

PREPARACIÓN DE DERIVADOS DEL FACTOR XA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTES RELACIONADAS

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º de serie 62/351,841, presentada el 17 de junio de 2016, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

10

Se ha desarrollado un derivado modificado de la proteína factor Xa (fXa) que es útil como antídoto para anticoagulantes que se dirigen a fXa. El derivado está siendo desarrollado como un agente de reversión universal para pacientes a los que se les administró un inhibidor del factor Xa oral o inyectable para anticoagulación que necesitan revertir la anticoagulación.

15

COMPENDIO

La presente descripción proporciona métodos para fabricar un polipéptido antídoto de fXa a gran escala, lo que proporciona un alto rendimiento de productos proteicos altamente puros. En una
20 modalidad, se proporciona un método para preparar un producto de polipéptido expresado a partir de una construcción de polinucleótidos que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 7. El método puede incluir agregar un detergente a una muestra que contiene la
25 construcción de polinucleótidos y purificar la proteína antídoto codificada a través de un cromatógrafo por afinidad basado en el inhibidor la tripsina de soja (STI, por sus siglas en inglés), un cromatógrafo de modo mixto y de intercambio de iones y/o una interacción hidrofóbica.

En una modalidad, se proporciona un método para preparar un producto de polipéptido expresado
30 a partir de una construcción de polinucleótidos que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 7, que comprende agregar un detergente a una muestra que contiene la construcción de polinucleótidos y un producto de polipéptidos expresado a partir de la construcción
35 de polinucleótidos; cargar la muestra en un cromatógrafo por afinidad basado en el inhibidor la tripsina de soja (STI) y eluir el polipéptido con un primer amortiguador de elución para generar una

primera muestra eluida, donde la muestra cargada no contiene un solvente orgánico; cargar la primera muestra eluida en un cromatógrafo de modo mixto y de intercambio de iones y eluir el polipéptido con un segundo amortiguador de elución que comprende al menos 1M de una sal inorgánica para generar una segunda muestra eluida; y cargar la segunda muestra eluida en un cromatógrafo de interacción hidrofóbica y eluir el polipéptido con un tercer amortiguador de elución que comprende cloruro de sodio al menos 2mM, preparando de este modo una muestra purificada que comprende el producto de polipéptido.

En algunas modalidades, el detergente comprende Tritón X-100 (p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter de polietilenglicol). En algunas modalidades, el primer amortiguador de elución comprende arginina 0,5M a 2M. En algunas modalidades, el primer amortiguador de elución tiene un pH de alrededor de 5 a 5,4. En algunas modalidades, el cromatógrafo de modo mixto e intercambio de iones comprende un cromatógrafo de hidroxiapatita cerámica tipo I.

En algunas modalidades, el segundo amortiguador de elución comprende al menos 2M de la sal inorgánica. En algunas modalidades, la sal inorgánica es cloruro de sodio. En algunas modalidades, el cromatógrafo de interacción hidrofóbica comprende un cromatógrafo de octil sefarosa.

En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de purificación con un cromatógrafo de intercambio de aniones. En algunas modalidades, el cromatógrafo de intercambio de aniones comprende una membrana de intercambio de iones Sartobind™.

En algunas modalidades, el método comprende además someter una o más de las muestra a filtración con un filtro de nanopolar. En algunas modalidades, la filtración con el filtro de nanopolar se realiza antes de cargar la muestra al cromatografía por afinidad basado en STI.

En algunas modalidades, la muestra purificada contiene menos de alrededor de 1 % de proteínas contaminantes no expresadas por la construcción de polinucleótidos. En algunas modalidades, el producto de polipéptido se expresa en una célula que contiene la construcción de polipéptidos. En algunas modalidades, la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 100 mg del producto de polipéptido por litro de medio. En algunas modalidades, la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 200 mg del producto de polipéptido por litro de medio. En algunas modalidades, la muestra purificada contiene más de alrededor de 50 % del producto de polipéptido producido en el medio. En algunas modalidades, la muestra purificada

contiene más de alrededor de 100 mg del producto de polipéptido de cada litro de producción del medio.

