

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 382**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010** E 17155619 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** EP 3211077

54 Título: **Métodos de purificación de adamts13 recombinante y otras proteínas y composiciones de estas**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 230308 P

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

28.02.2025

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITD
(100.00%)
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka - Japón , JP**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 000 382 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de purificación de adamts13 recombinante y otras proteínas y composiciones de estas

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere en general a métodos de purificación de desintegrina A y metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1, 13 (ADAMTS 13) y otras proteínas, y composiciones que comprenden dichas proteínas purificadas.

10

Antecedentes de la invención

La familia de genes de metaloproteinasas. ADAM (una desintegrina y metaloproteinasas), incluye miembros que son proteasas ancladas a la membrana con diversas funciones. Los miembros de la familia ADAMTS se distinguen de las ADAM por la presencia de uno o más dominios similares a trombospondina 1 (TSPI) en el extremo C y la ausencia de la repetición de EGF, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática que típicamente se observan en las metaloproteinasas ADAM.

15

Una desintegrina A y metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1, 13 (ADAMTS 13) es un miembro de la familia ADAMTS. ADAMTS 13 tiene ocho dominios de trombospondina y ningún dominio transmembrana hidrofóbico. En consecuencia, se secreta. La ADAMTS13 escinde el factor von Willebrand en el enlace Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ y requiere iones tanto calcio como zinc para funcionar. La ADAMTS13 también se conoce como "proteasa de escisión del factor von Willebrand" y "VWFPC, por sus siglas en inglés".

20

25

La expresión deficiente de ADAMTS13 se ha implicado en la patogénesis de algunas enfermedades, por ejemplo, trastornos trombóticos como la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. n.º 20070015703). En la PTT, la deficiencia y/o la inhibición de ADAMTS 13 produce trombosis microscópicas extensas que se forman en vasos sanguíneos pequeños en todo el cuerpo (microangiopatía trombótica). Los glóbulos rojos que pasan a través de coágulos microscópicos experimentan un esfuerzo cortante, lo que provoca daños en la membrana del glóbulo rojo y, a su vez, conduce a la hemólisis intravascular y a la formación de esquistocitos. Las trombosis también provocan una reducción del flujo sanguíneo, lo que puede provocar daños en los órganos terminales. Los síntomas incluyen típicamente problemas neurológicos, como alucinaciones, comportamiento extraño, estado mental alterado, accidente cerebrovascular o dolores de cabeza; insuficiencia renal; fiebre; y trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas), que produce hematomas o púrpura; y anemia hemolítica microangiopática, que implica anemia e ictericia. La terapia actual implica plasmaféresis para reducir los anticuerpos circulantes contra ADAMTS13 y/o reponer los concentraciones en sangre de la enzima.

30

35

40

Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar métodos para purificar ADAMTS13 recombinante, particularmente a escala de producción comercial, que pueda usarse como agente terapéutico. La purificación de ADAMTS13 ha resultado difícil y se han intentado varios enfoques, incluida la cromatografía. Un material cromatográfico que se une a la proteína que no es ADAMTS13, permitiendo que la proteína ADAMTS13 aparezca en el eluato o sobrenadante, proporcionaría un enfoque útil para la purificación. Un material de cromatografía que se une a la proteína ADAMTS13, mientras que las impurezas que no son ADAMTS13 permanecen en solución o se unen con mucha más fuerza, también presenta un enfoque atractivo y puede usarse junto con otros enfoques. La presente explicación proporciona dichos enfoques.

45

50

Asimismo, los contaminantes víricos han planteado desafíos adicionales en la purificación de las proteínas ADAMTS13, así como de otras proteínas y proteínas recombinantes. Un enfoque convencional implicaba tratar una muestra para purificar con una mezcla de solvente y detergente en solución. La incubación de la muestra con los productos químicos solventes y detergentes provocó la desactivación de los virus recubiertos de lípidos. Sin embargo, este tratamiento en solución requería de manera ineficiente la transferencia de la muestra a al menos otro recipiente, por ejemplo, para facilitar la eliminación de los productos químicos solventes y detergentes después del tratamiento. Además, algunas proteínas, incluida ADAMTS13, son sensibles a los productos químicos solventes y detergentes, lo que resulta en la formación de agregados. La presente explicación proporciona un enfoque que implica la inmovilización de la proteína durante el tratamiento con solvente y detergente para abordar dichos problemas de inactivación del virus.

55

60

Compendio de la invención

Esta invención está definida por las reivindicaciones. Un aspecto de la descripción se refiere a un método para purificar la proteína recombinante desintegrina A y metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1, 13 (ADAMTS13) (en particular, ADAMTS 13 humana) a partir de una muestra que comprende proteína ADAMTS 13 e impurezas no ADAMTS13. Se ha descubierto sorprendentemente que la cromatografía de hidroxipatita se puede usar en condiciones adecuadas para purificar la proteína ADAMTS 13 de impurezas que no son ADAMTS13. El método comprende el enriquecimiento de la proteína ADAMTS 13 mediante el contacto

65

5 cromatográfico de la muestra con hidroxapatita en condiciones que permiten que la proteína ADAMTS13 aparezca en un eluato de la hidroxapatita. Esto es, la muestra se somete a cromatografía con hidroxapatita en condiciones que permiten que la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de la proteína ADAMTS 13, no se una a la hidroxapatita, mientras que las impurezas quedan retenidas. En algunas realizaciones preferidas, la proteína ADAMTS 13 recombinante se purifica a partir del sobrenadante recolectado del cultivo de células CHO que comprende ácido nucleico ADAMTS13 recombinante. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento porcentual en el sobrenadante o eluato sorprendentemente es del 50 % al 100 %. El método puede comprender además una cromatografía en tándem que comprende poner en contacto cromatográficamente el eluato de la hidroxapatita con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento porcentual de ADAMTS13 después del enriquecimiento por cromatografía en tándem es sorprendentemente al menos del 60 %.

15 En algunas realizaciones, el método comprende además un paso de preparación de preenriquecimiento opcional para concentrar ADAMTS13 en la muestra y/o unir la proteína ADAMTS13 a una resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, el método puede comprender además poner en contacto cromatográficamente la muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS 13 de la resina de intercambio aniónico antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita; y/o concentrar la proteína ADAMTS13 en la muestra mediante ultrafiltración antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita; y/o estabilizar la proteína ADAMTS13 mediante intercambio por diafiltración en un tampón que comprende iones calcio e iones zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxapatita. En algunas realizaciones preferidas, la muestra se concentra mediante ultrafiltración de 10 a 20 veces, el tampón se intercambia mediante diafiltración con un corte molecular de 30 kDa a un tampón de baja conductividad que contiene iones calcio y zinc, y el ADAMTS 13 se une y se eluye de una resina de intercambio aniónico, como ANX Sepharose Fast Flow, POROS 50D o POROS 50PI, antes de la cromatografía en tándem. En algunas realizaciones preferidas, la agrupación de eluato del paso de cromatografía de intercambio aniónico se diluye 1:4 con un tampón de dilución de hidroxapatita para reducir la conductividad a 6 mS/cm antes de la cromatografía en tándem con hidroxapatita, que comprende una cromatografía con hidroxapatita seguida de una cromatografía usando el eluato de la hidroxapatita con una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, el eluato de los pasos de preenriquecimiento puede proporcionar sorprendentemente un rendimiento porcentual de al menos el 75 %.

35 En algunas realizaciones, el método comprende además un paso de pulido opcional mediante cromatografía de intercambio catiónico, después del contacto cromatográfico con la hidroxapatita o la resina de modo mixto. En dichas realizaciones, después del contacto con la hidroxapatita o la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico, el método puede comprender además un paso de preparación de la proteína ADAMTS13 para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón. En algunas realizaciones, este paso de preparación se realiza mediante ultrafiltración/diafiltración, mediante diálisis y/o mediante filtración en gel. En algunas realizaciones donde se usa ultrafiltración/diafiltración, el valor de corte es de 10 kDa. En algunas realizaciones, el intercambio de tampón se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico en ANX Sepharose-FF low sub. En algunas realizaciones donde se usa diálisis, la diálisis puede consistir en no más de 2 pasadas a través de un solo módulo de diálisis. En algunas realizaciones preferidas, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en una columna Source S o una columna POROS S. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento porcentual de ADAMTS13 después de reducir la conductividad del tampón es sorprendentemente al menos del 90 %, y después del pulido por cromatografía de intercambio catiónico, sorprendentemente al menos del 70 %.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además someter la proteína ADAMTS13 a un paso de inactivación de virus opcional, por ejemplo, para desactivar virus y/o eliminar virus y partículas víricas. En algunas realizaciones, el paso de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de solvente y detergente que comprende un detergente no iónico y un solvente orgánico a la proteína ADAMTS13. En algunas realizaciones preferidas, la proteína ADAMTS13 está inmovilizada, por ejemplo, inmovilizada en una resina de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la mezcla de solvente y detergente comprende el 1 % de TRITÓN X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de TWEEN 80; y/o el tratamiento con solvente y detergente dura 30 minutos a una temperatura de 12 °C a 16 °C. Alternativamente o además, el paso de inactivación del virus puede comprender filtrar la proteína ADAMTS13 con un nanofiltro para eliminar virus y/o partículas víricas. En algunas de estas realizaciones, la nanofiltración se lleva a cabo a través de un filtro de 20 N o 35 N, antes y/o después del tratamiento con solvente y detergente. En algunas realizaciones, el paso de inactivación del virus se realiza después del paso de preparación, descrito anteriormente, y/o después del paso de cromatografía en tándem; y/o después de la cromatografía de intercambio catiónico de pulido, descrita anteriormente. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento porcentual de ADAMTS13 después de la inactivación del virus es sorprendentemente al menos del 95 %.

65 En algunas realizaciones, el método comprende además eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio catiónico. En algunas realizaciones preferidas, se usa la elución en gradiente, por ejemplo, la elución en gradiente que comprende un primer tampón que tiene una concentración de sal baja y un segundo

tampón que tiene una concentración de sal más alta. En algunas realizaciones más preferidas, se usa la elución por pasos, incluso más preferiblemente, la elución por pasos implica la elución de la proteína ADAMTS13 de la resina con un tampón de almacenamiento. Por ejemplo, el tampón de almacenamiento puede tener un pH mayor que 7,0 y comprender menos de 10 mM de iones calcio, un compuesto tamponante, el 0,05 % de detergente no iónico y una sal. En algunas realizaciones más preferidas, el método no comprende ningún paso posterior de concentración o intercambio de tampón, después de la elución de la resina con el tampón de almacenamiento.

En una realización particularmente preferida, se proporciona un método para purificar la proteína ADAMTS13 recombinante a partir de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas no ADAMTS13, comprendiendo el método poner en contacto cromatográficamente la muestra con hidroxiapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS13 aparezca en un eluido o sobrenadante de la hidroxiapatita; y a continuación poner en contacto cromatográficamente dicho eluido con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica que se une a la proteína ADAMTS 13, preferiblemente como cromatografía en tándem.

En otra realización particularmente preferida, los pasos de cromatografía descritos anteriormente son precedidos por el contacto cromatográfico de la muestra con una resina de intercambio aniónico y la elución de la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico; y/o la concentración de la proteína ADAMTS13 en la muestra por ultrafiltración, y la estabilización de la proteína ADAMTS13 por intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones calcio e iones zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita.

En otra realización particularmente preferida, después del contacto con la hidroxiapatita o la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico, el método comprende además el paso de preparar la proteína ADAMTS13 para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón, en donde el paso de preparación se realiza por ultrafiltración/diafiltración; y/o por diálisis que consiste en no más de 2 pasadas a través de un único módulo de diálisis; y/o por filtración en gel.

En otra realización particularmente preferida más, el método comprende obtener una muestra del sobrenadante recolectado de células CHO en cultivo que comprenden ácido nucleico ADAMTS13 recombinante; poner en contacto cromatográficamente la muestra con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS 13 de la resina de intercambio aniónico antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita; y/o concentrar la proteína ADAMTS13 en la muestra por ultrafiltración; y estabilizar la proteína ADAMTS13 por intercambio de diafiltración en un tampón que comprende iones calcio e iones zinc antes del contacto cromatográfico con la hidroxiapatita; seguido de poner en contacto cromatográficamente la muestra con hidroxiapatita en condiciones que permitan que la proteína ADAMTS 13 aparezca en un eluato o un sobrenadante de la hidroxiapatita; y luego poner en contacto cromatográficamente el eluato con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica que se une a la proteína ADAMTS13; seguido de la preparación de la proteína ADAMTS13 para el intercambio de cationes mediante la reducción de la conductividad del tampón, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración; y/o mediante diálisis que consiste en no más de 2 pasadas a través de un único módulo de diálisis; y/o mediante filtración en gel, que opcionalmente comprende además uno o más pasos de inactivación del virus. En algunas de estas realizaciones, el paso de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de solvente y detergente que comprende un detergente no iónico y un solvente orgánico a la proteína ADAMTS13, en donde la proteína ADAMTS 13 está inmovilizada en una resina de intercambio catiónico y la mezcla de solvente y detergente comprende el 1 % de TRITÓN X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de TWEEN 80. En otra realización más, el paso de inactivación del virus usa, además del tratamiento con solvente y detergente, o su lugar, un nanofiltro para eliminar virus y/o partículas víricas. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento porcentual de ADAMTS13 del procedimiento general expuesto anteriormente es sorprendentemente del 22 % al 24 % o más, y en realizaciones incluso más preferidas, los agregados sorprendentemente se reducen en un 50 %.

En algunas realizaciones en las que la ADAMTS13 se ha inmovilizado en una resina de intercambio catiónico, el método comprende además eluir la proteína ADAMTS 13 de la resina usando una elución por pasos con un tampón de almacenamiento que tiene un pH mayor que 7,0 y que comprende una concentración menor que 10 mM de iones calcio, un compuesto tamponante, el 0,05 % de detergente no iónico y una sal; o usando una elución en gradiente que comprende un primer tampón que tiene un bajo contenido de sal y un segundo tampón que tiene un mayor contenido de sal.

Otro aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende una proteína ADAMTS 13 recombinante preparada según cualquier realización de los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición que comprende la proteína ADAMTS13 purificada y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto adicional de la descripción se refiere a un método para inactivar contaminantes víricos en una muestra de proteína, donde la proteína puede ser cualquier proteína de una fuente que pueda tener contaminantes víricos. En realizaciones preferidas, la proteína es una proteína recombinante, particularmente

proteínas sensibles a la agregación cuando se exponen a solventes orgánicos y detergentes. En algunas realizaciones, la proteína puede ser la proteína ADAMTS13, en particular, ADAMTS13 recombinante, o una proteína diferente (en particular, una proteína recombinante diferente). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un factor de coagulación sanguínea. En algunas realizaciones, la proteína es, por ejemplo, uno o más de los siguientes: factor VIII, factor II, factor VIIa, factor IX, trombina, factor de von Willebrand, anticuerpo anti-MIF u otra proteína que se purifica mediante cromatografía. La inactivación vírica puede llevarse a cabo junto con la purificación de proteínas o no. En algunas realizaciones, el método comprende inmovilizar la proteína sobre un soporte; y tratar la proteína inmovilizada con una mezcla de detergente y solvente que comprende un detergente no iónico y un solvente orgánico. En algunas realizaciones preferidas, el soporte es una resina cromatográfica. En realizaciones incluso más preferidas, la mezcla de detergente y solvente comprende el 1 % de Tritón X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de polisorbato 80 (Tween 80). El tratamiento con mezcla de disolvente-detergente puede continuar durante un tiempo prolongado, por ejemplo, de 30 minutos a 1 hora, mientras la proteína permanece inmovilizada en la resina cromatográfica, por ejemplo, en una resina de intercambio catiónico; y/o el tratamiento con disolvente-detergente puede tener lugar entre 2°C y 10°C. Este enfoque para la inactivación de virus puede reducir sorprendentemente la formación de agregados de proteínas durante el tratamiento con una mezcla de detergente-detergente en una cantidad significativa, por ejemplo, en más del 50%, en comparación con el tratamiento con una mezcla de disolvente-detergente mientras la proteína no está inmovilizada en solución. En algunas realizaciones preferidas, el procedimiento sigue eluyendo la proteína del soporte con un tampón, como la elución en gradiente, donde pequeñas cantidades de agregados que se forman se eliminan aún más en la fracción de elución tardía. En algunas realizaciones preferidas, el procedimiento sigue eluyendo la proteína con un tampón de almacenamiento. En algunas realizaciones más preferidas, el tampón de elución comprende una concentración del 0,1 % de Tween 80. En algunas realizaciones incluso más preferidas, el método no comprende ningún paso posterior de concentración o intercambio de tampón, después de la elución de la resina con el tampón de almacenamiento. En algunas realizaciones preferidas, los agregados sorprendentemente se reducen en un 50 %.

En aún otra realización particularmente preferida más, se proporciona un método para inactivar contaminantes víricos en una muestra de proteína, comprendiendo el método: inmovilizar la proteína en una resina cromatográfica; y tratar la proteína inmovilizada con una mezcla de solvente y detergente que comprende el 1 % de Tritón X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de polisorbato 80, durante 30 minutos a 1 hora. En algunas de estas realizaciones, el método comprende además eluir la proteína con un tampón de almacenamiento que tiene un pH mayor que 7,0 y que comprende una concentración menor que 10 mM de iones calcio, un compuesto tamponante, el 0,05 % de detergente no iónico y una sal.

