 |
| Rendimento de FVIII (%) | 24 | 70 | 104 | 96 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 846 | 512 | 578 | 646 |
| DNA content (pg/ 1000 IU) | $1,8 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | $4,6 \times 10^6$ | - |
| <u>Filtrado de SP (passo 4)</u> | | | | |
| Peso (kg) | 3,1 | 3,3 | 5,0 | 4,6 |
| Total (IU) | 1524582 | 1025994 | 3430796 | 3000515 |
| FVIII (%) | 112 | 116 | 119 | 108 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 1588 | 793 | 1362 | 1277 |
| <u>Filtrado de SP (passo 4)</u> | | | | |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | <206 | 4463 | 1313 | - |

* Medido com Bradford

As recolhas de captura dos sistemas descontínuos BPP077 e BPP078 foram misturadas para purificação a jusante do sistema descontínuo BPP079, enquanto o sistema descontínuo BPP080 foi designado BPP083 e BPP081 foi designado BPP084.

Tabela 19, Sumário dos resultados em relação aos passos de cromatografia descritos nos passos 5-9, na parte a jusante de tês sistemas descontínuos de purificação à escala piloto

| | BPP079 | BPP083 | BPP084 |
|--|---------|---------|---------|
| <u>Material de partida (passo 4)</u> | | | |
| Peso (kg) | 5476 | 4928 | 4220 |
| FVIII Total (IU) | 1642680 | 2389094 | 2022646 |
| Rendimento de FVIII (%) | 100 | 100 | 100 |
| Actividade específica *** (IU/mg) | 1107 | 1254 | 1210 |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | 3733 | – | – |
| <u>Eluato de VIIISelect (passo 6)</u> | | | |
| Peso (g) | 666 | 785 | 810 |
| FVIII Total (IU) | 1251414 | 2094380 | 1674270 |
| Rendimento de FVIII (%) | 76 | 88 | 83 |
| Actividade específica*** (IU/mg) | 8064 | – | – |
| DNA content (pg/ 1000 IU) | 1554 | – | – |
| <u>Nanofiltrado (passo 7)</u> | | | |
| Peso (g) | 7680 | 8205 | 9555 |
| Total (IU) | 1051392 | 1822331 | 1763853 |
| Rendimento de FVIII (%) | 94 | 88 | 97 |
| Actividade específica* (IU/mg) | – | – | – |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | <730 | – | – |
| <u>Eluato de O (passo 8)</u> | | | |
| Peso (g) | 281 | 291 | 263 |
| Total (IU) | 1002327 | 1755603 | 1857832 |
| Rendimento de FVIII (%) | 95 | 96 | 105 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 10975 | – | 10312 |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | 47 | 43 | <14 |
| <u>Eluato de GF (passo 9)</u> | | | |
| Peso (g) | 562 | 740 | 860 |
| Total (IU) | 627754 | 1124800 | 926220 |
| Rendimento de FVIII (%) | 79 | 116 | 101 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 12275 | 10000 | 10663 |
| Teor de ADN (pg/ 1000 IU) | – | <66 | – |

*Rendimento calculado em relação ao passo Q, ** Rendimento

calculado em relação ao passo GF, *** Medido com Bradford ***
Medido com análise de aminoácidos

A Figura 3 apresenta o padrão de coloração com prata de SDS-PAGE do produto final antes (Pista 3 - BPP083, Pista 7 - BPP084) e após (Pista 6 - C810A139, Pista 8 - C811A139) a formulação, purificado de acordo com o exemplo 9 (Tabela 18-19). A Pista 2 apresenta um marcador molecular, A Pista 3 apresenta uma amostra de controlo de FVIII e a Pista 4 apresenta um produto de FVIII disponível comercialmente (ReFacto® - Lote C66202).

A Figura 4 apresenta uma transferência de Western de FVIII utilizando anticorpos policlonais anti-FVIII humano. As Pistas 1 e 10 estão Vazias, a Pista 2 apresenta um padrão de massa Molecular (Precision Plus Protein Western C da Bio-rad), a Pista 3 apresenta um produto de FVIII disponível comercialmente, ReFacto® lote C66202, as Pistas 4-6, apresentam amostras de FVIII de controlo, as Pistas 7-9 apresentam os produtos formulados finais dos sistemas descontínuos BPP079, BPP083 e BPP084 purificados de acordo com o exemplo 9 (Tabela 17-18). As amostras foram diluídas para uma concentração de FVIII correspondente a 5 IU FVIII:C/mL antes de aplicar na transferência de western.

A Figura 5 apresenta uma 2-D-PAGE seguido de coloração com prata e transferência de western dos produtos formulados finais dos sistemas descontínuos BPP079 e BPP083, produto final (Eluato de GF) dos sistemas descontínuos eluato de GF de BPP079 e eluato de GF de BPP083, purificado de acordo com o exemplo 9 (Tabela 17-18). Foi utilizado como referência um produto de

FVIII disponível comercialmente (ReFacto®, Lote 70591). Lado esquerdo: imagens coradas com prata dos géis com os eluatos de GF de BPP079 e BPP083 e ReFacto®. Lado direito: Imagens de transferência de Western com eluatos de GF de BPP083 e ReFacto®.

Exemplo de conclusão 9

O processo de purificação descrito pode ser realizado à escala industrial num modo, que é reproduzível em relação à recuperação, pureza e qualidade do produto. Adicionalmente, satisfaz a elevada procura de pureza para que seja possível utilizar o produto no tratamento de humanos.

Exemplo 10: Escala industrial da sequência de purificação sem ligado de afinidade específica (resina aniónica multimodal; Capto Adhere em vez daquela)

Para estudar a reprodutibilidade da recuperação e da pureza, os Passos de purificação 2-3 (Capto MMC e SP Sepharose FF) e o passo 5 (inactivação de vírus), como descrito no exemplo 9, foram realizados para dois sistemas descontínuos (BPP068-069) à escala piloto. Posteriormente, os dois sistemas descontínuos foram misturados num sistema descontínuo a jusante (BPP071) e processados de acordo com os Passos 6-9 no exemplo 9, com a excepção de o Passo 6 (o gel VIIISelect) ter sido substituído por um passo de cromatografia de permuta aniónica multimodal (Capto Adhere). A sequência total de purificação pode ser estudada no Apêndice 2. Cada sistema descontínuo (BPP068-069) com origem em aproximadamente 50 L de suspensão de células, como descrito no exemplo 1-2.