En algunas modalidades, el producto de polipéptido es un polipéptido de dos cadenas que comprende una cadena ligera y una cadena pesada. En algunas modalidades, alrededor de 20 % a 50 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene dos glicosilaciones unidas a O y alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene una glicosilación unida a O. En algunas modalidades, alrededor de 40 %-80 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, al menos alrededor de 90 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O. En algunas modalidades, alrededor de 2 %-12 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, alrededor de 0,1 %-1,5 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, alrededor de 2 %-8% del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, alrededor de 35 %-60 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

También se proporciona, en una modalidad, un polipéptido preparado mediante un método de cualquiera de las modalidades.

En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una parte de polipéptido de polipéptido de dos cadenas donde: alrededor de 35 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; alrededor de 20 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; alrededor de 40%-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; y menos de 10 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, menos de 5 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, menos de 3% de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que
5 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, alrededor de 0,1 %-1,5 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, alrededor de 2 %-8 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, alrededor de 30 %-70 % de la cadena
10 pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene dos glicosilaciones unidas a O. En algunas modalidades, alrededor de 30%-70 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene una glicosilación unida a O. En algunas modalidades, al menos alrededor de 90 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O.

15 En algunas modalidades, la preparación está liofilizada. En algunas modalidades, la composición comprende además HCl de L-arginina o acetato de L-arginina. En algunas modalidades, la composición comprende además sacarosa. En algunas modalidades, la composición comprende además manitol.

20 También se proporciona, en una modalidad, un método para revertir o inhibir la anticoagulación en un paciente que recibe un tratamiento de anticoagulación con un inhibidor del factor Xa, que comprende administrarle al paciente una composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

30 La siguiente descripción establece ejemplos de modalidades de la tecnología de la presente. Debería reconocerse, sin embargo, que no se pretende que dicha descripción sea una limitación del alcance de la presente descripción, sino que se proporciona como una descripción de modalidades ilustrativas.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, que incluyen intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1 o 10 %. Se entenderá, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por la expresión «alrededor de». También se entenderá, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son meramente ilustrativos y que en la técnica se conocen equivalentes de estos.

Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen referencias plurales, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión «portador farmacéuticamente aceptable» incluye múltiples portadores farmacéuticamente aceptables, lo que incluye mezclas de estos.

Tal como se usa en la presente, el término «comprende» significa que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluye otros. «Consiste básicamente en» cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia para la combinación para el uso deseado. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en la presente no excluiría contaminantes de traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina amortiguada con fosfato, conservantes y similares. «Consiste en» significa que se excluyen más que solo oligoelementos de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para la administración de las composiciones de la presente descripción. Las modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

El término «proteína» y «polipéptido» se utilizan de manera intercambiable y en su sentido más amplio para hacer referencia a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas mediante enlaces peptídicos. En otra modalidad, la subunidad puede estar enlazada por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita la cantidad máxima de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. Tal como se usa en la presente, el término «aminoácido» se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, lo que incluye glicina y los isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Las abreviaciones de una letra y de tres letras de los aminoácidos de origen natural se indican más adelante.

«Factor Xa» o «fXa» o «proteína fXa» es una serina proteasa en la vía de coagulación de la sangre, que es producida a partir del factor X inactivo (fX, SEQ ID NO. 1, **Tabla 1**). La secuencia de nucleótidos que codifica el factor X humano («fX») puede encontrarse en GenBank con el número de acceso «NM_000504». Tras la escisión catalítica de los primeros 52 residuos de la

5 cadena pesada, fX se activa en fXa. FXa contiene una cadena ligera y una cadena pesada. Los primeros 45 residuos de aminoácidos (residuos 1-45 de la SEQ ID NO. 1) de la cadena ligera se denomina el dominio Gla porque contiene 11 residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla) modificados de manera postraducciona. También contiene una secuencia de pila aromática (6

10 residuos de aminoácidos) (residuos 40-45 de la SEQ ID NO. 1). La digestión de quimotripsina retira de manera selectiva los residuos 1-44 que dan como resultado fXa sin dominio Gla. El dominio catalítico de serina proteasa de fXa se ubica en la cadena pesada de extremo C. La cadena pesada de fXa es altamente homóloga a otras serina proteasas tales como trombina, tripsina y proteína C activada.