Estos y otros aspectos de la descripción se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa un diagrama de flujo de pasos ejemplares del método para purificar una desintegrina-metalopeptidasa recombinante con motivo de trombospondina tipo 1 13 (ADAMTS13) a partir de una muestra que comprende ADAMTS13 e impurezas no ADAMTS13, de acuerdo con la presente descripción. El orden de los pasos establecidos en la FIG. 1 puede reordenarse y/o pueden omitirse uno o más pasos, como se explica en este documento y como lo entenderá una persona experta en la materia.

Las FIGS. 2A-D representan variaciones en las ejecuciones de purificación en una columna de intercambio catiónico. La FIG. 2A representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución por pasos, seguida de la inactivación del virus; la FIG. 2B representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución por pasos, pero sin una inactivación del virus anterior; la FIG. 2C representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución en gradiente, seguida de la inactivación del virus en la columna cromatográfica; y la FIG. 2D representa un procedimiento que implica cromatografía de intercambio catiónico con elución en gradiente, pero sin una inactivación del virus anterior.

Descripción detallada

Un aspecto de la descripción se refiere a un método para la purificación de la proteína recombinante desintegrina A y metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1, 13 (ADAMTS13) a partir de una muestra, que también puede comprender impurezas no ADAMTS13. La muestra de proteína también puede incluir contaminantes víricos, que pueden eliminarse y/o inactivarse mediante uno o más pasos de inactivación vírica.

Como se usa en el presente documento, "proteína similar a la desintegrina A y metalopeptidasa con motivo 13 de trombospondina tipo 1", "ADAMTS13", "proteína ADAMTS13", "polipéptido ADAMTS13" y "ADAMTS13 recombinante" son intercambiables (a menos que se especifique lo contrario) y se refieren a una proteína ADAMTS13 de mamífero recombinante, que también puede ser un derivado o fragmento biológicamente activo de una proteína ADAMTS13 de longitud completa. La secuencia de aminoácidos de las proteínas ADAMTS13

humanas y murinas de longitud completa tienen los respectivos números de acceso UniProtKB® Q76LX8 y Q769J6. Los detalles estructurales y la información de la secuencia de la ADAMTS13 humana se pueden encontrar en Zheng et al. ((2001) J. Biol. Chem. 276:41059-63).

- 5 El término "derivado biológicamente activo o fragmento de este" como se usa en este documento significa cualquier polipéptido con una función biológica similar, o sustancialmente similar, a la de ADAMTS13. Las secuencias polipeptídicas de los derivados biológicamente activos o fragmentos de estos pueden comprender
- 10 delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tienen ningún impacto negativo sustancial en una o más actividades biológicas de la proteína ADAMTS13. Por ejemplo, el empalme alternativo da lugar a una especie de 130 kDa que es un
- 15 fragmento biológicamente activo de la proteína de longitud completa. La actividad biológica de dichos polipéptidos se puede medir mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, métodos que prueban la actividad proteolítica de ADAMTS13 sobre el factor von Willebrand (vWF) y/o la posterior reducción y/o retraso de los efectos posteriores. Por "efectos posteriores" se entiende una o más manifestaciones biológicas, bioquímicas o fisiológicas de la acción de la proteína ADAMTS13 sobre su(s) sustrato(s) natural(es), ya sea que el efecto sea una causa directa de la función de ADAMTS 13 o una causa indirecta de esta, por ejemplo, un efecto
- 20 resultante de una cascada de eventos posteriores a la actividad de ADAMTS13. Los ensayos incluyen, sin limitación, métodos que prueban la reducción y/o el retraso de la adhesión plaquetaria al endotelio, la reducción y/o el retraso de la agregación plaquetaria, la reducción y/o el retraso de la formación de cadenas plaquetarias, la reducción y/o el retraso de la formación de trombos, la reducción y/o el retraso del crecimiento de trombos, la reducción y/o el retraso de la oclusión vascular, la escisión proteolítica de vWF (por ejemplo, FRET5-VWF73 (Peptides International, Louisville, KY)), y/o la disgregación de trombos (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 7,270,976, titulada "Methods for measuring ADAMTS13 activity and protein on platelets and in plasma", col. 6, línea 55 a col. 10, línea 34, y col. 12, línea 1 a col. 18, línea 25 y 7,468,258, titulada "Self-quenching
- 25 homofluorophore compositions for detecting enzyme activity" col. 11, línea 26 a col. 16, línea 50; véase también la Publicación de Patente de EE. UU. n.º 20070015703, titulada "ADAMTS13-containing compositions having thrombolytic activity" en los párrafos [0036], [0043]-[0045], y [0053], y 20070065895, titulada "Substrates specific to von willebrand factor cleaving protease and method of assaying the activity"; y la Solicitud Europea n.º 1990421A1, titulada "Method for Detection of Condition in Consciousness Disorder Patient and Kit for the Detection", que se refieren a ensayos para polipéptidos ADAMTS13 y derivados y/o fragmentos de estos).

La ADAMTS13 recombinante, por ejemplo, la ADAMTS13 humana recombinante, se puede expresar mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se explica en WO 02/42441, que se refiere al

35 método de preparación de una secuencia de nucleótidos de ADAMTS 13 recombinante (véase la página 14, línea 6 a la página 18, línea 4). En algunas realizaciones, la ADAMTS 13 recombinante se produce según el siguiente procedimiento: (i) preparar una secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, mediante transcripción inversa de ARN y/o multiplicación de ADN; (ii) introducir la secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante en células eucariotas, por ejemplo, mediante transfección, como, por ejemplo, mediante electroporación o microinyección; (iii) cultivar las células transformadas, por ejemplo, de manera continua o por lotes; (iv) permitir la expresión de ADAMTS13 recombinante, por ejemplo, de manera constitutiva o tras inducción; y (v) aislar muestras que comprenden la ADAMTS13 recombinante expresada, por ejemplo, del medio de cultivo o mediante la recolección de las células transformadas; y (vi) purificar la proteína ADAMTS13 de la muestra, según los métodos explicados en este documento.

45 La ADAMTS13 recombinante se puede producir mediante expresión en un sistema huésped adecuado, preferiblemente un sistema huésped eucariota, y más preferiblemente un sistema caracterizado por que puede producir una molécula de ADAMTS13 farmacológicamente eficaz. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamíferos, como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2. En una realización preferida, se usan células CHO y las células secretan la proteína ADAMTS13 recombinante en el medio de cultivo. No existe ninguna limitación particular para los reactivos o las condiciones usados para expresar de forma recombinante ADAMTS13 y se puede emplear cualquier sistema conocido en la técnica o disponible comercialmente.

55 "Muestra" como se usa en este documento se refiere a cualquier composición que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son ADAMTS13. Un técnico experto reconocerá que la muestra tal como se usa en este documento puede ser el resultado de producir ADAMTS13 recombinante como se describió anteriormente. En consecuencia, la muestra puede comprender sobrenadante recolectado del cultivo de células transformadas, que expresan ADAMTS13 recombinante; tampones que comprenden ADAMTS13 en uno o más pasos de un procedimiento de purificación de la proteína ADAMTS13 recombinante del medio de cultivo; y/o células transformadas recolectadas del cultivo celular. Alternativamente, la muestra puede ser

60 sangre, plasma o una fracción de sangre o plasma.

En algunas realizaciones, ADAMTS13 se purifica a partir de una muestra que comprende 100 L de sobrenadante de cultivo celular. Sin embargo, un artesano experto reconocerá que los métodos de la invención pueden ampliarse según sea apropiado, por ejemplo, para producción a gran escala. En consecuencia, en

65

algunas realizaciones, el método comprende purificar la proteína ADAMTS13 a escala de producción comercial, *por ejemplo*, a partir de una muestra de al menos aproximadamente 250 L una muestra de al menos aproximadamente 500 L o una muestra de al menos aproximadamente 1000 L.

5 "Impurezas que no son ADAMTS13" como se usa en este documento generalmente se refiere a impurezas relacionadas con el procedimiento. Las impurezas pueden incluir, por ejemplo, impurezas de la célula huésped (como proteínas contaminantes de la célula huésped, también denominadas antígenos de la célula huésped) y otras impurezas biomoleculares como ADN, ARN y restos celulares; componentes del medio; solventes; detergentes; y similares. Adicionalmente, las impurezas que no son ADAMTS13 también incluyen impurezas
10 relacionadas con el producto, por ejemplo, derivados o fragmentos de la proteína ADAMTS13, que no son biológicamente activos, o agregados de la proteína ADAMTS13. En el caso de sangre o plasma, las impurezas que no son ADAMTS13 pueden incluir otras proteínas que normalmente se encuentran en la sangre o el plasma, por ejemplo, albúmina, inmunoglobulinas, etc. Como se usa en este documento, "agregados" se refiere a estructuras que comprenden más de una molécula de polipéptido ADAMTS13, o más de una de cualquier
15 otra molécula de proteína, que corresponde a estructuras de alto peso molecular o estructuras oligoméricas, como dímeros, trímeros y otros multímeros de la macromolécula. Las "impurezas que no son ADAMTS 13" también pueden incluir contaminantes de virus. "Contaminantes de virus" se refiere a cualquier impureza resultante y/o derivada de un virus, incluyendo, por ejemplo, partículas de virus, proteínas de virus, ADN vírico, ARN vírico o fragmentos de estos.

20 Los términos "purificante", "purificado", "purificar" y similares se refieren a eliminar, aislar o separar ADAMTS13 de impurezas que no son ADAMTS13. Por ejemplo, la proteína ADAMTS13 recombinante expresada en células huésped vegetales, bacterianas, de levadura o de mamíferos se puede purificar mediante la eliminación de impurezas que no sean ADAMTS13 que comprenden, por ejemplo, proteínas de células huésped. El porcentaje
25 de pureza puede referirse al porcentaje de proteína ADAMTS 13 frente a proteína de la célula huésped (por ejemplo, proteína CHO). La ADAMTS13 recombinante "sustancialmente purificada" está libre al menos aproximadamente en un 60 %, preferiblemente libre al menos aproximadamente en un 75 % y, más preferiblemente, libre al menos aproximadamente en un 90 % (o libre aproximadamente en un 95 %, aproximadamente en un 99 % o aproximadamente en un 99,9 %) de impurezas que no sean ADAMTS 13. En
30 particular, la ADAMTS13 recombinante "sustancialmente purificada" está libre al menos aproximadamente en un 60 %, preferiblemente libre al menos aproximadamente en un 75 % y, más preferiblemente, libre al menos aproximadamente en un 90 % (o libre aproximadamente en un 95 %, aproximadamente en un 99 % o aproximadamente en un 99,9 %) de las proteínas de la célula huésped. Las proteínas de la célula huésped se pueden detectar, por ejemplo, mediante métodos inmunoquímicos usando antisueros policlonales, como se
35 analiza con más detalle a continuación.

La eliminación de contaminantes también puede resultar en el enriquecimiento de la proteína ADAMTS13. "Enriquecimiento", "enriqueciendo" y "enriquecer" como se usan en este documento se refieren a un aumento
40 en el porcentaje de ADAMTS13 recombinante en la muestra. En consecuencia, el enriquecimiento de la proteína ADAMTS13 ocurre cuando el porcentaje de ADAMTS13 aumenta en una muestra después de alguna manipulación de la muestra, por ejemplo, sometiendo la muestra a uno o más pasos cromatográficos. En una realización, ADAMTS13 está suficientemente enriquecido cuando hay una reducción de al menos
45 aproximadamente 10 veces a aproximadamente 115 veces de impurezas que no son ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped. En una realización, ADAMTS13 está suficientemente enriquecida cuando hay una reducción de al menos aproximadamente 20 veces (por ejemplo, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60
50 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 80 veces, aproximadamente 90 veces, aproximadamente 100 veces, etc.) de impurezas que no son ADAMTS13 y, en particular, la reducción ocurre con respecto a las proteínas de la célula huésped.

Un técnico experto podrá usar los métodos disponibles en la técnica para determinar la reducción de impurezas que no son ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped. Por ejemplo, se puede utilizar un
55 ensayo para detectar impurezas que no sean ADAMTS13. En una realización, la muestra es sobrenadante acondicionado recolectado del cultivo de células transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante y en el ensayo para determinar la reducción de impurezas que no son ADAMTS13 se miden las concentraciones de proteínas de la célula huésped. En una realización particular, las células transformadas son células CHO transformadas, y el ensayo es un ensayo serológico inmunoabsorbente ligado a enzimas en que se miden las
60 proteínas CHO. La reducción de impurezas que no son ADAMTS13 se puede calcular, *por ejemplo*, como la cantidad de impurezas que no son ADAMTS13 en la muestra sobre la cantidad de impurezas que no son ADAMTS13 eluidas, como la concentración de impurezas en una carga (por ejemplo, en ppm) dividido por la concentración de impurezas en el eluato (por ejemplo, en ppm).

Las proteínas de la célula huésped se pueden detectar, *por ejemplo*, mediante métodos inmunoquímicos usando antisueros policlonales contra componentes proteicos de la célula huésped y/o el sistema de vector
65 recombinante usado para fabricar ADAMTS13. Generalmente, se pueden generar antisueros contra el antígeno derivado de la célula huésped, en donde la célula huésped comprende un vector de expresión que se usa en

- el procedimiento de fabricación, pero que carece del gen que codifica ADAMTS13. Las impurezas de la célula huésped se pueden extraer usando métodos idénticos y/o sustancialmente similares a los descritos en este documento. Los antígenos de células huésped purificados (o parcialmente purificados) obtenidos usando los métodos idénticos y/o sustancialmente similares a los descritos en este documento pueden luego usarse para la preparación de antisueros contra componentes proteicos de la célula huésped y el sistema de vector recombinante usado para fabricar ADAMTS13. Las proteínas de la célula huésped se pueden detectar usando antisueros en un inmunoensayo, por ejemplo, en un ELISA o mediante análisis Western blot. Las impurezas de las proteínas de la célula huésped también pueden detectarse separando la muestra que hay que analizar mediante electroforesis en gel 2D y tinción con plata y/o tinción con oro coloidal para detectar las proteínas presentes. La HPLC también se puede usar para cuantificar las concentraciones de impurezas de la célula huésped; sin embargo, los métodos de HPLC no son tan sensibles como los métodos de inmunoensayo o de tinción de plata. Preferiblemente, las impurezas de la célula huésped se reducen a concentraciones por debajo de las detectables usando, por ejemplo, uno o más de estos métodos analíticos.
- Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" denota un intervalo aproximado de más o menos el 10 % de un valor especificado.

Enriquecimiento de ADAMTS13

- En general, la descripción proporciona un método para purificar la proteína ADAMTS 13 recombinante (preferiblemente la proteína ADAMTS13 humana) a partir de una muestra que comprende proteína ADAMTS13 e impurezas que no son ADAMTS13, en donde el método comprende poner en contacto cromatográficamente la muestra con (i) hidroxapatita o (ii) hidroxapatita y una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto en tándem, de modo de enriquecer la cantidad de ADAMTS13 en la muestra. El término "contacto cromatográfico" usado en el presente documento se refiere a poner en contacto una muestra u otra mezcla que se va a separar con una resina cromatográfica usando cualquier modo de cromatografía descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica. Los modos incluyen, sin limitación, cromatografía en modo discontinuo y en columna. El contacto se efectúa exponiendo y/o incubando la muestra sobre la resina, dentro de la resina o en la resina, filtrando la muestra a través de la resina o por cualquier otro medio. El tampón usado para la cromatografía suele ser un tampón de fosfato.

- En algunas realizaciones, la muestra se pone en contacto cromatográficamente con hidroxapatita en condiciones que permiten que la proteína ADAMTS13 aparezca en el eluato de la hidroxapatita. Por "bajo condiciones" se hace referencia a uno o más parámetros o variables bajo los cuales se lleva a cabo la cromatografía, incluyendo, por ejemplo, altura de columna, relleno, tampón (pH, concentración de sal, fuerza iónica, etc.), temperatura, presión y similares. Esto es, la muestra se somete a cromatografía con hidroxapatita en condiciones que permiten que la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 en la muestra, no se una a la hidroxapatita. Si se usa cromatografía en columna, la proteína ADAMTS13, preferiblemente una porción sustancial de esta, fluirá a través de la columna, enriqueciéndose de este modo con ADAMTS13 en el tampón que sale de la columna, como fracción de flujo o eluato, mientras que las impurezas que no son ADAMTS13 quedan retenidas. Si se usa cromatografía por lotes, el sobrenadante o la fracción de sobrenadante comprenderá la proteína ADAMTS13, o una porción sustancial de esta. "Eluato" se usa aquí indistintamente con "flujo continuo", "fracción de flujo continuo", "sobrenadante" o "fracción de sobrenadante". Se puede recoger el eluido (o sobrenadante). Esta recolección se produce, por ejemplo, por centrifugación, sedimentación, filtración, etc. de la resina cromatográfica después de que la muestra se expone a la resina y se completa la incubación. El eluato (o sobrenadante) recogido de la hidroxapatita puede someterse además a uno o más pasos según la invención.

- En algunas realizaciones, por ejemplo, el método comprende además poner en contacto cromatográficamente el eluato de la hidroxapatita con una resina de modo mixto, tal como una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica, que se une a la proteína ADAMTS13. Esto es, la muestra de proteína ADAMTS13 puede someterse a una cromatografía en tándem, primero con hidroxapatita, preferiblemente en condiciones en las que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 no se una a la hidroxapatita, seguida de una cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13. A continuación, se proporcionan detalles adicionales sobre el paso de cromatografía de hidroxapatita y el paso en tándem opcional de cromatografía en modo mixto, usando una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico.