O Passo Capto Adhere

A coluna de permute aniónica multimodal (Capto Adhere, GE Healthcare, Cat. Nº 17-5444) foi carregada no intervalo de 5000 - 10000 IU FVIII/mL de resina. O gel é, antes da aplicação do produto, equilibrado com tampão de equilíbrio. A solução de vírus inactivados (como descrito no exemplo 9, passo 5) é carregada na coluna Capto Adhere que é posteriormente lavada com tampão de equilíbrio e lavada sequencialmente com tampão de lavagem 1-3 seguido por eluição do FVIII, como descrito na Tabela 20.

Tabela 20

| | | |
|--|----------------------------|--|
| Cromatografia Multimodal /Capto Adhere | Tampão de Equilíbrio | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 7 |
| | Tampão de Lavagem 1 | 2 mol/kg de NaCl, 0,05 mol/kg de CaCl ₂ , 0,05 mol/kg de L-histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH 6,5 |
| | Tampão de Lavagem 2 | 0,1 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,02% (p/p) de Polissorbato 80, pH 6,5, |
| | Tampão de Lavagem 3 | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,3 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 20% (p/p) de etilenoglicol, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |
| | Tampão de Eluição | 0,3 mol/kg de NaCl, 0,01 mol/kg de CaCl ₂ , 0,01 mol/kg de L-histidina, 0,8 mol/kg de cloridrato de L-arginina, 0,02% de Polissorbato 80 (p/p), pH 6,5 |

Tabela 21, Sumário dos resultados sobre os dois primeiros passos de cromatografia (de acordo com o exemplo 9, passo 2-3) de dois sistemas descontínuos de purificação à escala piloto.

| | BPP068 | BPP069 |
|---|-------------------|-------------------|
| <u>Material de partida (como descrito no exemplo 1-2)</u> | | |
| Peso (kg) | 98,6 | 110,5 |
| FVIII Total (IU) | 734 570 | 596 700 |
| Rendimento de FVIII (%) | 100 | 100 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 43 | 52 |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | $2,1 \times 10^9$ | $7,1 \times 10^8$ |
| <u>Eluato MMC de Capto (passo 2 exemplo 9)</u> | | |
| Peso (kg) | 3,8 | 4,0 |
| FVIII Total (IU) | 500 813 | 389 814 |
| Rendimento de FVIII (%) | 68 | 65 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 449 | 596 |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | $3,4 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^7$ |
| <u>Eluato de SP (passo 3 exemplo 9)</u> | | |
| Peso (kg) | 2,2 | 3,1 |
| FVIII Total (IU) | 368 903 | 315 000 |
| Rendimento de FVIII ¹⁾ (%) | 88 | 79 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 1490 | 2071 |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | $1,6 \times 10^7$ | $4,3 \times 10^6$ |

1) Rendimento calculado em relação ao passo SP

* Medido com Bradford

Tabela 22. Sumário de resultados em relação aos passos de cromatografia (passo 5 - exemplo 9, Capto Adhere, passo 8-9 - exemplo 9) na parte a jusante de um sistema descontínuo de purificação à escala piloto.

| BPP071 | |
|--|-------------------|
| <u>Material de partida (passo 5 exemplo 9)</u> | |
| Peso (kg) | 5,2 |
| FVIII Total (IU) | 568 326 |
| Rendimento de FVIII (%) | 100 |
| Actividade específica* (IU/mg) | - |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | - |
| <u>Eluato de Capto Adhere</u> | |
| Peso (kg) | 296 |
| FVIII Total (IU) | 543 752 |
| Rendimento de FVIII ²⁾ (%) | 96 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 5117 |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | $2,5 \times 10^5$ |
| <u>Eluato de Q (passo 8, exemplo 9)</u> | |
| Peso (kg) | 244 |
| FVIII Total (IU) | 266212 |
| Rendimento de FVIII ³⁾ (%) | 52 |
| Actividade específica (IU/mg) | - |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | 1121 |
| <u>Eluato de GF (passo 9, exemplo 9)</u> | |
| Peso (kg) | 12 |
| FVIII Total (IU) | 5610 |
| Rendimento de FVIII ⁴⁾ (%) | 84 |
| Actividade específica* (IU/mg) | 8061 |
| Teor de ADN (pg/1000 IU) | 836 |

2) Rendimento calculado em relação ao passo Capto Adhere

3) Rendimento calculado em relação ao passo de Q Sepharose

4) Rendimento calculado em relação ao passo de filtração em Gel

* Medido com Bradford

A Figura 6 apresenta um gel de SDS-PAGE corado com prata das amostras de um sistema descontínuo piloto BPP071 purificadas de acordo com o exemplo 10. A Pista 1 apresenta um produto de FVIII disponível comercialmente (ReFacto®). A Pista 2 apresenta o material de partida (SPfiltrate) antes do passo Capto Adhere. A Pista 3 apresenta o perfil de pureza do eluato de Capto Adhere. A Pista 4 apresenta a pureza após a sequência de purificação do filtrado SP - Capto Adhere - Q Seph. A Pista 5 apresenta a pureza após a sequência de purificação do filtrado SP - Capto Adhere - Q Seph - filtração em Gel.

A Figura 7 apresenta uma transferência de Western de um gel de amostras do sistema descontínuo piloto BPP071 purificado de acordo com o exemplo 10. A Pista 1 apresenta um produto de FVIII disponível comercialmente (ReFacto®). A Pista 2 apresenta o eluato de Capto Adhere. A Pista 3 apresenta o resultado da sequência de purificação de filtrado SP - Capto Adhere - Q Seph. A Pista 4 apresenta os resultados após a sequência de purificação do filtrado de SP - Capto Adhere - Q Seph - Filtração em Gel.