(a) Cromatografía de hidroxapatita

- El paso de cromatografía de hidroxapatita implica cualquier método de cromatografía con hidroxapatita, como se describe en este documento, como se conoce en la técnica, o como puede apreciar un experto en la técnica, especialmente a la luz de las explicaciones incluidas en este documento. Los métodos de cromatografía con hidroxapatita son bien conocidos en la técnica. La hidroxapatita tiene la fórmula química de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y es un componente principal de los minerales de los huesos y los dientes, así como de otras estructuras biológicas. La hidroxapatita puede obtenerse de fuentes naturales o puede sintetizarse mediante métodos bien

conocidos. La hidroxiapatita se usa ampliamente como medio o soporte cromatográfico, particularmente para separaciones cromatográficas de proteínas. El tamaño de partícula generalmente no es crítico y puede variar ampliamente. Los tamaños de partícula típicos son de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 1000 µm de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 100 µm de diámetro. La porosidad también puede variar ampliamente. En realizaciones preferidas, el diámetro de poro promedio es de aproximadamente 100 Å a aproximadamente 10 000 Å, de manera más preferible de aproximadamente 500 Å a aproximadamente 3000 Å, incluso más preferiblemente de 500 Å a 3000 Å.

Hay varios medios cromatográficos de hidroxiapatita disponibles comercialmente, y cualquier forma disponible del material se puede usar en la práctica de los métodos explicados en este documento. Los ejemplos no limitantes de material de hidroxiapatita cerámica disponible comercialmente que se pueden usar incluyen MACRO-PREP™, hidroxiapatita tipos I y II (Biorad, Hercules, CA) y HA ULTROGEL® (PALL, Ann Arbor, MI). En una realización, la muestra se somete a cromatografía con hidroxiapatita tipo II (Biorad, Hercules, CA).

Sorprendentemente, se descubrió que al poner en contacto cromatográficamente una muestra con hidroxiapatita, una porción significativa o sustancial de impurezas que no son ADAMTS13 en la muestra se unen a la hidroxiapatita, mientras que una porción significativa o sustancial de la proteína ADAMTS13 permanece en solución. En consecuencia, como se discutió anteriormente, el tratamiento de la muestra con hidroxiapatita se puede realizar en modo por lotes o en modo de cromatografía en columna según métodos bien conocidos, y la proteína ADAMTS 13 suficientemente enriquecida se puede recolectar en el sobrenadante o en el eluato, respectivamente.

Como se usa en este documento, "porción sustancial" se refiere a un rendimiento de recuperación en el sobrenadante o eluido de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 100 % (por ejemplo, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 90 %, por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 %, por ejemplo, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %) de proteína ADAMTS13 recombinante de la muestra en comparación con la anterior al paso de cromatografía de hidroxiapatita. Por ejemplo, un rendimiento de recuperación en el sobrenadante o eluido de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % indica que la muestra se sometió a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS 13 fluya a través de ella.

En realizaciones preferidas, la muestra que se va a someter a cromatografía de hidroxiapatita tiene una conductividad baja, por ejemplo, entre aproximadamente 3 mS/cm y aproximadamente 15 mS/cm a temperatura ambiente, preferiblemente menos de aproximadamente 10 mS/cm a temperatura ambiente. En una realización, la muestra tiene una conductividad de 6 mS/cm a temperatura ambiente. En otra realización, la muestra tiene una conductividad de 7 mS/cm a temperatura ambiente. Un técnico experto apreciará fácilmente que la conductividad de la muestra se puede ajustar con una solución salina que comprende sales neutras, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y similares, y se puede amortiguar adecuadamente con un tampón de fosfato de aproximadamente 20 mM. La muestra tiene preferiblemente un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,0, y preferiblemente, tiene un pH entre 7 y 8. La muestra puede permanecer en contacto con la hidroxiapatita durante cualquier período de tiempo que permita una unión suficiente de impurezas que no sean ADAMTS 13, por ejemplo, durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. La ADAMTS13 enriquecida se puede recolectar en la fracción sobrenadante o en la fracción de flujo continuo, que puede incluir eluato de lavados posteriores, particularmente el primer lavado.

En una realización, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluido da como resultado ADAMTS13 enriquecida, por ejemplo, una reducción de aproximadamente 10 veces a una reducción de aproximadamente 115 veces de impurezas que no son ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped, en comparación con la muestra antes de la cromatografía con hidroxiapatita. En una realización, la cromatografía con hidroxiapatita reduce las proteínas de la célula huésped en la muestra al menos aproximadamente 20 veces (por ejemplo, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 70 veces, aproximadamente 80 veces, aproximadamente 90 veces, por ejemplo, aproximadamente 100 veces, etc.).

En realizaciones preferidas, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluido da como resultado una eliminación de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 99 % de impurezas que no son ADAMTS13, particularmente proteínas de la célula huésped. En una realización, someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita da como resultado una eliminación de al menos aproximadamente el 90 % (por ejemplo, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, aproximadamente el 99,5 %, etc.) de impurezas que no son ADAMTS 13, particularmente la eliminación de proteínas de la célula huésped. En consecuencia, los métodos explicados en este documento que comprenden el enriquecimiento de la proteína ADAMTS13

sometiendo la muestra a cromatografía con hidroxapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 permanezca en el sobrenadante o eluido también pueden proporcionar un tampón que comprende la proteína ADAMTS13 que está sustancialmente purificada.

- 5 En los ejemplos a continuación se proporcionan condiciones de columna ejemplares que permiten que una porción sustancial de ADAMTS13 fluya a través de una columna cromatográfica de hidroxapatita. Generalmente, para permitir que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 fluya durante la cromatografía con hidroxapatita, la columna cromatográfica preferiblemente tendrá una altura de lecho de aproximadamente 5 cm a aproximadamente 30 cm, por ejemplo, de 20 cm a 30 cm. Adicionalmente, antes de someter la muestra a cromatografía con hidroxapatita, por ejemplo, antes de cargar la muestra en la columna de hidroxapatita, la columna puede primero lavarse, activarse y/o equilibrarse respectivamente con tampones de lavado, activación y/o equilibrio bien conocidos, particularmente aquellos sugeridos por el fabricante de la hidroxapatita. En una realización, la columna se activa y se equilibra con el mismo tampón, por ejemplo, un tampón que comprende 20 mM de Na/KPO₄, que tiene un pH de 7,0 y que tiene una conductividad de 5,5 mS/cm a temperatura ambiente.

(b) Cromatografía de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica en modo mixto

- 20 En una realización, la proteína ADAMTS13 se enriquece mediante cromatografía en tándem con la hidroxapatita seguida de una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS 13. Se ha descubierto sorprendentemente que ADAMTS 13 se une a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto, mientras que las impurezas que no son ADAMTS 13 permanecen en solución o se unen mucho más fuertemente a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto. En consecuencia, el tratamiento de la muestra con hidroxapatita seguido de un tratamiento con una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico en modo mixto se puede realizar en modo por lotes sucesivos o en modo de cromatografía en columna sucesiva según métodos bien conocidos y la proteína ADAMTS 13 suficientemente enriquecida se puede recolectar en la fracción de sobrenadante final o en la agrupación de eluato final después de someter la muestra a cromatografía en modo por lotes en tándem o cromatografía en columna en tándem, respectivamente. En consecuencia, como se describe en este documento, la proteína ADAMTS13 se enriquece sometiendo la muestra a cromatografía con hidroxapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS 13 permanezca en el sobrenadante o fluya a través de una columna que comprende hidroxapatita como eluato. Después del tratamiento con hidroxapatita, el sobrenadante o eluato recolectado que comprende ADAMTS13 enriquecido se somete opcionalmente a cromatografía en modo por lotes o en columna con una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. En una realización, el sobrenadante o eluido del paso de hidroxapatita se alimenta a una columna cromatográfica que comprende la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. La cromatografía en modo por lotes o en columna con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica en modo mixto se puede llevar a cabo mediante cualquier método descrito en este documento, conocido en la técnica, o como lo pueda apreciar un experto en la técnica, especialmente a la luz de las explicaciones incluidas en este documento. Una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto preferida, adecuada para su uso después de la cromatografía con hidroxapatita, es una matriz a base de sefarsa que comprende un ligador hidrófilo. El ligador hidrófilo puede comprender un ligando funcional, por ejemplo, a través de un grupo tioéter. El ligando hidrófilo puede estar cargado negativamente y puede comprender además un grupo hidrófobo, por ejemplo, un hidrocarburo. Un ligando hidrófilo que comprende además un grupo hidrófobo puede crear un ligando de modo mixto, esto es, un ligando con funcionalidad multimodal, adecuado para realizar cromatografía de modo mixto, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la capacidad iónica de la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto puede estar entre aproximadamente 0,07 mM/mL y aproximadamente 0,09 mM/mL y tener una estabilidad de pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 14. Generalmente, ADAMTS13 se unirá a la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto a través de enlaces iónicos, de hidrógeno y/o hidrófobos.

- Ejemplos de resinas de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto disponibles comercialmente que pueden utilizarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, el medio CAPTO™ MMC (GE Healthcare) y SampliQ SAX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). En una realización preferida, la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto es CAPTO™ MMC. CAPTO™ MMC es un intercambiador de cationes débiles multimodal a base de agarosa rígida, altamente reticulada y en forma de perlas con un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 75 µm. Comprende ligandos con funcionalidad multimodal que se unen a proteínas en altas concentraciones de sal. Tiene una velocidad de flujo típica de aproximadamente 600 cm/h para una columna de aproximadamente 1 m de diámetro, con una altura de lecho de aproximadamente 10 cm a aproximadamente 20 cm a aproximadamente 20 °C, usando tampones de procedimiento con aproximadamente esta viscosidad que el agua a menos de aproximadamente 3 bar (aproximadamente 0,3 MPa).

- 65 Durante la cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto, ADAMTS13 se une a la resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto y se aísla aún

más de impurezas que no son ADAMTS13 (por ejemplo, proteínas de células huésped presentes en el enriquecimiento previo de la muestra). Cuando el paso de cromatografía en modo mixto se realiza en una columna, la resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica absorbe la proteína ADAMTS 13, mientras que las impurezas contaminantes que no son ADAMTS 13 se eliminan de la corriente de procedimiento y se separan de la proteína ADAMTS 13 en la muestra al fluir a través de la columna cromatográfica.

Luego, la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto a la que se adsorbe ADAMTS13 se lava, por ejemplo, para eliminar contaminantes o impurezas débilmente unidos y/o para ajustar la conductividad del tampón en preparación para la elución de ADAMTS13 de la resina. Esto es, después de que la muestra se ponga en contacto cromatográficamente con hidroxiapatita, y el sobrenadante o eluato recolectado que comprende ADAMTS13 se ponga en contacto cromatográficamente con resina de interacción catiónica/hidrofóbica de modo mixto y se adsorba en esta, la resina de interacción catiónica/hidrofóbica de modo mixto se lava con tampón de lavado. Generalmente, el tampón de lavado comprenderá un ion de tampón fosfato y una sal neutra y tendrá un pH alto de modo que la unión de ADAMTS13 a la resina de interacción catiónica/hidrofóbica de modo mixto se debilita a medida que aumentan los parámetros relevantes del tampón, por ejemplo, con el aumento de la concentración de sal y/o el pH del tampón. En una realización, la resina de interacción catiónica/hidrofóbica de modo mixto unida a ADAMTS13 se lava primero con un tampón de equilibrio, por ejemplo, un tampón de equilibrio que comprende fosfato aproximadamente 20 mM y NaCl aproximadamente 25 mM y que tiene un pH de aproximadamente 7,0 a temperatura ambiente. Los lavados posteriores pueden realizarse con un tampón de lavado que comprende, por ejemplo, fosfato aproximadamente 20 mM, NaCl aproximadamente 80 mM y que tiene un pH de aproximadamente 8,0 a temperatura ambiente. La resina de interacción catiónica/hidrofóbica de modo mixto unida a ADAMTS13 puede someterse a un lavado final con un tampón que comprende, por ejemplo, NaK PO₄ 50 mM y NaCl 160 mM, y que tiene un pH de 8,0 y una conductividad de 16,5 mS/cm a temperatura ambiente.

Después de la cromatografía de hidroxiapatita, seguida de una cromatografía en modo mixto con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica que se une a la proteína ADAMTS13, y un lavado opcional, la proteína ADAMTS13 recombinante se eluye de la resina de cromatografía en modo mixto con un tampón de elución. Generalmente, el tampón de elución comprenderá una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM de iones de tampón, *por ejemplo, de 20 mM a 50 mM de iones de tampón*. Los tampones ejemplares incluyen, entre otros, fosfato, tris, HEPES, imidazol, histidina, MES, citrato, Gly-Gly, tris/acetato y similares. El tampón de elución también comprende generalmente cationes monovalentes o divalentes, tales como, entre otros, iones sodio, potasio o calcio, preferiblemente en altas concentraciones en forma de sal (por ejemplo, con aniones Cl, PO₄, SO₄ o OAc, y similares). En una realización preferida, el tampón de elución comprende iones sodio en alta concentración, por ejemplo, a más de aproximadamente 700 mM de Na⁺. El tampón de elución puede tener un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11. En una realización, el tampón de elución comprende Na/KPO₄ 50 mM, NaCl 1000 mM y tiene un pH de 8,0 y una conductividad de 93 mS/cm a temperatura ambiente.

En los ejemplos a continuación se proporcionan condiciones ejemplares que permiten que la ADAMTS13 enriquecida obtenida a partir de una columna de hidroxiapatita se una a una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto en una columna y se aisle de impurezas que no sean ADAMTS13. Generalmente, la altura del lecho de la columna cromatográfica hidrofóbica/de intercambio catiónico en modo mixto puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 100 cm, o incluso mayor dependiendo del volumen de la muestra. Además, la relación entre el volumen de la columna cromatográfica de hidroxiapatita y el volumen de la columna cromatográfica de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico en modo mixto puede ser de aproximadamente 10:1, dependiendo, por ejemplo, de las cantidades de impurezas que no sean ADAMTS13 en la muestra en comparación con la cantidad de ADAMTS 13.

Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que, para realizaciones que comprenden cromatografía en tándem con hidroxiapatita y una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto, las resinas y los tampones usados para el lavado, la activación y/o el equilibrio se seleccionarán en ciertas realizaciones para que sean compatibles con ambas columnas. En una realización, las columnas se activan por separado. En otra realización, las columnas se equilibran, se cargan y se lavan una vez en tándem, seguido de uno o más segundos lavados y eluciones posteriores aplicados solo a la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. En una realización, los tampones para activar y equilibrar la columna cromatográfica de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto son los mismos que los usados para activar y equilibrar la columna de hidroxiapatita. En una realización, el tampón para activar y equilibrar la columna cromatográfica de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico en modo mixto es un tampón que comprende Na/KPO₄ 20 mM y que tiene un pH de 7,0 y una conductividad de 5,5 mS/cm a temperatura ambiente.

En realizaciones preferidas, la muestra se somete a cromatografía en tándem con hidroxiapatita y resinas de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 fluya a través de la resina de hidroxiapatita, seguido de su unión y luego elución de la resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto. En realizaciones más

preferidas, esta cromatografía en tándem da como resultado ADAMTS13 suficientemente enriquecido. En algunas realizaciones, someter una muestra, por ejemplo, sobrenadante acondicionado recolectado del cultivo de células huésped transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que puede estar preenriquecido, a la cromatografía en tándem descrita en este documento produce aproximadamente entre un 40 % y aproximadamente un 80 % de ADAMTS13 (por ejemplo, entre aproximadamente un 45 % y aproximadamente un 75 %, por ejemplo, entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 70 %, por ejemplo, entre aproximadamente un 55 % y aproximadamente un 65 %) y/o entre aproximadamente un 40 % y aproximadamente un 90 % de actividad (por ejemplo, entre aproximadamente un 45 % y aproximadamente un 85 %, por ejemplo, entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 80 %, por ejemplo, entre aproximadamente un 55 % y aproximadamente un 75 %).

En algunas realizaciones, la cromatografía en tándem elimina entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 % de las impurezas de las células huésped. En una realización, la cromatografía en tándem como se describe en este documento aumenta la pureza de ADAMTS 13 en al menos aproximadamente 600 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 650 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 700 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 800 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 900 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1100 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1200 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1300 veces, por ejemplo, en al menos aproximadamente 1400 veces, o en al menos aproximadamente 1500 veces en comparación con la pureza de ADAMTS13 antes de someter la muestra a cromatografía en tándem.

En algunas realizaciones, someter una muestra, por ejemplo, sobrenadante acondicionado recolectado del cultivo de células huésped transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que puede estar preenriquecido, preferiblemente por UF/DF y/o intercambio aniónico, a la cromatografía en tándem descrita en este documento da como resultado una muestra con aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 1500 ppm de impurezas que no son ADAMTS13 (por ejemplo, antígenos de células huésped). Por ejemplo, la cromatografía en tándem puede dar como resultado una muestra con aproximadamente 750 ppm a aproximadamente 1250 ppm de impurezas que no son ADAMTS13, preferiblemente una muestra con menos de aproximadamente 1000 ppm de impurezas que no son ADAMTS13.

En algunas realizaciones, la cromatografía en tándem da como resultado una reducción de aproximadamente 1000 veces a una reducción de aproximadamente 3000 veces de impurezas que no son ADAMTS13 (en particular, antígenos de células huésped) en comparación con la muestra antes de la cromatografía en tándem. En algunas realizaciones, someter el sobrenadante acondicionado recolectado del cultivo de células hospedadoras transformadas que expresan ADAMTS13 recombinante, que puede estar preenriquecido, a la cromatografía en tándem descrita en este documento reduce las impurezas que no son ADAMTS13 (por ejemplo, antígenos de células hospedadoras) en al menos aproximadamente 1000 veces, *por ejemplo*, en al menos aproximadamente 1300 veces, *por ejemplo*, en al menos aproximadamente 1500 veces, *por ejemplo*, en al menos aproximadamente 2000 veces, *por ejemplo*, en al menos aproximadamente 2500 veces, *por ejemplo*, en al menos aproximadamente 3000 veces, etc.

En consecuencia, en realizaciones preferidas, el tampón de elución de la resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto, que comprende ADAMTS13 recombinante, proporciona una composición que comprende proteína ADAMTS13 que está sustancialmente purificada.

Preparación de la muestra preenriquecimiento

En algunas realizaciones, el método divulgado en este documento comprende además preparar la muestra que comprende ADAMTS 13 para enriquecimiento por cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita y resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. En este paso de preenriquecimiento opcional, la ADAMTS13 en la muestra puede ser (a) concentrado por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF); y/o (b) puesto en contacto cromatográficamente con una resina de intercambio iónico, a la que se une la ADAMTS13 y de la que posteriormente se eluye.

(a) Ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento (UF/DF)

En un paso de preenriquecimiento opcional, la ADAMTS 13 en una muestra se concentra mediante ultrafiltración de preenriquecimiento y el tampón de la muestra se intercambia mediante diafiltración. El paso de ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento típicamente se realiza antes del enriquecimiento de ADAMTS13 mediante cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida de una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto como se describió anteriormente. El paso de ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento típicamente se realiza antes de cualquier cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento (si se realiza). Este paso de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) de preenriquecimiento puede ser eficaz para eliminar componentes de pequeño peso molecular, por ejemplo, componentes de pequeño peso molecular del medio de cultivo celular.

Dichos componentes pueden unirse a una columna cromatográfica posterior y disminuir la capacidad de la columna para ADAMTS13. En consecuencia, la UF/DF preenriquecimiento puede optimizar la carga para los pasos de cromatografía posteriores. En una realización, se eliminan los componentes de peso molecular pequeño por debajo de aproximadamente 30 kDa, o al menos una porción sustancial de estos. En algunas realizaciones, los componentes de peso molecular pequeño eliminados (o sustancialmente eliminados) son componentes menor que aproximadamente 60 kDa, menos de aproximadamente 55 kDa, menos de aproximadamente 50 kDa, menos de aproximadamente 45 kDa, menos de aproximadamente 40 kDa, menos de aproximadamente 35 kDa, menos de aproximadamente 30 kDa, menos de aproximadamente 25 kDa, menos de aproximadamente 20 kDa, etc.

El paso de ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento también se usa en ciertas realizaciones para intercambiar ADAMTS13 en una solución tampón apropiada para el procesamiento posterior y/o para concentrar aún más la muestra. En una realización, la solución tampón apropiada es un tampón de baja conductividad apropiado para la cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento, si se va a realizar dicha cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, el tampón de baja conductividad tendrá una conductividad menor que aproximadamente 10 mS/cm, por ejemplo, aproximadamente 7 mS/cm a aproximadamente 8 mS/cm, por ejemplo, 7 mS/cm a temperatura ambiente, y puede tener un pH mayor o igual que aproximadamente 7,0.

En otra realización, la solución tampón apropiada es un tampón de enriquecimiento apropiado para el enriquecimiento por cromatografía con hidroxiapatita, que puede ir seguido de cromatografía en una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. Por ejemplo, el tampón de enriquecimiento puede comprender 20 mM de Na/KPO₄ y tener un pH de aproximadamente 7 a temperatura ambiente. En otra realización, la solución tampón apropiada también comprende iones calcio y/o zinc, cualquiera de los cuales o ambos estabilizan la proteína ADAMTS13. En una realización, la solución tampón apropiada comprende iones calcio en una concentración menor que aproximadamente 10 mM, por ejemplo, 2 mM. En otra realización, la solución tampón apropiada se complementa con iones zinc a una concentración menor que aproximadamente 50 µM, por ejemplo, 5 µM.

En algunas realizaciones, la solución tampón apropiada comprende un agente tamponante que tiene capacidad tamponadora en soluciones con un pH mayor o igual que aproximadamente 7,0. En una realización, el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en fosfato, tris, HEPES, imidazol, histidina, MES, citrato, Gly-Gly, Tris/acetato, etc.

La muestra obtenida después de este paso de preenriquecimiento UF/DF se puede usar en pasos de purificación posteriores, *por ejemplo*, la muestra puede ser un conjunto concentrado de UF/DF que comprende proteínas de células huésped que se eliminarán mediante cromatografía con hidroxiapatita, o cromatografía de hidroxiapatita seguida de cromatografía en modo mixto en una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica. En algunas realizaciones, la muestra después del paso de UF/DF de preenriquecimiento se ha concentrado entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 veces, por ejemplo, aproximadamente 15 veces, en comparación con la muestra antes del paso de UF/DF de preenriquecimiento.

(b) Cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento

Otro paso de preenriquecimiento opcional comprende una cromatografía de preenriquecimiento, que puede realizarse antes del enriquecimiento de AD AMTS 13 mediante cromatografía con hidroxiapatita o cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida de una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto. Un artesano experto reconocerá que la cromatografía de preenriquecimiento se puede realizar después del paso opcional de ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento. Alternativamente, la cromatografía de preenriquecimiento se puede realizar por sí sola, es decir, sin el paso opcional de ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento.

En algunas realizaciones, el paso de cromatografía de preenriquecimiento comprende poner en contacto cromatográficamente la muestra que comprende ADAMTS13 con una resina de intercambio aniónico y eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio aniónico. Esto es, la ADAMTS 13 se une a una resina de intercambio aniónico y posteriormente se eluye de esta. Tal como se usa en este documento, el término "resina de intercambio aniónico" se refiere a cualquier resina adecuada para cromatografía de intercambio aniónico y que tiene una carga neta positiva, por ejemplo, debido a un grupo cargado positivamente (a pH neutro). Los ejemplos incluyen, entre otros, dietilaminoetano (DEAE), dimetiletanolamina (DMAE), polietilenoimina (PEI), aminoetano cuaternario (QAE), trimetilaminoetilo (TMAE), amonio cuaternario (Q) y similares, y combinaciones de estos.

En una realización, la resina de intercambio aniónico también tiene una o más de las siguientes características: poros grandes, comportamiento de flujo de perfusión y comportamiento de flujo convectivo. Los ejemplos no limitantes de resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente que se pueden usar en el paso de preenriquecimiento explicado en este documento incluyen Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare,

Piscataway, NJ), ANX-Sepharose Fast Flow low sub (GE Healthcare), DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), DEAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC, Grove City, OH), QAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC), POROS® Q (Applied Biosystems, Foster City, CA), POROS® 50D (Applied Biosystems), POROS® 50PI (Applied Biosystems), Convective Interaction Media (CIM®; BIA Separation), Fractogel-DMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Fractogel EMD-TMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Matrex Cellufine DEAE (Chisso Corp., Rye, NY) y similares.

Durante la cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento, ADAMTS13 se une a la resina de intercambio aniónico y se aísla de impurezas que no son ADAMTS13 (por ejemplo, componentes de la célula huésped que pueden estar presentes en la agrupación concentrada de UF/DF de preenriquecimiento). Generalmente, la resina de intercambio aniónico absorbe la proteína ADAMTS13, mientras que las impurezas que no son ADAMTS13 con puntos isoeléctricos mayores que el pH operativo se eliminan de la corriente de procedimiento al fluir a través de la columna de intercambio aniónico. Las impurezas que no son ADAMTS13 con puntos isoeléctricos por debajo del pH operativo se unen más fuertemente, preferiblemente mucho más fuertemente, a la resina, de modo que preferiblemente no coeluyen con la proteína ADAMTS 13. Luego, la columna en la que se adsorbe ADAMTS13 se lava antes de la elución, por ejemplo, para eliminar impurezas o contaminantes débilmente unidos y/o para ajustar la conductividad del tampón en preparación para la elución. Típicamente, la ADAMTS13 unida se eluye de la resina de intercambio aniónico aumentando la fuerza iónica del tampón. En una realización, ADAMTS 13 se eluye mediante elución por pasos. Generalmente, la muestra cargada y el tampón de lavado tienen un pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, por ejemplo, 7,7, y una conductividad menor que aproximadamente 10 mS/cm (por ejemplo, 6,5 mS/cm) a temperatura ambiente. Los tampones de elución pueden tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 (por ejemplo, 7) y tener una conductividad mayor que aproximadamente 10 mS/cm (por ejemplo, 16,5 mS/cm) a temperatura ambiente.

Típicamente, el eluato del paso de cromatografía de intercambio aniónico produce entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 120 % de actividad de ADAMTS13 (por ejemplo, produce entre aproximadamente un 70 % o entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 107 % de actividad de ADAMTS) y/o comprende ADAMTS 13 recombinante con una pureza de entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 70 % (por ejemplo, una pureza de entre aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, etc.). En una realización, la cromatografía de intercambio aniónico reduce las impurezas que no son ADAMTS13 entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 veces. En una realización preferida, el rendimiento porcentual después de la preparación preenriquecimiento puede ser de aproximadamente el 75 %.

La ADAMTS13 eluida puede luego enriquecerse sometiendo la muestra a una cromatografía con hidroxiapatita que permite que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 fluya a través de ella o sometiendo la muestra a una cromatografía en tándem con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS13 fluya a través de ella, seguido de una cromatografía con una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS 13, como se describió anteriormente.

Inactivación del virus

Un experto en la técnica reconocerá que los métodos de inactivación de virus pueden ser particularmente útiles para purificar ADAMTS13 recombinante a partir de muestras que comprenden o potencialmente comprenden contaminantes de virus (impurezas resultantes de virus y/o derivadas de virus, incluyendo, por ejemplo, partículas víricas, proteínas víricas, ADN vírico, ARN vírico y fragmentos de estos). En consecuencia, en una realización, el método explicado en este documento comprende además al menos un paso de inactivación del virus. El término "inactivación del virus" se refiere a una o ambas situaciones en donde los virus se mantienen en la solución, pero se desactivan o inactivan (por ejemplo, se vuelven no viables, por ejemplo, al disolver la capa lipídica de los virus con envoltura lipídica); y a la eliminación física de los virus y/o contaminantes de los virus de la muestra (por ejemplo, por exclusión de tamaño). Así, en el contexto de la presente explicación, "inactivación del virus" se refiere a la desactivación vírica o a la eliminación vírica, o a ambas.

Si se realiza, la inactivación del virus puede ocurrir una vez o más durante todo el procedimiento de purificación. Adicionalmente, puede ocurrir antes o después de someter la muestra a cromatografía con hidroxiapatita. En algunas realizaciones, la inactivación del virus ocurre antes y después del paso opcional de pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, que se describe con más detalle a continuación. Sin embargo, un técnico experto reconocerá que la inactivación del virus puede ocurrir opcionalmente, si es que ocurre, en cualquier paso durante el procedimiento de purificación. Además, un artesano experto puede reconocer el momento adecuado para la inactivación del virus.

Los métodos para hacer que los virus con envoltura lipídica no sean viables son bien conocidos en la técnica. En general, los métodos para desactivar (o inactivar) virus con envoltura lipídica en una muestra comprenden añadir una mezcla de solvente y detergente a la muestra (ver, por ejemplo, Edwards, et al. (1987) "Tratamiento

con fosfato de tri(n-butilo)/detergente de derivados sanguíneos terapéuticos y experimentales autorizados" Vox Sang 52: 53-59 (ver especialmente las páginas 54-55); y Patentes de EE. UU. n.º 4,540,573 (col. 7, línea 9 a col. 12, línea 42); 4,764,369 (col. 7, línea 17 a col. 12, línea 47); 4,939,176 (col. 3, línea 59 a col. 10, línea 14); 5,151,499 (col. 2, línea 59 a la columna 11, línea 38); 6,090,599 (col. 4, línea 20 a la columna 8, línea 67); 6,468,733 (col. 5, línea 12 a la columna 9, línea 36); y 6,881,573 (col. 5, línea 63 a la columna 14, línea 9). La combinación de solvente y detergente usada para desactivar virus recubiertos de lípidos puede ser cualquier combinación de solvente y detergente conocida en la técnica y preferiblemente comprende un detergente no iónico y un solvente orgánico. Los ejemplos no limitantes incluyen fosfato de tri-N-butilo (TnBP) y TRITÓN X-100™, así como TWEEN 80™ (CAS 9005-65-6), monooleato de sorbitán polioxietileno, colato de sodio y similares. La concentración del(los) solvente (s) y/o detergente(s) puede ser aquella comúnmente usada en la técnica, por ejemplo, mayor que aproximadamente el 0,1 % de TnBP y mayor que aproximadamente el 0,1 % de TRITÓN X-100™.

En algunas realizaciones, las condiciones bajo las cuales la mezcla de solvente y detergente inactiva los virus comprenden de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL de solvente y detergente, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 37 °C, preferiblemente de aproximadamente 12 °C a aproximadamente 25 °C, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas, de manera preferible de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora. En algunas realizaciones, la mezcla se agita o revuelve ligeramente durante el tratamiento. En una realización, el paso de inactivación del virus comprende añadir una mezcla de solvente y detergente (por ejemplo, una mezcla de solvente y detergente que comprende el 0,3 % de TnBP, el 1 % de TRITÓN X-100™ y el 0,3 % de TWEEN 80™) a la muestra durante al menos 1 hora, a una temperatura de 15 °C a 25 °C. En otra realización, la muestra se trata con una mezcla de solvente y detergente que comprende el 0,3 % de TnBP, el 1 % de TRITÓN X-100™ y el 0,3 % de TWEEN 80™ durante 30 minutos a una temperatura de 12 °C a 16 °C. Se pueden usar otras combinaciones de solventes y detergentes y/o condiciones adecuadas, como será evidente para una persona versada en la materia, tales como combinaciones de polisorbato o colato y fosfato de tri-n-butilo. Estas combinaciones pueden requerir tiempos de tratamiento más prolongados, por ejemplo, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas o más.

La inactivación se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la inactivación se puede detener mediante dilución, preferiblemente mediante dilución con un tampón de dilución frío. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la inactivación se detiene mediante dilución con un volumen de tampón de dilución frío que comprende MES aproximadamente 20 mM y que tiene un pH de aproximadamente 6 a temperatura ambiente.

Después de desactivar los virus recubiertos de lípidos con la combinación de solvente y detergente, la mezcla de solvente y detergente puede eliminarse. Por ejemplo, la mezcla de solvente y detergente puede eliminarse mediante cromatografía u otros medios adecuados. En algunas realizaciones, se usa cromatografía con una resina de eliminación de solvente y detergente (ESD), como, por ejemplo, la resina HyperD™ (Biosepra Inc., MA) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n.º 6,468,733 (col. 5, línea 12 a col. 9, línea 36)).

Inactivación de contaminantes de virus con proteína inmovilizada

En algunas realizaciones, la inactivación del virus comprende la desactivación vírica con solvente y detergente mientras la proteína está inmovilizada. Dicho procedimiento puede usarse en la inactivación vírica del polipéptido ADAMTS13 descrita en este documento, así como para otras proteínas. Otras proteínas pueden incluir, sin limitación, cualquier proteína o producto biológico de una fuente que pueda tener contaminantes víricos, incluyendo proteínas del sistema inmunológico (anticuerpos, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, fusiones Fc, antígenos principales de histocompatibilidad, receptor de células T), enzimas (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas), proteínas estructurales, proteínas fibrosas (tales como proteínas citoesqueléticas, como actina, Arp2/3, coronina, distrofina, queratina, miosina, espectrina, proteína Tau, tubulina y proteínas de la matriz extracelular, como colágeno, elastina, F-espondina), proteínas globulares, proteínas plasmáticas (albúmina sérica y componente P amiloide sérico), factores de coagulación (como proteínas del complemento, factor VIII, factor XIII, fibrina, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de proteasa relacionado con la proteína Z, trombina, factor von Willebrand), proteína C reactiva, hemoproteínas, proteínas de adhesión celular (cadherina, ependimina, integrina, NCAM, selectina), proteínas de transporte transmembrana (CFTR, glicoforina D, scramblasa), canales iónicos (canal de potasio del receptor de acetilcolina), proteínas synport/antipor (transportador de glucosa), hormonas y factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, oxitocina), receptores (receptores transmembrana, receptor acoplado a proteína G, rodopsina, receptores intracelulares como el receptor de estrógeno), proteínas de unión al ADN (histonas), proteínas de regulación de la transcripción (c-myc, FOXF2, FOXF3, MyoD, p53), proteínas de almacenamiento/transporte de nutrientes (ferritina), proteínas chaperonas, complejos macromoleculares (nucleosoma, ribonucleoproteína, partícula de reconocimiento de señales, espliceosoma) y similares. En realizaciones preferidas, la proteína es una proteína recombinante, en particular proteínas sensibles a la agregación cuando se exponen a disolventes orgánicos y detergentes. En algunas realizaciones, la proteína es la proteína ADAMTS13, en particular ADAMTS13 recombinante, o una

proteína diferente (en particular, una proteína recombinante diferente). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un factor de coagulación sanguínea. En algunas realizaciones, la proteína es, por ejemplo, uno o más de los siguientes: factor VIII, factor II, trombina, factor VIIa, factor IX, factor de von Willebrand, anticuerpos anti-MIF y, en particular, proteínas susceptibles de purificación cromatográfica y/o proteínas sensibles al tratamiento con solvente y detergente. En consecuencia, otro aspecto de la presente descripción está dirigido a la inactivación vírica de una proteína inmovilizada. Preferiblemente, la inactivación del virus se lleva a cabo junto con un procedimiento de purificación de proteínas, de modo que el procedimiento implica la inactivación del virus de una preparación de proteína mediante la inmovilización de la proteína que se está purificando.