Exemplo de CONCLUSÃO 10

O processo de purificação à escala piloto, incluindo um passo de cromatografia multimodal (Capto Adhere) em vez do ligando de afinidade VIIISelect, revela a mesma recuperação, pureza e qualidade de produto no eluato de GF final.

Descrição da análise

FVIII: C, Método de rastreio baseado em Coatest

O método é baseado no princípio de dois estágios e foi realizado utilizando a técnica de microplaca. No estágio um, o factor X (Xa) activado é criado através da via intrínseca em que FVIII: C actua como um co-factor. No estágio dois, o Factor Xa é então determinado através da utilização de um substrato cromogénico sintético, S-2222 na presença de um inibidor de trombina I-2581 para prevenir a hidrólise do substrato pela trombina. A reacção é parada com ácido e a actividade VIII: C, que é proporcional à libertação de pNA (para-nitroanilina), é determinada fotometricamente a 405 nm contra um reagente branco.

O método respeita as exigências da Farmacopeia Europeia. A unidade de FVIII: C é expressa em unidades internacionais (IU), como definido no actual International Concentrate Standard (IS) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A rotina utilizando tampão contendo 1% de BSA em vez do plasma hemofílico grave para pré-diluições foi validado. Ver também referências da literatura (European Pharmacopoeia Supplement 2000, general Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosén S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. *J, Haematol, Supl 40*, vol 33, 139-145, 1984; Carlebjörk G, Oswaldsson U, Rosén S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. *Thrombosis Research* 47; 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A e Thorpe R. Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. *Biological*, 24, 351-362 (1996)).

Determinação da proteína total de acordo com Bradford

A determinação da proteína de acordo com Bradford é baseada na observação de que o máximo de absorvência para uma solução acídica de Coomassie Brilliant Blue G-250 desvia desde 465 nm para 595 nm quando ocorre a ligação à proteína. Ambas as interacções hidrofóbicas e iónicas estabilizam a forma aniónica do corante, provocando uma alteração da cor visível. O ensaio é útil, uma vez que o coeficiente de extinção de uma solução do complexo corante-albumina é constante ao longo de um intervalo de concentração de 10 vezes. Ver, também, a referência Bradford, MM. "A rapid e sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976, para informação adicional.

Determinação da proteína total de acordo com a análise de aminoácidos (AAA)

Antes da AAA todas as proteínas são hidrolisadas por HCl a 6 M durante 24 h a 110 °C. Os aminoácidos são separados por cromatografia de permuta catiónica em resinas de poliestireno sulfonatadas e detectados continuamente no eluente. A detecção é baseada na derivatização da ninidrina pós-coluna utilizando um fotómetro duplo para a medição simultânea a 440 nm para prolina e hidroxiprolina e 570 nm para todos os outros aminoácidos. Os aminoácidos asparagina e glutamina são ambos desamidados durante a AAA e são determinados como ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente. Assim, os resultados do ácido aspártico e do ácido glutâmico representam a soma de ácido aspártico/asparagina (Asx) e ácido glutâmico/glutamina (Glx), respectivamente, na

amostra original. O triptofano não cria uma resposta distinta utilizando este método e, por isso, não é quantificado pela AAA. A cisteína é destruída durante a hidrólise e não é quantificada. A AAA é ainda descrita pela referência: Total protein AAA analytical method. Spackman, D. H., Stein, W. H., e Moore, S. (1958) *Anal. Biochem.* 30: 1190-1206.

Pureza ou actividade específica (FVIII:C/Proteína total)

A pureza (ou também denominada actividade específica) para uma amostra, é calculada tomando o valor alcançado na análise FVIII: C e divide-o pelo valor alcançado a partir da análise da proteína total.

SDS-PAGE (Distribuição do peso molecular)

A electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) envolve a separação de proteínas com base no seu tamanho. Este método descreve a SDS-PAGE de proteínas, que é realizada em condições de redução. Aquecendo a amostra em condições de desnaturação e redução, as proteínas ficam desnaturadas e revestidas com o detergente aniónico dodecilsulfato de sódio (SDS), adquirindo uma carga negativa pura elevada que é proporcional ao comprimento da cadeia do polipéptido. Quando se carrega numa matriz de gel de poliacrilamida e se coloca num campo eléctrico, as moléculas de proteína carregadas negativamente migram em direcção ao eléctrodo carregado positivamente e são separadas por um efeito de peneira molecular, *i. e.*, através do seu peso molecular. Os géis de poliacrilamida impedem as moléculas maiores de migrar

tão rapidamente como as moléculas mais pequenas. Devido à proporção da carga-para-massa ser quase idêntica entre os polipéptidos desnaturados com SDS, a separação final das proteínas está dependente, quase inteiramente, nas diferenças na massa molecular relativa dos polipéptidos. Num gel de densidade uniforme, a distância de migração relativa da proteína (R_f) é negativamente proporcional ao log da sua massa. Se as proteínas de massa conhecida correm em simultâneo com as desconhecidas, A relação entre R_f e massa pode ser representada graficamente, e as massas das proteínas desconhecidas podem ser estimadas. As bandas da proteína separadas por electroforese são visualizadas através de coloração com prata. A avaliação é realizada visualmente ajuizando o aspecto dos padrões, da referência (amostra de controlo) e das amostras analisadas.

Método analítico de ADN (Reacção em cadeia pela polimerase, quantitativa, qPCR)

O ensaio é um ensaio por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) baseado na química do SYBR Green 1. É baseado numa publicação de Umetani *et al.*, com alguns melhoramentos adicionados (Umetani N, Kim J, Hiramatzu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ e Hoon DSB. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin Chem* 2006;52:1062-1069). Durante cada ciclo de PCR, um fragmento de 115 pares de bases das famílias de sequências ALU é amplificado pelos iniciadores, ALU115-F e ALU115-R. A família de sequências ALU altamente abundante está limitada ao genoma da família *Hominidae* (Chimpanzés, Gorilas, Humanos e Orangotangos), mas o ensaio apenas amplifica o ADN de origem humana. O processo

permite análise de elevado rendimento do ADN de HEK293F residual no meio de cultura de tecidos isento de células e os seus processos de purificação a jusante.