El paso convencional de inactivación de virus con solvente y detergente aplicado en procedimientos posteriores para purificar varias proteínas, tales como los descritos anteriormente, generalmente implica añadir la mezcla de solvente y detergente en solución a la muestra que se está purificando, por ejemplo, en un procedimiento por lotes. En el procedimiento por lotes, una muestra que comprende la proteína se trata con la mezcla de solvente y detergente (por ejemplo, una mezcla que comprende aproximadamente el 1 % de TRITÓN X-100, aproximadamente el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y aproximadamente el 0,3 % de polisorbato 80) en un recipiente agitado (por ejemplo, un tanque para purificaciones a gran escala). Después de la disolución de los productos químicos solventes y detergentes, la solución de muestra tratada se puede bombear a un segundo recipiente removido, donde, por definición, tiene lugar la inactivación real del virus, ya que aquí la solución de proteína se incuba para permitir que tenga lugar dicha desactivación (por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora).

Por el contrario, algunas realizaciones de la presente descripción implican la inactivación del virus de una composición que comprende una proteína, por ejemplo, una proteína que se purifica, donde la proteína está inmovilizada. El procedimiento comprende poner en contacto la composición que comprende la proteína de interés con una mezcla de solvente y detergente mientras la proteína está inmovilizada, en lugar de que la proteína objetivo esté en solución. En realizaciones preferidas, la proteína está inmovilizada en una resina cromatográfica. La inactivación del virus en la que la proteína se inmoviliza en una resina cromatográfica, por ejemplo, en una columna cromatográfica, se denomina en este documento inactivación del virus "en columna". La purificación de ADAMTS13 en Poros S, descrita en los ejemplos a continuación, proporciona una realización de este procedimiento, donde la inactivación del virus se lleva a cabo en columna. Un experto en la materia reconocerá que la proteína puede inmovilizarse sobre diversos soportes, mediante una variedad de medios. Por ejemplo, la proteína puede unirse a cualquier soporte sólido o semisólido, incluidos portaobjetos de vidrio, perlas, matrices o membranas. La inmovilización puede resultar de cualquier procedimiento mediante el cual la proteína se fija al soporte en relación con otros componentes de la solución de proteína. La inmovilización puede ocurrir debido a uno o más tipos de enlaces entre los grupos en el soporte y los grupos en la proteína, tales como, *por ejemplo*, mediante ligadura covalente, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y similares, o combinaciones de estos.

La inactivación del virus de la proteína inmovilizada en una columna cromatográfica puede simplificar la purificación. Por ejemplo, en lugar de requerir más de un recipiente (como un sistema de dos tanques usado en purificaciones a gran escala), la purificación cromatográfica y la inactivación del virus se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente, *por ejemplo*, en esta columna cromatográfica. Esto simplifica los procedimientos posteriores de purificación de proteínas, *por ejemplo*, reduciendo el tiempo, conservando reactivos y/o aumentando la eficiencia. En algunas realizaciones, la columna cromatográfica es una resina de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, la columna cromatográfica es una resina de intercambio aniónico.

Un beneficio adicional y sorprendente de ciertas realizaciones de inactivación de virus de proteína inmovilizada es la reducción en la formación de agregados. Algunas proteínas muestran sensibilidad hacia las mezclas de solventes y detergentes, *por ejemplo*, formando agregados cuando entran en contacto con los reactivos solventes y detergentes en solución. Sin limitarse a una teoría o hipótesis en particular, el contacto de la proteína sensible con la mezcla de solvente y detergente mientras está inmovilizada, *por ejemplo*, mientras la proteína está unida a una resina cromatográfica, puede prevenir la formación de agregados basándose simplemente en la incapacidad física de las moléculas de proteína inmovilizadas para entrar en contacto entre sí. En algunas realizaciones, la inactivación da como resultado la formación de una cantidad menor que aproximadamente un 20 % de agregados, menor que aproximadamente un 18 %, menor que aproximadamente un 15 %, menor que aproximadamente un 12 %, menor que aproximadamente un 10 % o menor que aproximadamente un 5 % de agregados. Y, en ciertas realizaciones, el grado de agregación se reduce en al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 100 % en comparación con el grado de agregación cuando la preparación de proteína se somete a inactivación de virus donde la proteína no está inmovilizada.

En una realización preferida, la proteína se carga en una resina cromatográfica y el tratamiento con solvente y detergente se usa como un paso de lavado, preferiblemente un paso de lavado que continúa durante un período de incubación lo suficientemente largo para permitir la inactivación de los virus con envoltura lipídica. Por ejemplo, el paso de lavado preferiblemente continúa durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente

una hora. La mezcla de solvente y detergente comprenderá detergente no iónico y solvente orgánico en concentraciones adecuadas para efectuar dicha inactivación del virus, como se describió anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla de solvente y detergente comprende el 1 % de TRITÓN X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de polisorbato 80. A continuación, se proporcionan detalles adicionales para algunas realizaciones particulares, con respecto a la purificación de ADAMTS13.

La inactivación del virus también puede comprender la eliminación vírica, *por ejemplo*, mediante filtración, tal como nanofiltración usando un nanofiltro. Dicha eliminación vírica puede ocurrir sola o en combinación con la desactivación vírica (inactivación), *por ejemplo*, el paso de desactivación vírica que comprende el tratamiento con una mezcla de solvente y detergente como se describió anteriormente. Cuando la inactivación del virus comprende tanto la desactivación vírica como la eliminación vírica, la eliminación vírica puede ocurrir antes y/o después de la desactivación vírica mediante tratamiento con solvente y detergente. Generalmente, la eliminación vírica de una muestra implica filtrar la muestra, *por ejemplo*, hacer pasar la muestra a través de un filtro con un tamaño de poro que mantenga la ADAMTS13 en la muestra, mientras permite que los virus y los contaminantes víricos fluyan a través de él. En una realización, el tamaño de poro del filtro es de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 50 nm. La filtración también se puede llevar a cabo mediante nanofiltración usando un filtro de 20 N o 35 N (Plan ova, Asahi Kasei). En algunas realizaciones, se usan prefiltros para evitar que se ensucie el nanofiltro, por ejemplo, se puede usar un filtro de aproximadamente 2 µm o una membrana de PVDF o PES de 0,2 µm.

Pulido por cromatografía de intercambio catiónico

En algunas realizaciones, el método comprende además, después de la cromatografía con hidroxiapatita (o cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida de una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto), el paso opcional de pulir la muestra que comprende ADAMTS13 mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico. En este paso, la conductividad del tampón que comprende ADAMTS13 se puede reducir antes del pulido, si es necesario para lograr una conductividad apropiada para la cromatografía de intercambio catiónico.

(a) Reducción de la conductividad del tampón

Después de la cromatografía con hidroxiapatita o la cromatografía en tándem con hidroxiapatita seguida de una resina de interacción hidrofóbica/intercambio catiónico de modo mixto, el tampón que comprende la proteína ADAMTS13 se puede preparar para el intercambio catiónico reduciendo la conductividad del tampón, *por ejemplo*, eliminando componentes iónicos (*por ejemplo*, cloruro de sodio). En algunas realizaciones, la conductividad del tampón se reduce a menos de aproximadamente 5 mS/cm y/o el pH se reduce a aproximadamente 6,0. La conductividad del tampón se puede reducir mediante cualquier método conocido en la técnica, descrito en este documento, o como puede ser apreciado por una persona experta en la técnica, especialmente a la luz de las explicaciones en este documento. Los ejemplos no limitativos incluyen ultrafiltración/diafiltración (*por ejemplo*, con casetes de flujo cruzado o módulos de fibra hueca), filtración en gel, diálisis, etc.

En una realización, la proteína ADAMTS13 se prepara para el intercambio de cationes mediante ultrafiltración/diafiltración con una membrana que tiene un límite de corte de aproximadamente 10 kDa, contra un tampón de equilibrio de intercambio de cationes (*por ejemplo*, un tampón que comprende 20 mM de MES, pH 6,0 a temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la membrana de ultrafiltración/diafiltración es una membrana PES, que tiene un límite de corte de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 50 kDa, por ejemplo, un límite de corte de aproximadamente 20 kDa, un límite de corte de aproximadamente 30 kDa, un límite de corte de aproximadamente 40 kDa, etc. Usando dicho enfoque, el pH del tampón se puede reducir de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 6,0; y/o la conductividad del tampón se puede reducir por debajo de aproximadamente 2 mS/cm a temperatura ambiente. En algunas de estas realizaciones, el tampón para la diafiltración puede comprender MES 20 mM y puede tener un pH de 6,0 a temperatura ambiente y/o una conductividad de 0,6 mS/cm a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la conductividad del tampón para diafiltración puede ser idéntica, o sustancialmente idéntica, a la del tampón de equilibrio de intercambio catiónico que se usará.

En una realización, la preparación del tampón que comprende ADAMTS13 para el intercambio de cationes se realiza mediante diálisis, *por ejemplo*, usando hardware de dializador que comprende módulos de hemodiálisis, tales como un módulo de hemodiálisis de fibra hueca (serie Aquamax, química PES de fibras huecas, Edwards Lifesciences, Unterschleheim, Alemania). Generalmente, se usan aproximadamente 2 m² de área de filtro para aproximadamente 5 L de muestra; y el tampón de muestra y el tampón de diálisis funcionan en flujo inverso uno con respecto al otro. En algunas realizaciones, la diálisis consiste en no más de dos pasadas a través de un solo módulo de diálisis. Por "módulo de diálisis único" se entiende una unidad o estructura a través de la cual se realiza la diálisis. Un módulo de diálisis generalmente comprende un haz abierto de membrana de fibra hueca encapsulada en una carcasa tubular para crear dos cámaras de flujo distintas, lumen y extracapilar, cada una con acceso a puerto de entrada y salida. Una membrana de fibra hueca semipermeable separa las

dos cámaras y permite selectivamente el paso en función del tamaño y el gradiente de concentración de los solutos, al tiempo que restringe el paso de otros solutos entre las dos cámaras. Al operar el módulo en un modo de flujo a contracorriente, los solutos que pasan a través de la membrana son barridos rápidamente y diluidos en un gran volumen de solución de dializado ("barrido"), manteniendo el mayor gradiente de concentración posible. En consecuencia, la diálisis se puede realizar en un barrido de un único paso a través de un único módulo de diálisis.

En algunas realizaciones, se usa una combinación de estos enfoques, por ejemplo, se puede usar UF/DF con diálisis para efectuar la concentración de la muestra y el intercambio de tampón en preparación para el pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico. En otras realizaciones más, el intercambio de tampón puede llevarse a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico.

(b) Cromatografía de intercambio catiónico

Como se indicó anteriormente, el método explicado en este documento puede comprender opcionalmente pulir la muestra mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico. Tal como se usa en este documento, el término "resina de intercambio catiónico" se refiere a cualquier resina adecuada para cromatografía de intercambio catiónico y que tiene una carga neta negativa, por ejemplo, debido a un grupo cargado negativamente (a pH neutro). Los ejemplos incluyen, entre otros, un grupo carboxilo, un grupo carboximetilo (CM), un grupo sulfoalquilo (SP, SE), un grupo metilsulfonato (S), un éster sulfatado de celulosa, heparina y similares, y combinaciones de estos. Este paso generalmente está diseñado para concentrar el producto ADAMTS13, poner el producto en un tampón de preformulación y reducir aún más las impurezas que no son ADAMTS13, incluidas las impurezas relacionadas con el procedimiento (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, como proteínas CHO, ADN de células huésped, como ADN de CHO, reactivos de la mezcla de solvente y detergente, etc.), así como las impurezas relacionadas con el producto (*por ejemplo*, agregados y fragmentos no biológicamente activos de ADAMTS 13).

En una realización, la resina de intercambio catiónico también tiene una o más de las siguientes características: poros grandes, comportamiento de flujo de perfusión y comportamiento de flujo convectivo. Los ejemplos no limitantes de resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente que se pueden usar en el paso de pulido explicado en este documento incluyen POROS® S (Applied Biosystems), Convective Interaction Media (CIM®, BIA Separation), Toyopearl Gigacap S (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA), Toyopearl Gigacap CM (Tosoh), Toyopearl SP (Tosoh), Toyopearl CM (Tosoh), MacroPrep S (Bio-rad, Hercules, CA), UNOsphereS (Bio-rad, Hercules, CA), MacroprepCM ((Bio-rad, Hercules, CA), Fractogel EMD SO3 (Merck), Fractogel EMD COO (Merck), Fractogel EMD SE Hicap (Merck), Cellufine Sulfate (Chisso), CM y SP Trisacryl (Pall), CM y S HyperD (Pall), Mustang S (Pall), S y CM Sepharose CL (GE Healthcare), S y CM Sepharose FF (GE Healthcare), S y CM CAPTO™ (GE Healthcare), MonoS (GE Healthcare), Source S (GE Healthcare) y similares.

La cromatografía sobre una resina de intercambio catiónico es un método bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la columna de intercambio catiónico tiene una carga máxima de aproximadamente 0,2 mg de ADAMTS13/mL a aproximadamente 0,5 mg de ADAMTS13/mL. En una realización preferida, la columna se carga con al menos 0,3 mg de ADAMTS13/mL. Generalmente, durante la cromatografía en una resina de intercambio catiónico, la ADAMTS13 se une a la resina de intercambio catiónico y al tampón, y ciertas impurezas pueden fluir a través de ella. La columna en la que se adsorbe ADAMTS13 se puede lavar luego, *por ejemplo*, para eliminar contaminantes o impurezas débilmente unidas y/o para ajustar el tampón en preparación para la elución de ADAMTS13 de la resina de intercambio catiónico. Luego, la ADAMTS13 puede eluirse en el eluato.

En algunas realizaciones, el eluato obtenido del paso de cromatografía de intercambio catiónico contiene una cantidad mayor de agregados de ADAMTS 13 que la deseada. En algunas realizaciones, por ejemplo, el eluato comprende más de aproximadamente el 15 % de agregados, que se cree que se introducen después del paso de concentración e intercambio de tampón con el paso del dializador y/o el paso de cromatografía de intercambio catiónico.

Para permitir la producción de ADAMTS13 con un porcentaje significativamente menor de agregados, se pueden usar ciertas condiciones con la resina de intercambio catiónico, como se detalla más adelante en la Figura 2 con respecto a la resina de intercambio catiónico Poros S. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa una combinación que comprende purificación por cromatografía de intercambio catiónico seguida de inactivación del virus con solvente y detergente en columna, por ejemplo, como se describió con más detalle anteriormente. Esta combinación preferiblemente da como resultado menores cantidades de agregados que aparecen con el polipéptido AD AMTS 13 en el eluato. En realizaciones más preferidas, el procedimiento de elución comprende una elución en gradiente (en lugar de una elución por pasos), que puede eliminar aún más agregados de ADAMTS 13, *por ejemplo*, en la parte descendente del pico de elución. En realizaciones incluso más preferidas, la concentración de Tween 80 en el tampón de elución es mayor que aproximadamente el 0,05 %, por ejemplo, aproximadamente el 0,06 %, aproximadamente el 0,07 %, aproximadamente el 0,08 %, aproximadamente el 0,09 %, aproximadamente el 0,10 %, aproximadamente el 0,11 %, aproximadamente el 0,12 %, aproximadamente el 0,13 %, aproximadamente el 0,14 %, aproximadamente el 0,15 %, aproximadamente el 0,16 %, aproximadamente el 0,17 %, aproximadamente el 0,18 %, aproximadamente el 0,19 %, aproximadamente el 0,20 %, aproximadamente el 0,21 %, aproximadamente el 0,22 %, aproximadamente el 0,23 %, aproximadamente el 0,24 %, aproximadamente el 0,25 %, aproximadamente el 0,26 %, aproximadamente el 0,27 %, aproximadamente el 0,28 %, aproximadamente el 0,29 %, aproximadamente el 0,30 %, aproximadamente el 0,31 %, aproximadamente el 0,32 %, aproximadamente el 0,33 %, aproximadamente el 0,34 %, aproximadamente el 0,35 %, aproximadamente el 0,36 %, aproximadamente el 0,37 %, aproximadamente el 0,38 %, aproximadamente el 0,39 %, aproximadamente el 0,40 %, aproximadamente el 0,41 %, aproximadamente el 0,42 %, aproximadamente el 0,43 %, aproximadamente el 0,44 %, aproximadamente el 0,45 %, aproximadamente el 0,46 %, aproximadamente el 0,47 %, aproximadamente el 0,48 %, aproximadamente el 0,49 %, aproximadamente el 0,50 %, aproximadamente el 0,51 %, aproximadamente el 0,52 %, aproximadamente el 0,53 %, aproximadamente el 0,54 %, aproximadamente el 0,55 %, aproximadamente el 0,56 %, aproximadamente el 0,57 %, aproximadamente el 0,58 %, aproximadamente el 0,59 %, aproximadamente el 0,60 %, aproximadamente el 0,61 %, aproximadamente el 0,62 %, aproximadamente el 0,63 %, aproximadamente el 0,64 %, aproximadamente el 0,65 %, aproximadamente el 0,66 %, aproximadamente el 0,67 %, aproximadamente el 0,68 %, aproximadamente el 0,69 %, aproximadamente el 0,70 %, aproximadamente el 0,71 %, aproximadamente el 0,72 %, aproximadamente el 0,73 %, aproximadamente el 0,74 %, aproximadamente el 0,75 %, aproximadamente el 0,76 %, aproximadamente el 0,77 %, aproximadamente el 0,78 %, aproximadamente el 0,79 %, aproximadamente el 0,80 %, aproximadamente el 0,81 %, aproximadamente el 0,82 %, aproximadamente el 0,83 %, aproximadamente el 0,84 %, aproximadamente el 0,85 %, aproximadamente el 0,86 %, aproximadamente el 0,87 %, aproximadamente el 0,88 %, aproximadamente el 0,89 %, aproximadamente el 0,90 %, aproximadamente el 0,91 %, aproximadamente el 0,92 %, aproximadamente el 0,93 %, aproximadamente el 0,94 %, aproximadamente el 0,95 %, aproximadamente el 0,96 %, aproximadamente el 0,97 %, aproximadamente el 0,98 %, aproximadamente el 0,99 %, aproximadamente el 1,00 %.

aproximadamente el 0,09 %, de manera preferible aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,11 %, aproximadamente el 0,12 %, aproximadamente el 0,13 %, aproximadamente el 0,14 % o aproximadamente el 0,15 %. Se cree que el aumento de concentración tiene un efecto estabilizador adicional sobre la ADAMTS13, evitando aún más la formación de estructuras de alto peso molecular durante la elución de ADAMTS13 de la resina. Por "estabilizar la proteína ADAMTS13" o "efecto estabilizador sobre ADAMTS13" se entiende tender a promover la estructura natural de ADAMTS13, particularmente, en una forma intacta y/o monomérica, o una forma sustancialmente intacta y/o monomérica, en lugar de una forma fragmentada o agregada. La estabilización también puede referirse a la tendencia de la ADAMTS13 obtenida a resistir la fragmentación, la pérdida de estructura natural y/o la agregación frente a condiciones que de otro modo serían desestabilizadoras, como variaciones de temperatura, variación de pH, fuerzas iónicas y similares.

La proteína ADAMTS 13 también puede estabilizarse mediante una matriz usada durante la recolección, por ejemplo, cuando se realiza la inactivación del virus mediante un tratamiento con solvente y detergente en una recolección concentrada. Asimismo, los agregados que se forman se pueden eliminar mediante pasos de purificación posteriores, como la captura en una columna cromatográfica de intercambio aniónico (como ANX Sepharose, como se describe en este documento); y/o el pulido mediante cromatografía (como la cromatografía en tándem con hidroxapatita/Capto MMC, como se describe en este documento).

El uso de una o más modificaciones descritas anteriormente puede dar como resultado un eluato que comprende menores cantidades de agregados del polipéptido ADAMTS13. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, el eluato de la columna de intercambio catiónico puede comprender una cantidad menor que aproximadamente el 20 %, menor que aproximadamente el 18 %, menor que aproximadamente el 15 %, menor que aproximadamente el 12 %, menor que aproximadamente el 10 % o menor que aproximadamente el 5 % de agregados.

Un paso final de la cromatografía sobre una resina de intercambio catiónico comprende eluir la proteína ADAMTS 13 con un tampón de elución. En algunas realizaciones, la ADAMTS13 unida se eluye de la resina de intercambio catiónico aumentando la fuerza iónica del tampón. El tampón que comprende ADAMTS13 usado para contactar cromatográficamente la resina de intercambio catiónico generalmente tiene una conductividad menor que aproximadamente 10 mS/cm, a temperatura ambiente, *por ejemplo*, menor que 5 mS/cm. Además, el tampón que comprende ADAMTS13 usado para poner en contacto cromatográficamente la resina de intercambio catiónico generalmente tiene un pH menor que aproximadamente 7,0, a temperatura ambiente, *por ejemplo*, 6,0. El tampón de elución usado para eluir la proteína ADAMTS13 de la resina de intercambio catiónico puede tener una fuerza iónica inferior a la de dichos tampones. La resina también se puede lavar con un tampón que tenga un pH igual, o sustancialmente igual, al pH del tampón de almacenamiento previsto.

En una realización preferida, la proteína ADAMTS13 se eluye de la resina de intercambio catiónico con un tampón de almacenamiento. En general, por tampón de almacenamiento se entiende un tampón con un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, a temperatura ambiente y que comprende calcio, un compuesto tamponante y una sal. El pH del tampón de almacenamiento puede ser mayor que aproximadamente 7,0 (*por ejemplo*, aproximadamente 7,5) a temperatura ambiente. El tampón de almacenamiento puede comprender una concentración menor que aproximadamente 10 mM de Ca^{++} (*por ejemplo*, 2 mM de Ca^{++}); el compuesto tamponante puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfato, tris, HEPES, histidina, imidazol, gly-gly, MES, tricina, acetato y similares; y la sal puede seleccionarse del grupo que consiste en NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 y similares. En una realización preferida, el tampón de almacenamiento tiene un pH mayor que 7,0 y comprende una concentración menor que 10 mM de iones calcio, un compuesto tamponante y una sal. En una realización más preferida, el tampón de almacenamiento comprende además un detergente no iónico, *por ejemplo*, aproximadamente entre el 0,01 % y aproximadamente el 0,5 % de detergente no iónico, *por ejemplo*, el 0,05 % de detergente no iónico. En realizaciones incluso más preferidas, el eluato no se somete a ninguna concentración posterior ni a pasos de intercambio de tampón después de la elución de la resina de intercambio catiónico con el tampón de almacenamiento.

En una realización particular, se usa Source S (GE healthcare) como resina de intercambio catiónico del paso de pulido, *por ejemplo*, una columna Source S con una altura de lecho de aproximadamente 20 cm. En tales realizaciones, la columna puede activarse con aproximadamente 2 volúmenes de columna de aproximadamente 2 M de NaCl y equilibrarse con aproximadamente 6 volúmenes de columna de un tampón que comprende MES aproximadamente 20 mM, NaCl aproximadamente 10 mM y CaCl_2 aproximadamente 2 mM, con un pH de aproximadamente 6 a temperatura ambiente. El tampón que comprende ADAMTS13 se puede poner en contacto con la columna a una conductividad inferior a aproximadamente 5 mS/cm a temperatura ambiente, y posteriormente lavar la columna con el tampón de equilibrio y, finalmente, recolectar el eluato que comprende la proteína ADAMTS 13. Después de la recolección, el eluato se puede concentrar y el tampón se puede intercambiar por un tampón de almacenamiento, *por ejemplo*, mediante cromatografía de intercambio aniónico, diafiltración, ultrafiltración, diálisis y similares.

En otra realización particular, se usa POROS® S como resina de intercambio catiónico para pulir la muestra

que comprende la proteína ADAMTS13. En esta realización, el tampón que comprende ADAMTS13 usado para poner en contacto cromatográficamente la resina de intercambio catiónico puede tener una conductividad menor que aproximadamente 5 mS/cm y un pH entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 6,4. ADAMTS13 se puede eluir mediante elución en gradiente, aunque la elución por pasos puede proporcionar preferiblemente un producto más concentrado. Si se realiza una elución en gradiente, se pueden usar dos tampones, *por ejemplo*, un primer tampón que tenga un contenido de sal bajo (*por ejemplo*, poca o ninguna sal) y un segundo tampón que tenga un contenido de sal más alto (*por ejemplo*, aproximadamente 500 mM) de modo que la agrupación de eluato pueda tener una concentración de sal de aproximadamente 200 mM. Si se realiza elución por etapas, el tampón de elución puede comprender un tampón de almacenamiento, *por ejemplo*, un tampón de almacenamiento que tenga aproximadamente 300 mM de NaCl, aproximadamente 2 mM de CaCl₂, aproximadamente 20 mM de histidina, aproximadamente 0,05% de Tween 80, y puede tener un pH de aproximadamente 7,5, a temperatura ambiente. En algunas de estas realizaciones, no es necesario ningún intercambio de tampón después del paso de POROS® S, es decir, las fracciones de ADAMTS 13 obtenidas de POROS® S ya están en un tampón y en una concentración adecuada para el almacenamiento. En otras realizaciones adicionales, las fracciones de ADAMTS13 obtenidas de la columna POROS® S pueden estar sujetas a pasos adicionales de concentración y/o intercambio de tampón.

En general, la purificación de la proteína ADAMTS13 recombinante según algunas realizaciones de los métodos explicados en este documento produce composiciones de proteína ADAMTS13 pura. En una realización, la purificación de la proteína recombinante según el método explicado produce proteína ADAMTS13 que es al menos aproximadamente el 90 % pura, *por ejemplo*, al menos aproximadamente el 95 % pura, *por ejemplo*, al menos aproximadamente el 98 % pura, *por ejemplo*, o al menos aproximadamente el 99 % pura. Se pueden obtener rendimientos de al menos aproximadamente el 20 % según algunas realizaciones del método explicado. En una realización, el método proporciona rendimientos de al menos aproximadamente el 5 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 30 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 10 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 20 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 40 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 50 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 60 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 70 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 80 %, *por ejemplo*, aproximadamente el 90 %, o *por ejemplo*, aproximadamente el 95 %. En algunas realizaciones, el método proporciona la proteína ADAMTS13 que tiene una actividad específica de aproximadamente 500 unidades/mg de ADAMTS13 a aproximadamente 1000 unidades/mg de ADAMTS13. En otra realización, el método proporciona proteína ADAMTS13 que tiene una actividad específica de aproximadamente 1200 unidades/mg de proteína ADAMTS13 UV 280 a aproximadamente 2400 unidades/mg de proteína ADAMTS13 UV 280. En otra realización, en donde la proteína ADAMTS13 recombinante es producida por células CHO transformadas con ácido nucleico ADAMTS13 recombinante, la purificación de ADAMTS13 recombinante según el método explicado produce una composición que tiene menos de aproximadamente 1000 ppm de impurezas de células huésped. En algunas realizaciones, el método proporciona al menos aproximadamente 2 mg/mL de proteína ADAMTS13 en un tampón de almacenamiento.

Composiciones que comprenden la proteína ADAMTS13 recombinante

La presente descripción proporciona además composiciones que comprenden ADAMTS13 recombinante purificada según un método explicado en este documento. Las composiciones explicadas en este documento pueden ser útiles para el almacenamiento de ADAMTS13 recombinante purificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína ADAMTS13 purificada se almacena congelada, *por ejemplo*, a menos de aproximadamente -60 °C. Las composiciones explicadas en este documento también pueden ser útiles para la administración terapéutica de la proteína ADAMTS13 y/o para preparar composiciones para administración terapéutica, en particular, administración parenteral. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ADAMTS 13 purificada obtenida según los métodos descritos en este documento está en forma de una sustancia farmacológica a granel, es decir, en una forma lista para su formulación en composiciones para administración terapéutica.

En consecuencia, otro aspecto de la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas en las que la proteína ADAMTS13 recombinante purificada se mezcla con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente aceptables. En realizaciones preferidas, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte. Un portador farmacéuticamente inerte es uno que no reacciona, o no reacciona sustancialmente, con el principio activo farmacéutico y/o en particular, no afecta, o no afecta sustancialmente, las propiedades farmacéuticas deseadas del principio activo. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en formas conocidas en la técnica, *por ejemplo*, mediante procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulado, atrapamiento, liofilización y similares.

Dependiendo de la afección que hay que tratar, estas composiciones farmacéuticas pueden formularse y administrarse sistémica o localmente. Las técnicas para la formulación y administración se puede encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. Las vías adecuadas pueden incluir, *por ejemplo*, administración oral o transmucosal; así como suministro por vía parenteral, incluidas administración intramuscular, administración subcutánea, administración intramedular, administración

intratecal, administración intraventricular, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intranasal y similares.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente descripción incluyen composiciones que comprenden ADAMTS13 como ingrediente activo en una cantidad efectiva para alcanzar el fin pretendido. Una "cantidad efectiva" de ADAMTS 13 como se utiliza en este documento puede referirse a aquella cantidad que aumenta, potencia, realza, incrementa o produce un efecto biológico de la ADAMTS13 natural. Los efectos biológicos de ADAMTS13 natural incluyen la actividad de la proteasa que escinde vWF, basada en la acción de ADAMTS13 en la escisión del factor von Willebrand, una proteína grande involucrada en la coagulación sanguínea. Una "cantidad efectiva" incluirá una cantidad de ADAMTS13 que resulte en una disminución de los niveles de agregación plaquetaria, por ejemplo, reduciendo los niveles en un individuo que sufre un trastorno de coagulación sanguínea a niveles más comparables a los de un individuo que no sufre el trastorno de coagulación sanguínea. Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyen, entre otros, la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), también conocida como síndrome de Moschcowitz, el síndrome de Upshaw-Schulman (forma familiar de PTT) y el accidente cerebrovascular. Una "cantidad efectiva" también incluye la cantidad necesaria para lograr un beneficio profiláctico y/o terapéutico en el tratamiento de uno o más trastornos de la coagulación sanguínea y afecciones asociadas. Los expertos en la materia son perfectamente capaces de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva.

20 La presente descripción proporciona métodos, composiciones farmacéuticas y kits para tratar y/o prevenir trastornos de coagulación sanguínea y afecciones asociadas en sujetos animales. El término "sujeto animal" tal como se usa en el presente documento incluye tanto a los seres humanos como a otros mamíferos.

25 El término "tratar y/o prevenir" como se usa en este documento incluye lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico, respectivamente. Por beneficio terapéutico se entiende la reversión o mejora del trastorno de coagulación sanguínea subyacente que se está tratando. Por ejemplo, en un paciente con PTT, el beneficio terapéutico incluye la erradicación o mejora de una o más de las afecciones y/o síntomas asociados a la PTT, tal que se observe una mejora en el paciente, sin perjuicio de que el paciente todavía sufra el trastorno subyacente. Por ejemplo, el tratamiento puede proporcionar un beneficio terapéutico no solo cuando se reduce o erradica la formación de trombosis, sino también cuando se observa una mejoría en el paciente con respecto a los síntomas que acompañan a la PTT, como reducción de dolores de cabeza, disminución de la fiebre y/o retraso de la insuficiencia renal.

35 Para beneficio profiláctico, una composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar un trastorno de coagulación sanguínea, incluyendo, por ejemplo, un paciente que informa uno o más de los síntomas o afecciones comúnmente asociados con trastornos de coagulación sanguínea como PTT, incluso aunque aún no se haya hecho un diagnóstico.

40 Además del ingrediente activo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender portadores farmacéuticamente aceptables como excipientes y coadyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente.

45 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral comprenden generalmente soluciones acuosas de los ingredientes activos en forma soluble en agua. En algunas realizaciones, las suspensiones del principio activo se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintético, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad del principio activo, *por ejemplo*, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

55 Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológica tamponada. Para administración tisular o celular se usan penetrantes apropiados para permear la barrera particular. Generalmente, dichos penetrantes se conocen en la técnica.

60 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando el principio activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, luego de la adición de coadyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen rellenos de carbohidratos o proteínas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc.; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; gomas incluyendo goma herbácea y tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal de estos, tal como alginato de sodio. También se pueden usar portadores que permitan que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como

comprimidos, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, soluciones, lechadas, grageas, y similares, para ingesta por vía oral y/o nasal de un paciente que se tiene que tratar.

5 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas con gelatina, así como cápsulas blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como el glicerol o el sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con un relleno o aglutinante, como lactosa o almidones; lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, como aceites, parafina líquida o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizantes.

10 Las composiciones que comprenden ADAMTS13 u otra proteína preparada según un método descrito en este documento pueden formularse con un portador farmacéuticamente aceptable, colocarse en un contenedor (o kit) apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no limitan el alcance de la invención.

20 Ejemplo 1

La FIG. 1 proporciona un método ejemplar para purificar la proteína ADAMTS13, según ciertas realizaciones de la descripción como se explica en este documento. En el ejemplo proporcionado, la proteína ADAMTS13 recombinante se purifica a partir del sobrenadante recolectado del cultivo de células CHO que comprende una secuencia de nucleótidos de ADAMTS13 recombinante. En este ejemplo, la muestra es un sobrenadante de cultivo celular que comprende aproximadamente 2 unidades/mL (aproximadamente 2 µg/mL) de proteína ADAMTS13.

30 Como se muestra en la FIG. 1, una muestra que comprende impurezas ADAMTS13 y no ADAMTS13 puede primero someterse a una preparación de preenriquecimiento opcional: (a) como se muestra en el paso 101, la muestra puede concentrarse por ultrafiltración (aproximadamente 10 veces a aproximadamente 20 veces) y el tampón intercambiado por diafiltración (límite de peso molecular de aproximadamente 30 kDa); y (b) como se muestra en el paso 102, la proteína ADAMTS13 puede unirse y eluirse de una resina de intercambio aniónico, antes de un mayor enriquecimiento.