Transferência de Western, distribuição da massa molecular de FVIII

As proteínas e os péptidos nas preparações de FVIII são separados de acordo com a massa molecular através de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) em condições reduzidas. Posteriormente, as proteínas são transferidas electroforeticamente da matriz do gel para uma membrana de nitrocelulose que é subsequentemente incubada com um agente de bloqueamento. São então adicionados anticorpos policlonais de carneiro dirigidos à molécula total de FVIII, seguido por um anticorpo secundário que é específico para a parte Fc dos anticorpos de cabra/carneiro. Como um terceiro passo são adicionados complexos solúveis de anticorpo de cabra para peroxidase de rábano (HRP) e HRP. Os polipéptidos de FVIII são então detectados pela ocorrência de bandas azuis após incubação com o substrato 4-cloro-1-naftol.

Electroforese em gel de poliacrilamida a duas dimensões (2-D PAGE)

Foi realizada 2-D-PAGE de modo a estudar o padrão de bandas electroforéticas das cadeias de proteína de Humano-cl rhFVIII. A focagem isoeléctrica foi realizada como a corrida da primeira dimensão utilizando um gradiente linear de pH desde pH 3 até 10.

A segunda dimensão da SDS-PAGE foi corrida utilizando géis de gradiente de poliacrilamida (3-8%). Os géis foram corados com coloração de prata, seguido da corrida na segunda dimensão ou foram submetidos a transferência de western (O' Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021).

Lisboa, 18 de Outubro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de purificação ou enriquecimento de FVIII de coagulação empregando cromatografia numa resina multimodal possuindo unidades ligadas a uma matriz e as unidades são capazes de interagir com FVIII numa mistura através de interacções iónicas e outros tipos de interacções, cujo processo comprehende os passos de
 - proporcionar uma fracção contendo FVIII numa solução aquosa possuindo uma elevada força iónica;
 - colocar em contacto a fracção que contém FVIII com a resina multimodal;
 - opcionalmente lavar a resina multimodal possuindo FVIII adsorvido com um tampão de lavagem aquoso;
 - eluir as fracções que contêm FVIII através de um tampão de eluição aquoso compreendendo, pelo menos, um aminoácido que está carregado positivamente a pH 6 até 8 seleccionado do grupo que consiste em lisina, arginina, histidina e suas combinações; e
 - opcionalmente, recolher as fracções que contêm FVIII numa forma purificada ou enriquecida.
2. Processo da reivindicação 1, em que a resina multimodal comprehende unidades ligadas a uma matriz e as unidades são capazes de interagir com FVIII num ambiente aquoso através de interacções iónicas e outros tipos de interacções, tais como ligação por hidrogénio e interacção hidrofóbica.

3. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por o FVIII ser FVIII recombinante, em particular, FVIII com o domínio B eliminado.
4. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a solução aquosa compreender FVIII numa solução de sal elevado correspondendo a uma condutividade desde cerca de 25 a cerca de 200 mS/cm a 25 °C.
5. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 até 4, caracterizado por lisina, arginina ou histidina estar presente em concentrações de > 0,4 M, em particular > 0,5 M.
6. Processo da reivindicação 5 caracterizado por o tampão de eluição compreender adicionalmente compostos orgânicos contendo pelo menos, um grupo hidroxilo, tal como um álcool, compostos orgânicos contendo, pelo menos, um grupo amino, tais como um aminoácido, pelo menos, uma fonte proporcionando iões Ca^{2+} , pelo menos um composto para regular a força iônica do tampão, tal como sais inorgânicos, pelo menos um detergente não iônico e, pelo menos, uma substância tamponante para regular o pH desde cerca de 6 a cerca de 8, em particular, até cerca de um valor neutro.
7. Processo da reivindicação 6, caracterizado por o álcool ser seleccionado do grupo que consiste em metanol, propanol, etilenoglicol e propilenoglicol; a fonte que proporciona Ca^{2+} é CaCl_2 ; os sais inorgânicos são seleccionados do grupo que consiste em KCl e NaCl ; o detergente não iônico ser seleccionado do grupo que consiste em Tween 20, Tween 80 e Pluronic F68; a substância tamponante ser seleccionada do

grupo que consiste em citrato de sódio, histidina, HEPES, MES e acetato de sódio a um pH entre 6-8.

8. Processo de qualquer uma das reivindicações 6 a 7, caracterizado por o tampão de lavagem ser aplicado à resina multimodal, para remover os contaminantes por lavagem e reter FVIII, antes de o FVIII ser libertado.
9. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a resina de cromatografia "multimodal" conter pelo menos uma das seguintes unidades:
 - a. um ligando de N-Benzil-N-metil etanolamina carregado positivamente,
 - b. um ligando de ácido 2-(benzoilamino)butanóico carregado negativamente,
 - c. um ligando de fenilpropilo,
 - d. um ligando N-hexilo,
 - e. um ligando 4-Mercapto-Etil-Piridina,
 - f. um ligando de ácido 3-((3-metil-5-((tetra-hidrofuran-2-ilmetil)-amino)-fenil)-amino)-benzóico ou suas combinações.
10. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por a resina de cromatografia "multimodal" ser seleccionada a partir das seguintes resinas disponíveis comercialmente HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.
11. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 até 10, caracterizado por o passo de cromatografia multimodal ser combinado com um passo de cromatografia de afinidade para

FVIII em que a afinidade é proporcionada por um ligando que se baseia numa proteína expressa em leveduras.

12. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por a sequência de purificação compreender ainda passos de remoção/inactivação de patogénicos compreendendo um passo de inactivação com base química, um passo de remoção baseado no tamanho, passos de cromatografia ou suas combinações, cujos passos são baseados em diferentes propriedades fisiológicas dirigidas ao agente patogénico a ser removido.
13. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado por a sequência de purificação compreender ainda os seguintes passos:
 - i. uma membrana aniónica tal como Sartobind Q em particular, para a redução de ADN;
 - ii. uma resina catiónica multimodal, tal como Capto MMC;
 - iii. uma resina de permuta catiónica, tal como SP Sepharose FF;
 - iv. uma membrana aniónica, tal como Sartobind Q, em particular para posterior redução de ADN
 - v. um passo de inactivação de base química para vírus de envelope lipídico, em particular, a inactivação de solvente/detergente empregando tri-n-butil fosfato e Triton X-100;
 - vi. uma resina de afinidade com base num ligando de proteína, tal como VIIISelect, consistindo o ligando VIIISelect num fragmento de anticorpo expresso em levedura ou uma resina de cromatografia aniónica multimodal, tal como Capto Adhere;

vii. um passo de remoção por filtração do agente patogénico com um tamanho médio de poro de cerca de 20 nm, tal como Planova 20N;

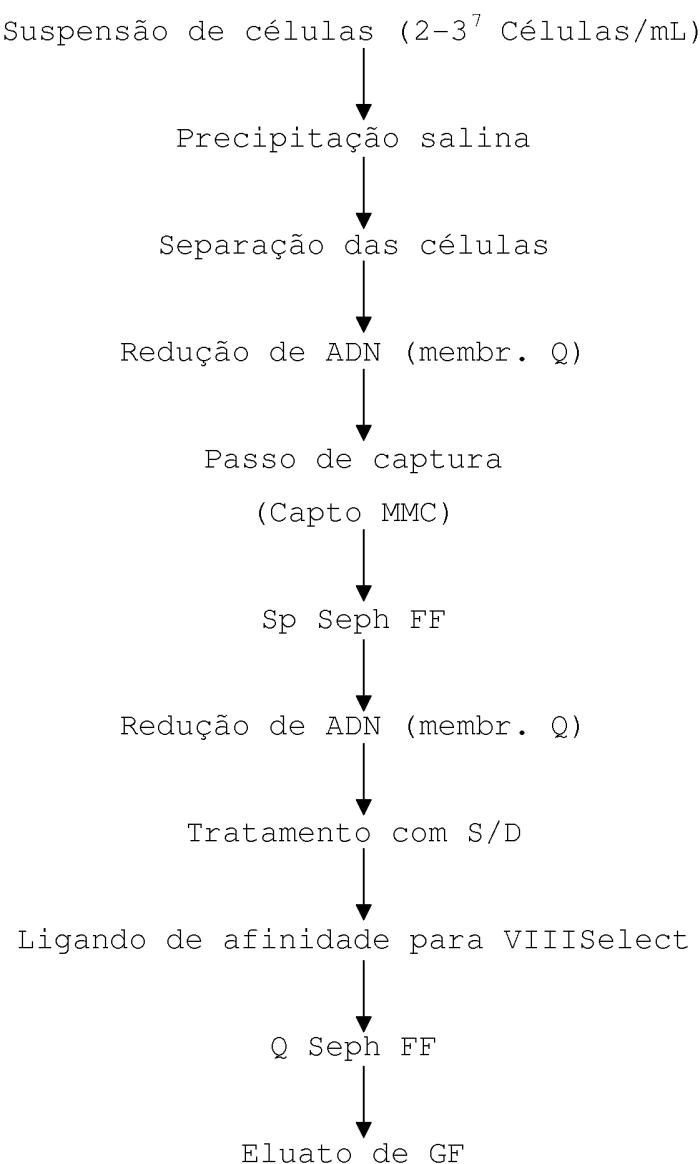
viii. uma resina de permuta aniónica, tal como Q Sepharose FF;

ix. uma resina de cromatografia de exclusão por tamanho, tal como Superdex 200 pg.

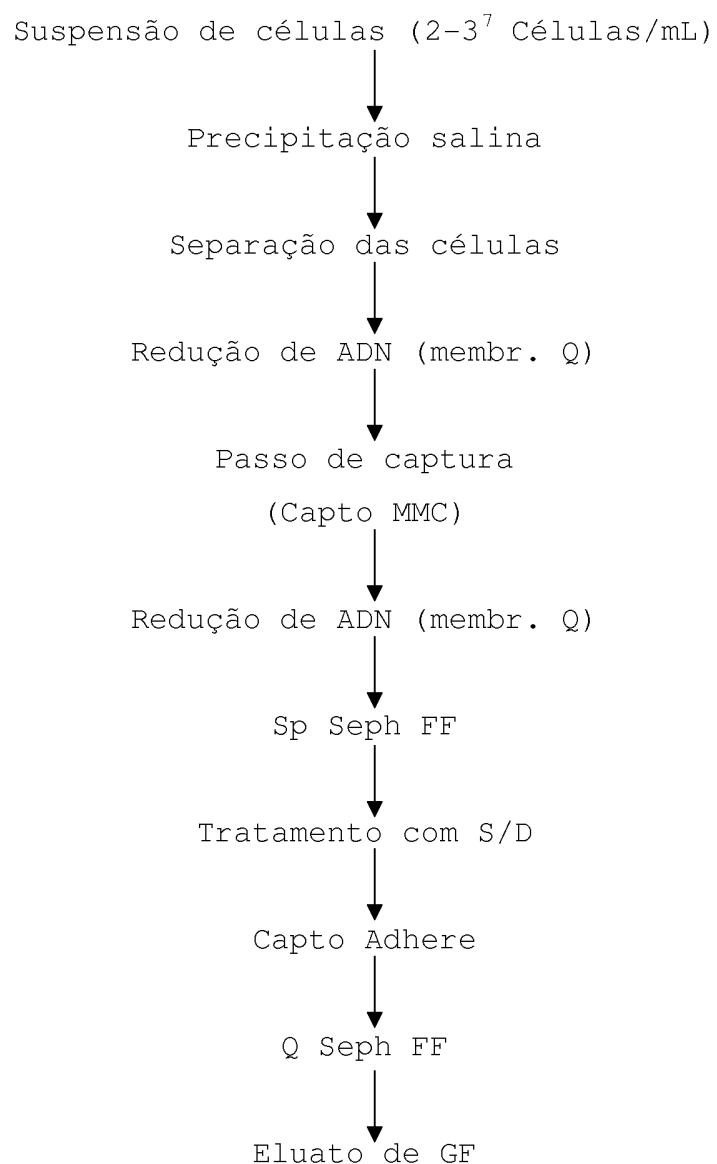
14. Processo da reivindicação 13, caracterizado por as condições de eluição para FVIII do passo de permuta catiónica são baseadas em Ca, variando a concentração desde 0,15-0,25 M e a condutividade total do tampão de eluição não excedendo 25 mS/cm a 25 °C.
15. Processo da reivindicação 13 e/ou 14, caracterizada por a pureza após o último passo de purificação ser >4000 IU/mg, de um modo preferido >9000 IU/mg e de um modo ainda mais preferido >10000 IU/mg de proteína e que o teor de ADN é <1000 pg/1000 IU FVIII, de um modo preferido <100 pg/1000 IU de FVIII.