35 *Preparación de la muestra preenriquecimiento*

(a) Ultrafiltración/diafiltración de preenriquecimiento (UFIDF)

40 Como se muestra en la FIG. 1, paso 101, para optimizar la carga para la cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento, el sobrenadante del cultivo celular se concentra de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces y se diafiltra usando una membrana PES (corte de aproximadamente 30 kDa a aproximadamente 50 kDa; Pall Omega) a un tampón de baja conductividad que contiene iones calcio y zinc, que se consideran que estabilizan ADAMTS13. El tampón para la diafiltración del sobrenadante del cultivo celular es Tris 20 mM, el polisorbato 80 al 0,1 %, NaCl 85 mM, CaCl₂ 2 mM, ZnCl₂ 5 µM, con un pH de 7,7 a temperatura ambiente.

(b) Cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento

50 Como se muestra en la FIG. 1, paso 102, se puede realizar una cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento usando ANX Sepharose Fast Flow low sub de GE Healthcare. Esta resina de intercambio aniónico se puede usar según las siguientes condiciones (Tablas 1-2).

Carga de columna: máx. 0,5 mg de ADAMTTTS13 Ag/mL de resina; altura del lecho: 20 cm

55 Tabla 1

Paso	Tampón	Volumen de columna (VC)	Caudal (cm/h)
Activación de columna	ANX-HS	2	100
Equilibrio	ANX-Equi	6	100
Carga	CCS concentrado y diafiltrado		
Lavado 1	ANX-W1	2,5	100
Lavado 2	12,5 % de ANX-EluB/87,5 % de ANXEI uA	3	100
Gradiente de	12,5 % de ANX-EluB/87,5% de ANXEI uA al	11	100

elución	100 % de ANX-EluB		
Poselución	ANX-HS	3	100

Como alternativa, se puede usar la elución por pasos con 2,8 volúmenes de columna de un tampón que comprende el 48 % de ANX-EluB y el 52 % de ANX-EluA, como se detalla en la Tabla 2. También se indican otros tampones potencialmente adecuados.

5

Tabla 2

Tampón	Formulación
ANX-Equi	Tris 20 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, NaCl 50 mM, CaCl ₂ 2 mM, ZnCl ₂ 5 µM, pH = 7,7 (temperatura ambiente)
ANX-W1	Tris 20 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, NaCl 50 mM, pH = 7,7 (temperatura ambiente)
ANX-EluA	Na/K PO ₄ 20 mM pH = 7,0 (temperatura ambiente)
ANX-EluB	Na/K PO ₄ 20 mM, NaCl 400 mM, pH = 7,0 (temperatura ambiente)
ANX-HS	NaCl 2 M

10 Se pueden usar resinas diferentes a la indicada en la FIG. 1, paso 102. Por ejemplo, se pueden usar POROS 50D y POROS 50PI de Applied Biosystems, Foster City, CA. En el eluato de la cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento en que se usa esta resina puede proporcionar ADAMTS13 recombinante con una pureza de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 70 %, y el rendimiento porcentual después de esta preparación de preenriquecimiento de la muestra puede ser de al menos aproximadamente el 75 %.

15 *Enriquecimiento de ADAMTS13*

20 Como se muestra en la FIG. 1, pasos 103 y 104, respectivamente, la ADAMTS13 puede luego enriquecerse mediante los pasos de pulido (a) y (b). La muestra que comprende ADAMTS13 se somete a cromatografía en tándem, primero con hidroxiapatita en una columna de hidroapatita tipo II (Biorad, Hercules, CA), paso 103, seguido de cromatografía en modo mixto en una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica CAPTO™ MMC (GE Healthcare), paso 104. Más específicamente, la agrupación de eluato de la cromatografía de intercambio aniónico de preenriquecimiento del paso 102 se diluye 1:4 con tampón de dilución de hidroxiapatita para reducir la conductividad a aproximadamente 6 mS/cm. La agrupación de eluato diluido se somete a una cromatografía en tándem con hidroxiapatita en condiciones que permiten que una porción sustancial de la proteína ADAMTS 13 fluya a través de él, paso 103, seguido de una resina de intercambio catiónico/interacción hidrofóbica de modo mixto que se une a la proteína ADAMTS13, paso 104. Las condiciones para la cromatografía en tándem se proporcionan a continuación y en las Tablas 3-4.

30 Columna 1: Resina: Hidroxiapatita tipo II (Biorad) (HA); carga: máx. 2 mg de proteína total/mL de resina; altura del lecho: (20-30) cm.

Columna 2: Resina: Capto MMC (GE Healthcare); carga: (3-6) mg de ADAMTS13/mL de resina; altura del lecho: 10 cm.

35 Relación volumen de columna HA; MMC = 10:1.

Tabla 3

Paso	Tampón	Volumen de columna (VC)	Caudal (cm/h)
Activación (MMC)	Elución de MMC	3 (MMC)	50 (MMC)
Equilibrio	HA-Equi.	4 (HA)	50 (HA)
Equilibrio	HA-Equi.	1 (HA)	50 (HA)
Carga	Eluato de captura diluido (diluido 1:5 con HA-Equi) <6 mS/cm de conductividad	(20-30) L	30 (HA)
Reequilibrio	HA-Equi.	0,5 (HA)	30 (HA)
Lavado 1 (MMC)	MMC-Equi.	3 (MMC)	50 (MMC)
Lavado 2 (MMC)	Lavado MMC	4 (MMC)	50 (MMC)
Elución (MMC)	Tampón de elución de MMC al 75 %/tampón de lavado de MMC al 25 %	4 (MMC)	50 (MMC)

40 Tabla 4

Tampón	Formulación	Conductividad
Dilución de HA	Na/K PO ₄ 20 mM, pH = 7,0 (temperatura ambiente)	
TANDEM-Equi.	Na/K PO ₄ 20 mM, NaCl 25 mM, pH = 7,0 (temperatura ambiente)	Aproximadamente 5,5 mS/cm (temperatura ambiente).
Lavado MMC	Na/K PO ₄ 50 mM, NaCl 160 mM, pH 8,0 (temperatura ambiente)	Aproximadamente 16,5 mS/cm (temperatura ambiente).
Elución de MMC	Na/K PO ₄ 50 mM, NaCl 1000 mM, pH 8,0 (temperatura ambiente)	Aproximadamente 93 mS/cm (temperatura ambiente)
Elución de HA	K PO ₄ 300 mM, pH 7,0 (temperatura ambiente)	Aproximadamente 33 mS/cm (temperatura ambiente)

El rendimiento porcentual de ADAMTS13 después del enriquecimiento por cromatografía en tándem puede ser al menos del 60 %.

5 *Inactivación del virus*

Como se muestra en la FIG. 1, paso 105, la muestra puede someterse a un tratamiento con solvente y detergente para inactivar virus o partículas víricas contaminantes; y/o la muestra se filtra para eliminar dichos virus o partículas víricas. También como se muestra en la FIG. 1, el paso 105 de inactivación del virus se puede llevar a cabo en varios puntos del procedimiento, por ejemplo, antes de los pasos 103 y 104 de cromatografía en tándem, o después de un paso que implica concentración e intercambio de tampón, paso 106, descrita a continuación.

Para la inactivación del virus mediante tratamiento con solvente y detergente, la muestra se trata con una mezcla de solvente y detergente que comprende el 1 % de TRITÓN X-100®, el 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y el 0,3 % de polisorbato 80, durante 30 minutos a una temperatura de aproximadamente 12 °C a aproximadamente 16 °C (específicamente para inactivar virus con envoltura lipídica). Se proporcionan detalles adicionales a continuación en el Ejemplo 2.

Alternativamente, o además, la muestra se somete a filtración, por ejemplo, nanofiltración a través de un filtro de partículas de 0,2 µm. Por ejemplo, la mezcla después del tratamiento con solvente y detergente se diluye con 1 volumen de un tampón de equilibrio de pulido, descrito a continuación, y se filtra a través de una membrana de PVDF o PES 0,2 µm. La filtración se puede llevar a cabo antes y/o después del tratamiento con solvente y detergente. La filtración posterior al tratamiento puede usarse para eliminar materia en forma de partículas que pueda haberse formado durante el tratamiento. La filtración también se puede llevar a cabo mediante nanofiltración usando un filtro 20 N (Planova, Asahi Kasei), como también se muestra en la FIG. 1, donde el paso 105 de inactivación del virus se lleva a cabo antes de los pasos 103 y 105 de cromatografía en tándem. Se puede llevar a cabo un paso 105 adicional de inactivación del virus después de que la muestra se haya pulido mediante cromatografía de intercambio catiónico, como se describe a continuación.

El rendimiento porcentual de ADAMTS13 a partir de esta inactivación del virus puede ser al menos del 95 %.

Pulido por cromatografía de intercambio catiónico

Después del enriquecimiento, la ADAMTS13 se puede pulir mediante cromatografía en una resina de intercambio catiónico, y la conductividad del tampón que comprende ADAMTS 13 se puede reducir antes del pulido, para lograr una conductividad apropiada para la cromatografía de intercambio catiónico. En consecuencia, los pasos posenriquecimiento pueden implicar (a) reducir la conductividad del tampón; seguido de (b) cromatografía de intercambio catiónico.

(a) Reducción de la conductividad del tampón

Como se muestra en la FIG. 1, paso 106, la preparación para la cromatografía de intercambio catiónico puede implicar concentración e intercambio de tampón, usando UF/DF, con un límite de corte de 10 kDa, y hardware dializador. En la realización ilustrada, el hardware del dializador usado para el intercambio de tampón implica un módulo de hemodiálisis de fibra hueca (serie Aquamax, química PES de Hollowfibers, Edwards Lifesciences, Unterschleilheim, Alemania) que tiene un área de filtro de 0,3 m² a 1,9 m². Durante el funcionamiento, se monitorizan en línea los siguientes parámetros: presión (antes del módulo, después del módulo y presión transmembrana), conductividad y temperatura. El cartucho del dializador está conectado a dos bombas, una que alimenta la muestra (a través de las fibras huecas) y otra que alimenta el tampón de diálisis (que rodea las fibras huecas, en dirección de flujo inverso). Se usan aproximadamente 2 m² de área de filtro para aproximadamente 5 L de muestra; y el flujo de fluido se fija de la siguiente manera: 40 mL/min (flujo de muestra o 20 mL/min/m² de área de filtro), 60 mL/min (flujo de tampón de diálisis, flujo inverso). Antes y después de la diálisis, el módulo de fibra hueca se enjuaga con tampón de diálisis y el enjuague posterior a la

ES 3 000 382 T3

diálisis se añade al producto recolectado. Después de la diálisis, la muestra tiene aproximadamente el mismo volumen que antes, aunque está ligeramente concentrada.

5 El rendimiento porcentual de ADAMTS13 después de reducir la conductividad del tampón de esta manera puede ser de aproximadamente el 90 %.

En otras realizaciones, el intercambio de tampón se puede llevar a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico en ANX Sepharose-FF low sub, como en el paso 102.

10 *Cromatografía de intercambio catiónico*

15 Como se muestra en la FIG. 1, paso 107, después del enriquecimiento de la proteína ADAMTS13 (y el paso 106 opcional de concentración e intercambio de tampón y/o el paso 105 de inactivación del virus), la muestra se puede purificar mediante cromatografía de intercambio catiónico. El tampón que comprende la proteína ADAMTS13 se puede purificar en una columna Source S (GE Healthcare) o en una columna POROS® S, como, por ejemplo, la columna POROS® 50 HS (Applied Biosystems).

20 Las condiciones para el pulido en la columna Source 30S se proporcionan en la Tabla 5 y los tampones para el paso de pulido se proporcionan en la Tabla 6.

Resina: Source 30 S (GE Healthcare); carga de columna: máx. 0,2 mg (0,5) mg de ADAMTS13/mL de resina; altura del lecho: 20 cm.

Tabla 5

25

Paso	Tampón	Volumen de columna (VC)	Caudal (cm.h)
Activación de columna	NaCl 2 M	2	32
Equilibrio	SOS-Equi.	6	32
Carga			32
Lavado	SOS-Equi.	3	32
Elución (gradiente)	SOS-Equivalente al 100 %/0 % SOS-Elu. al 0 % SOS-Equi./100 % SOS-Elu.	5	19
Poselución	SOS-Elu.	3	32

Tabla 6

Tampón	Formulación	Comentarios
SOS-Equi.	MES 20 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	El tampón puede contener NaCl 10 mM, CaCl ₂ 2 mM
SOS-Elu.	MES 20 mM, NaCl 500 mM, CaCl ₂ 2 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	

30 La agrupación de eluato de la columna Source S se concentra y se diafiltra frente a un tampón de almacenamiento.

Las condiciones para el pulido en la columna POROS® S se proporcionan en la Tabla 7 y los tampones para el paso de pulido se proporcionan en la Tabla 8.

35

Resina: POROS® S (Applied Biosystems, Foster City, CA); carga de columna: máx. 12 mg de ADAMTS13/mL de resina; altura del lecho: 20 cm.

Tabla 7

40

Paso	Tampón	Volumen de columna (VC)	Caudal (cm/h)
Activación de columna	NaCl 2 M	5 VC	50
Equilibrio	Poros equivalentes	10 VC (hasta que el pH y la conductividad den señales planas y estables)	50
Carga	Eluato de MMC después del tratamiento con solvente y detergente y dilución	conductividad menor que 5 mS/cm (temperatura ambiente)	32

ES 3 000 382 T3

Reequilibrio	Poros equivalentes	5 VC	32
Lavado 1	Lavado de poros 1	5 VC	32
Lavado 2	Lavado de poros 2	7 VC	32
Elución	Poros elu.	5 VC	19
Poselución	NaCl 2 M	3 VC	32

Tabla 8

Poros equivalentes	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Tween 80 al 0,1 %, pH 6,0 (temperatura ambiente), aproximadamente 3,9 mS/cm de conductividad a 25 °C
Lavado de poros 1	L-histidina 20 mM, NaCl 5 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 6,0 (temperatura ambiente), aproximadamente 1,9 mS/cm de conductividad a 25 °C
Lavado de poros 2	L-histidina 20 mM, NaCl 5 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,5 (temperatura ambiente), aproximadamente 1,9 mS/cm de conductividad a 25 °C
Poros elu.	L-histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,5 (temperatura ambiente), aproximadamente 18 mS/cm de conductividad a 25 °C

5

La agrupación de eluato de la columna POROS® S se concentra y se diafiltra frente a un tampón de almacenamiento.

10 El rendimiento porcentual de ADAMTS13 después de este paso de pulido adicional puede ser al menos aproximadamente el 70 %, y después del intercambio de tampón, al menos aproximadamente el 90 %.

15 Como se muestra en la FIG. 1, paso 108, se obtiene una proteína ADAMTS13 purificada según el método descrito anteriormente. Las ADAMTS se congelan y se almacenan, por ejemplo, a una temperatura menor que aproximadamente -60 °C. El rendimiento de todo el procedimiento puede ser de aproximadamente el 22 % a aproximadamente el 24 % o más.

Ejemplo 2

20 La FIG. 2 proporciona un resumen de varias condiciones que se pueden usar con el paso 107 de cromatografía de intercambio catiónico de la FIG. 1. En particular, la comparación del producto ADAMTS13 obtenido a partir de las diversas ejecuciones indica que las condiciones de la FIG. 2C reducen los agregados contaminantes.

25 Como se muestra en la FIG. 2A, la variante A es una combinación de inactivación vírica usando un tratamiento con solvente y detergente (S/D), como se analiza con más detalle a continuación, seguido de una cromatografía de intercambio catiónico en Poros S aplicando una elución por pasos. Como se muestra en la FIG. 2B, la variante B implica cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50S, con dilución por pasos, pero sin estar precedida por la inactivación del virus. Ambas variaciones A y B se pueden realizar según el procedimiento expuesto en la Tabla 9.

30 Tabla 9

	Volumen del tampón (VC)	Composición del tampón	Caudal (cm/h)	Observaciones
Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	50	
Carga de producto	aproximadamente 12	Solución de producto tratada y diluida S/D	32	Carga máxima de la columna: 6 mg de ADAMTS 13/mL de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	32	
Lavado 2	8	histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,0 (temperatura ambiente)	32	
Elución por pasos	5	histidina 20 mM, NaCl 200 mM, CaCl ₂	25	La agrupación comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumenta

ES 3 000 382 T3

		2 mM, Tween 80 al 0,05 %, pH 7,5 (temperatura ambiente)		significativamente y finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ cae por debajo del 5 % de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (alrededor de 1 VC).
--	--	---	--	---

En la variante A, el eluato acondicionado (dializado) del paso 106 se somete a un paso 105 de inactivación de virus con solvente y detergente. El eluato se filtra primero a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μ para eliminar las partículas. Luego, el filtrado se complementa con una mezcla de solvente y detergente hasta alcanzar concentraciones finales del 1 % de Tritón X-100, el 0,3 % de fosfato de tri-n-butilo y el 0,3 % de polisorbato 80 (Tween 80) a partir de soluciones madre. La inactivación se realiza a temperaturas de aproximadamente 12 °C a aproximadamente 25 °C en un período de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora bajo ligero removido o agitación. La inactivación se detiene diluyendo la solución con un volumen de tampón de dilución frío (MES 20 mM, pH 6,0, temperatura ambiente). Para proteger la columna, la solución tratada y diluida con solvente y detergente se filtra nuevamente con un filtro de 0,2 μ, por ejemplo, para eliminar materia en forma de partículas que pueda haberse formado durante el tratamiento de inactivación del virus.