Lisboa, 18 de Outubro de 2012

Apêndice 1



Apêndice 2



Apêndice 3

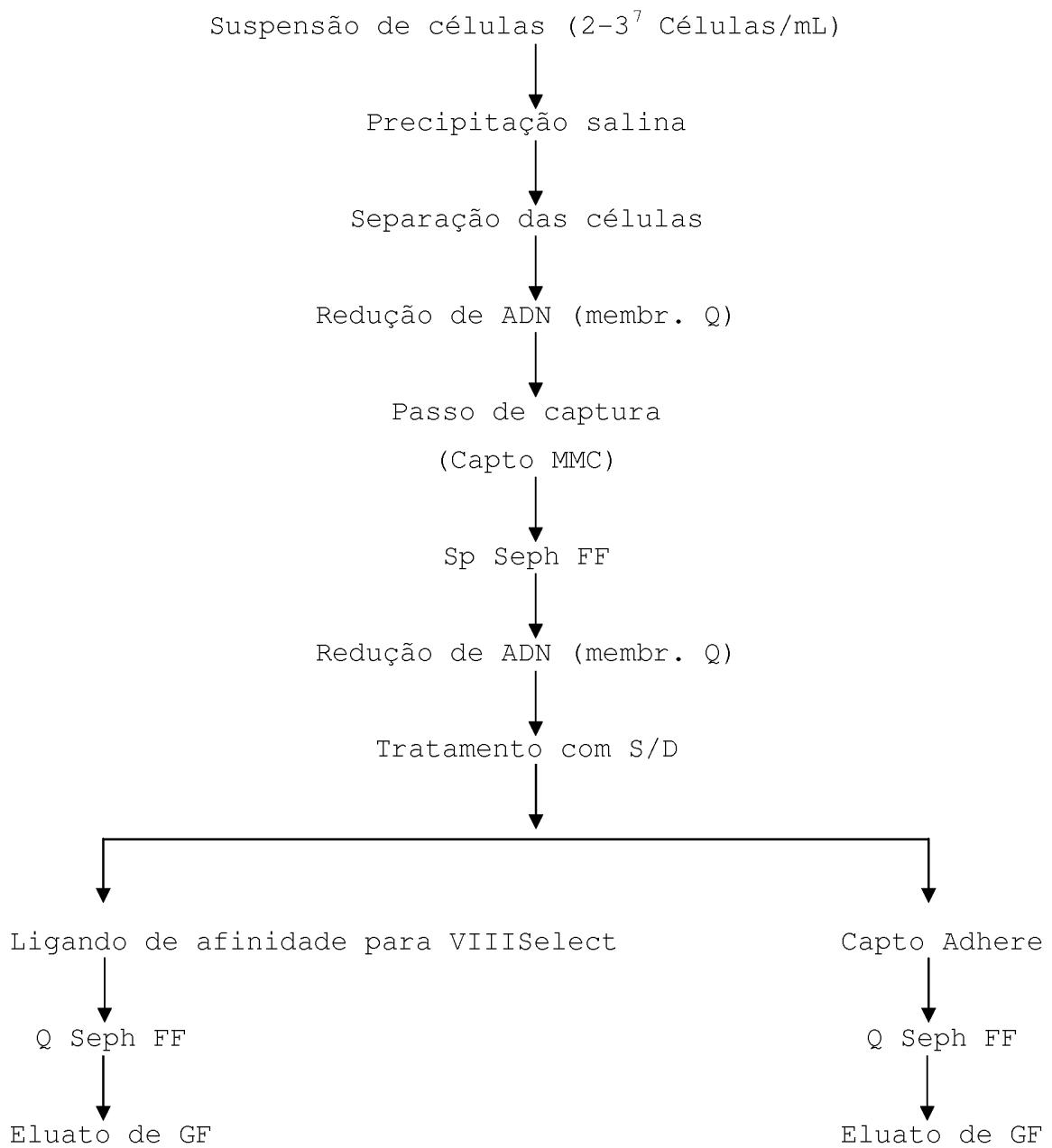


Figura 1



Pista 1 2

Figura 2

Esquema de VIIISelect