La solución de producto inactivada y diluida con solvente y detergente se somete luego al paso 107 de cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50HS, usando dilución por pasos. Los detalles cromatográficos se exponen en la Tabla 9 anterior. La agrupación de eluato resultante proporciona la proteína ADAMTS13 en forma de sustancia farmacológica a granel, que puede almacenarse congelada a una temperatura menor que -60 °C.

En la variante B, el paso 107 de cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo sobre el eluato acondicionado (dializado) del paso 106, sin el paso 105 de inactivación del virus con solvente y detergente. Los detalles para la cromatografía de intercambio catiónico son los detallados anteriormente.

Como se muestra en la FIG. 2C, la variante C es una combinación que implica purificación por cromatografía de intercambio catiónico en Poros 50HS, usando elución en gradiente, seguida de inactivación del virus con solvente y detergente en columna. Esta variante reduce sorprendentemente los agregados que de otro modo se encontrarían con la proteína ADAMTS13 purificada. Los detalles cromatográficos que pueden usarse con la variante C se exponen en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10

	Volumen del tampón (VC)	Composición del tampón	Caudal (cm/h)	Comentarios
Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	50	
Carga de producto	aproximadamente 6	Agrupación de eluato dializado del purificador Capto MMC	32	Carga máxima de la columna: 6 mg de ADAMTS 13 /mL de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	32	
Lavado 2	1,5	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Tritón X-100 al 1 %, TNBP al 0,3 %, Tween 80 al 0,3 %, pH 6,0 (temperatura ambiente)	32	
Lavado 3	2,1	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, Tritón X-100 al 1 %, TNBP al 0,3 %, Tween 80 al 0,3 %, pH 6,0 (temperatura ambiente)	20	Tratamiento S/D: 1 hora de tiempo de contacto con productos químicos S/D
Lavado 4	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	32	Eliminación de productos químicos S/D
Lavado 5 (tampón A)	8	histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1 %, pH	32	Columna de acondicionamiento para elución

		7,0 (temperatura ambiente)		
Elución por pasos	10	Gradiente del 100 % del tampón A al 100 % del tampón B (histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1 %, pH 7,5 (temperatura ambiente) dentro de 10 VC	32	La agrupación comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumenta significativamente y finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ cae por debajo del 5 % de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (aproximadamente de 2 a 3 VC).

En la variante C, el material de carga es la agrupación de eluato del paso 104 de pulido de intercambio catiónico y preferiblemente tiene una conductividad por debajo de 4,5 mS/cm, lograda por diálisis o intercambio de tampón por filtración en gel. Sobre todo, la cromatografía de intercambio catiónico en Poros S está adaptada para incluir un tratamiento con solvente y detergente en columna, que implica la inactivación del virus de la proteína inmovilizada en la columna cromatográfica, como se analizó anteriormente. La inactivación del virus en columna comprende un lavado durante una hora con la mezcla de solvente y detergente a una temperatura entre 2 °C y 10 °C. Después del tratamiento en columna, se cambia el tampón de lavado para eliminar por lavado de manera eficiente los productos químicos solventes y detergentes antes de la elución.

La elución se cambia de una elución por pasos con NaCl 200 mM a una elución en gradiente, lo que se cree que facilita la separación de especies monoméricas y oligoméricas de ADAMTS13, particularmente en la parte descendente del pico de elución. Los agregados se eliminan en la fracción de elución tardía, eliminando de ese modo aún más agregados que de otro modo se encontrarían con la proteína ADAMTS13 purificada. Como adaptación adicional para estabilizar la proteína ADAMTS13 monomérica, la concentración de Tween 80 en el tampón de elución se incrementa del 0,05 % al 0,1 % en los tampones de lavado y elución. Se cree que esto previene aún más la formación de agregados durante la elución de ADAMTS13 de la resina Poros S. Los detalles del procedimiento cromatográfico en Poros S, incluida la inactivación del virus mediante tratamiento con solvente y detergente en columna, se exponen en la Tabla 10 anterior.

Como se muestra en la FIG. 2D, la variante D sirve como control. En la variante D, el pulido del paso 107 mediante cromatografía de intercambio catiónico se realiza en Poros 50 HS nuevamente con elución en gradiente y aumento de Tween 80 en el tampón de elución, pero sin inactivación del virus en columna mediante tratamiento con solvente y detergente. En cambio, se realiza un paso 105 de tratamiento con solvente y detergente para inactivar el virus en la recolección concentrada antes del intercambio de cationes. Los detalles cromatográficos se proporcionan en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11

	Volumen del tampón (VC)	Composición del tampón	Caudal (cm/h)	Comentarios
Activación	5	NaCl 2 M	50	
Equilibrio	6	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	50	
Carga de producto	aproximadamente 6	Agrupación de eluato dializado del purificador Cpto MMC	32	Carga máxima de la columna: 6 mg de ADAMTS 13/mL de resina
Lavado 1	10	Ácido MES 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,0 (temperatura ambiente)	32	
Lavado 2 (tampón A)	10	histidina 20 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1 %, pH 7,0 (temperatura ambiente)	32	Columna de acondicionamiento para elución
Elución por pasos	10	Gradiente del 100 % del tampón A al 100 % del tampón B (histidina 20 mM, NaCl 300 mM, CaCl ₂ 2 mM, Tween 80 al 0,1 %, pH 7,5 (temperatura ambiente) dentro de 10 VC	32	La agrupación comienza después de que la señal UV ₂₈₀ aumenta significativamente y finaliza después de que la señal UV ₂₈₀ cae por debajo del 5 % de la señal UV ₂₈₀ en el pico máximo (aproximadamente de 2 VC a 3 VC).

30

En la variante D, el material de carga es la agrupación de eluato del paso 104 de pulido de intercambio catiónico y preferiblemente tiene una conductividad por debajo de 4,5 mS/cm, lograda por diálisis o intercambio de tampón por filtración en gel. En el paso 107 de cromatografía de intercambio catiónico en Poros S se usa nuevamente la elución en gradiente, en lugar de la elución por pasos, así como el 0,1 % de Tween 80 en los tampones de lavado y elución, como se describió anteriormente. Los detalles del procedimiento cromatográfico en Poros S con elución en gradiente se exponen en la Tabla 11, arriba.

Ejemplo 3

Se realizaron experimentos a escala de laboratorio, usando un fermentador de 100 L, con la inactivación del virus con solvente y detergente en columna, para determinar el impacto potencial de este procedimiento en el desempeño del paso 107 de cromatografía de intercambio catiónico. Los datos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12

15

Muestra	Procedimiento solvente y detergente	Rendimiento Poros S*		Actividad específica	Impureza de CHO HCP		Agregados		
		% A13 Ag	Unidades Fret, % A13		Unidades/mg A13 Ag	ng CHO HCP/Unidad A13	ng CHO HC P/mg A13 Ag	% multímeros	% dímeros
1	Tratamiento con solvente y detergente inmediatamente antes de la cromatografía en Poros S (variante A)	99	100	696	0,49	346	9,7	7,0	83,3
2	¡Sin solvente ! Tratamiento con detergente (variante B)	133	154	894	0,58	519	1,3	4,6	94,1
3	Tratamiento con solvente y detergente en columna (Poros S) (variante C)	89	95	931	0,60	561	1,0	2,3	96,7
4	Tratamiento con solvente y detergente en la recolección del concentrado d (variante D)	87	117	905	0,39	354	1,0	3,7	95,3
5	Tratamiento solvente y detergente en la recolección del concentrado d (variante D)	65	93	764	0,21	163	0,8	1,5	97,7
6		81	108	845	0,38	324	0,7	1,5	97,8
7		66	131	741	0,31	231	0,2	1,1	98,7

*Los rendimientos superiores al 100 % reflejan un problema de ensayo con la fracción de carga cromatográfica en Poros 50S.
A13 Ag: antígeno ADAMTS13
Frets A13: Unidades Frets de ADAMTS13
CHO HCP: Proteínas de células huésped de ovario de hámster chino

Como se muestra en la Tabla 12, realizar la inactivación del virus a través del tratamiento con solvente y detergente en solución, antes de la cromatografía de intercambio catiónico en Poros S, puede dar como resultado la formación de altas cantidades de agregados (Variante A de la FIG. 2A y Muestra 1). Si se omite el tratamiento con solvente y detergente y se lleva a cabo el mismo procedimiento, la formación de agregados se reduce significativamente (Variante B de la FIG. 2B y Muestra 2).

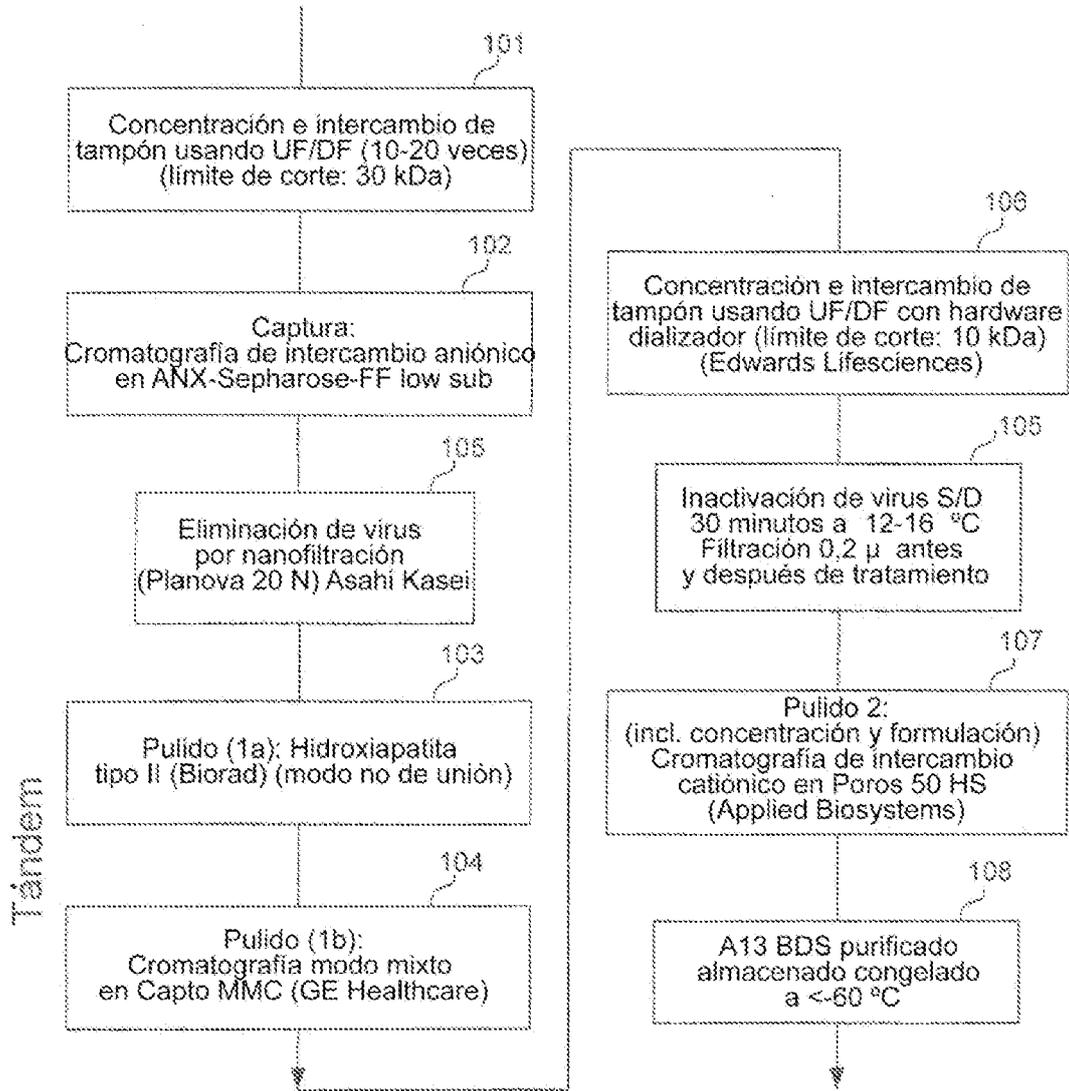
Realizar el tratamiento solvente y detergente en columna, esto es, poner en contacto la ADAMTS 13 con la mezcla solvente y detergente mientras está inmovilizada sobre la superficie de la resina, también puede prevenir la formación de agregados. Es más, las pequeñas cantidades de agregados que se forman se pueden eliminar aún más mediante elución en gradiente en la fracción de elución tardía (Variante C de la FIG. 2C; Muestras 3 y 4).

5 A modo de comparación, se lleva a cabo un tratamiento estándar con solvente y detergente en solución durante el procedimiento de purificación, seguido de una cromatografía de intercambio catiónico en Poros S sin tratamiento con solvente y detergente ni inmediatamente antes ni en columna (Variante D de la FIG. 2D, Muestras 5, 6 y 7). Este procedimiento también puede producir ADAMTS13 con un bajo contenido de agregados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inactivar contaminantes víricos en una muestra de proteína, comprendiendo dicho método: inmovilizar dicha proteína sobre un soporte; e incubar dicha proteína inmovilizada con una mezcla de solvente y detergente que comprende un detergente no iónico y un solvente orgánico.
5
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha proteína es al menos una seleccionada entre ADAMTS 13, factor VIII, factor II, factor VIIa, factor IX, factor de von Willebrand y anticuerpo anti-MIF.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en donde dicho soporte es una resina cromatográfica.
4. El método según la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de solvente y detergente comprende un 1 % de Tritón X-100, un 0,3 % de fosfato de tri-N-butilo y un 0,3 % de polisorbato 80.
- 15 5. El método según la reivindicación 1, en donde la incubación en dicha mezcla de solvente y detergente continúa durante 30 minutos a 1 hora.
6. El método según la reivindicación 1, que comprende además eluir dicha proteína de dicho soporte con un tampón de almacenamiento.
20
7. El método según la reivindicación 6, en donde dicho tampón de almacenamiento tiene un pH mayor que 7,0 y comprende una concentración menor que 10 mM de iones calcio, un compuesto tamponante, un 0,05 % de detergente no iónico y una sal.
- 25 8. El método según la reivindicación 6, en donde no hay ningún paso de concentración o intercambio de tampón posterior al paso de elución.

FIG. 1



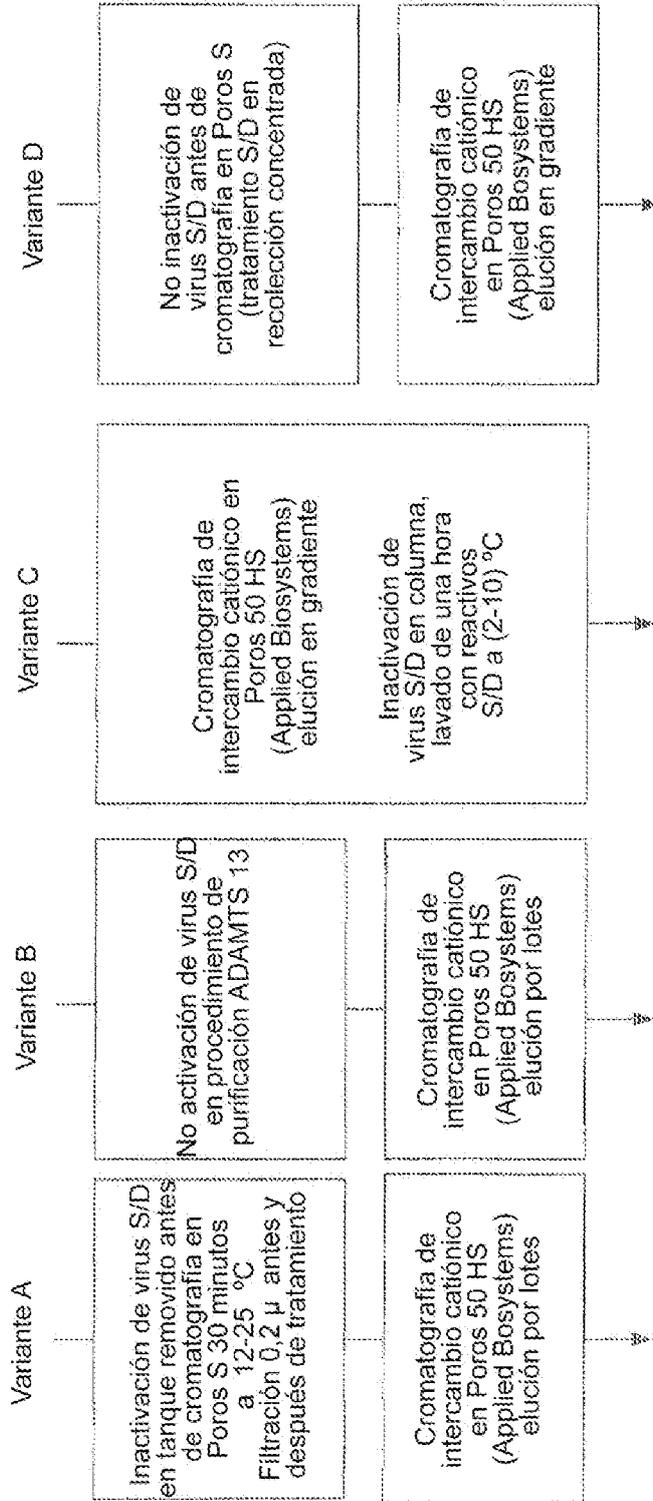


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D