Esquema de Capto Adhere

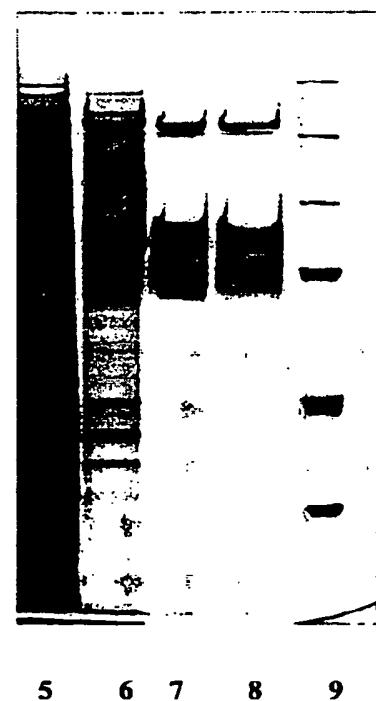


Figura 3

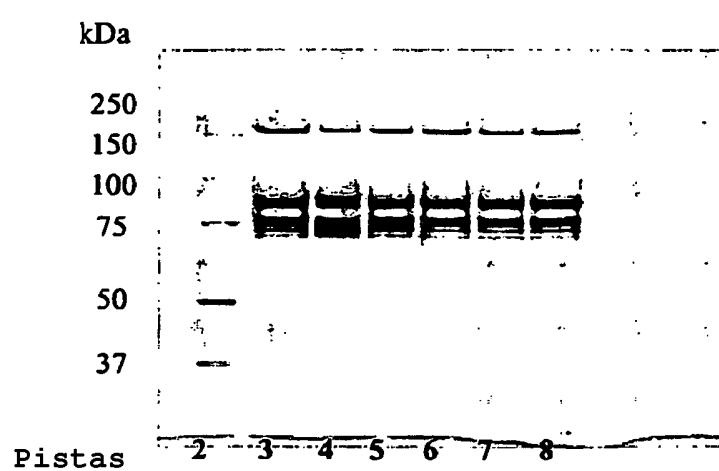


Figura 4

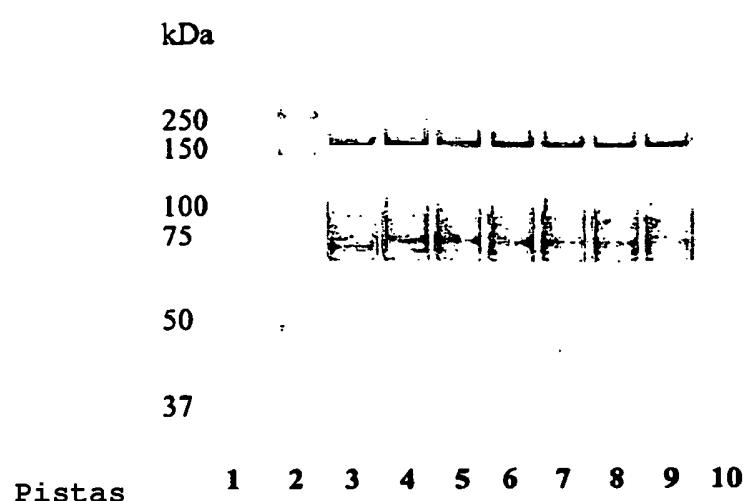


Figura 5a

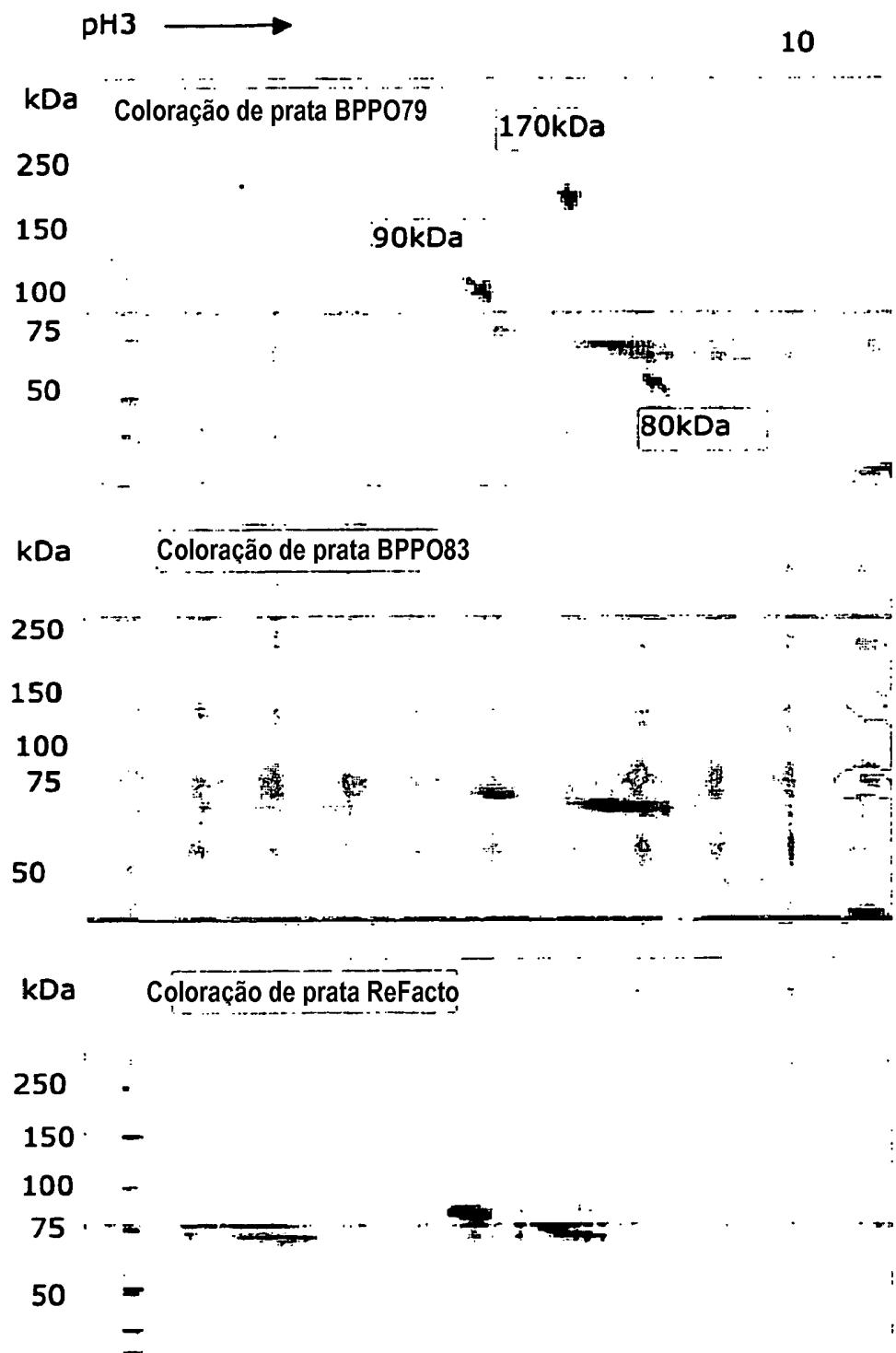


Figura 5b

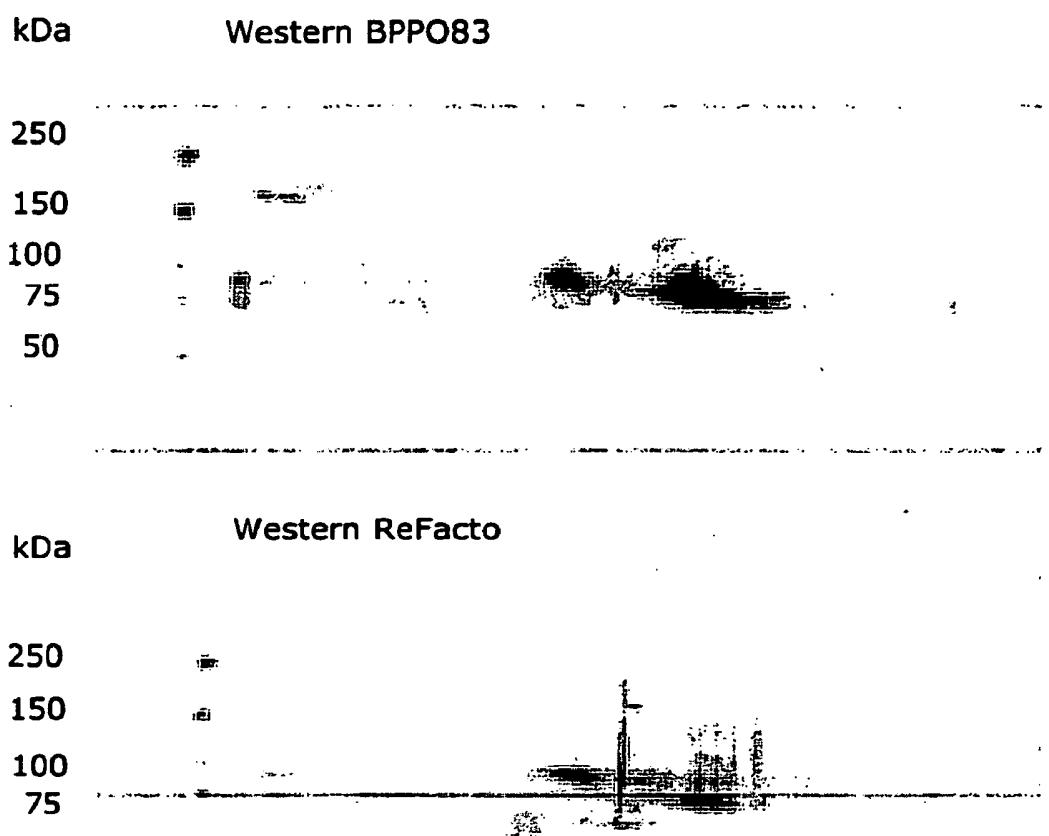


Figura 6

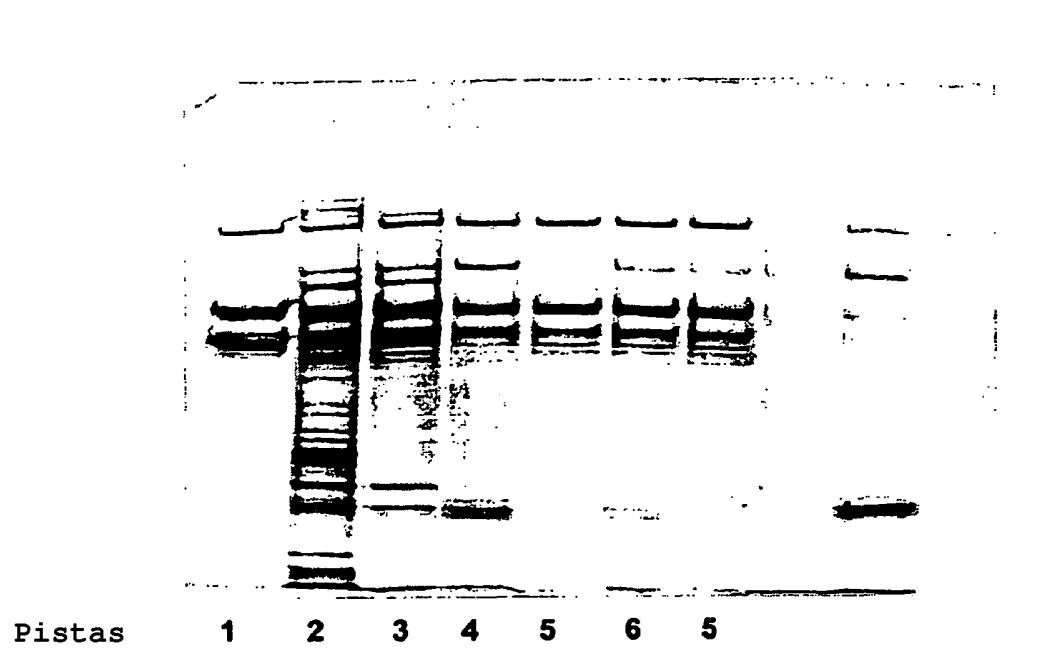


Figura 7