15 «fXa natural» o «fXa de tipo salvaje» hace referencia al fXa presente de manera natural en el plasma o aislado en su forma original, no modificada, que procesa la actividad biológica de la activación de la protrombina, lo que promueve la formación del coágulo sanguíneo. El término incluye polipéptidos de origen natural aislados de muestras de tejido así como también fXa producido de manera recombinante. «fXa activo» se refiere a fXa que tiene la actividad

20 procoagulante de la activación de la protrombina. El «fXa activo» puede ser un fXa natural o fXa modificado que retiene la actividad procoagulante.

Tal como se usa en la presente, «antídoto de fXa», «antídoto» o «derivado de fXa» se refiere a una proteína fXa modificada que no compite con fXa por el ensamblaje en el complejo de

25 protrombinasa y tiene actividades procoagulantes o catalíticas reducidas o nulas, y aun así se une y/o neutraliza sustancialmente los anticoagulantes, tales como inhibidores de fXa. «Actividad procoagulante» de una proteína fXa o derivado de fXa, en algunos aspectos, hace referencia a la actividad enzimática que posee el polipéptido de fXa activo de tipo salvaje. Los ejemplos de derivados de fXa se proporcionan en la patente estadounidense n.º 8,153,590, y publicaciones

30 PCT WO2009/042962 y WO2010/056765, y proporcionadas adicionalmente en la presente, tal como la SEQ ID NO: 2 y 3 y equivalentes biológicos de estos.

La «actividad enzimática» de un polipéptido de fXa o derivados de este se refiere a la capacidad del polipéptido de catalizar una reacción bioquímica con un sustrato a través de interacción directa

35 con el sustrato.

La SEQ ID NO: 2 contiene 3 mutaciones con respecto al fXa de tipo salvaje. La primera mutación es la eliminación de 6-39 aa en el dominio Gla de fX. La segunda mutación es reemplazar la secuencia de péptidos de activación 143-194 aa con -RKR-. Esto produce un

5 enlazador -RKRRKR- (SEQ ID NO: 6) que conecta la cadena ligera (SEQ ID NO: 4) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 5). Tras la secreción, el enlazador es escindido lo que da como resultado un polipéptido de dos cadenas, SEQ ID NO: 3 (r-Antídoto). La tercera mutación es la mutación del residuo S379 del sitio activo en un residuo Ala. Esta sustitución de aminoácido corresponde al aminoácido 296 y 290 de las SEQ ID NOS: 1 y 3, respectivamente.

10 Un antídoto de ejemplo es el «r-Antídoto» que hace referencia a un producto de procesamiento de polipéptido de dos cadenas de la SEQ ID NO: 2, después de la escisión del enlazador. Esto está representado por la SEQ ID NO: 3. El r-antídoto se describe, por ejemplo, en US 8,153,590, cuyo contenido se incorpora a la presente descripción mediante esta referencia. El r-antídoto incluye

15 una cadena ligera (SEQ ID NO. 4) y una cadena pesada (SEQ ID NO: 5) conectadas con un único enlace disulfuro entre la cisteína 98 (Cys98) de la cadena ligera y la cisteína 108 (Cys108) de la cadena pesada. Al igual que el fXa de tipo salvaje, en determinados lotes de producción, el r-Antídoto experimenta modificaciones postraduccionales que dan como resultado la glicosilación en determinados residuos de aminoácidos, por ejemplo, Ser56, Ser72, Ser76 y Thr82 de la cadena

20 ligera y Thr249 de la cadena pesada, y un residuo modificado, (3R)-3-hidroxiAsp en Asp29 de la cadena ligera. Adicionalmente, además del enlace disulfuro entre las cadenas, puede haber enlaces disulfuro dentro de las cadenas formados entre las cisteínas 16 y 27, 21 y 36, 38 y 47, 55 y 66, 62 y 75, y 77 y 90 de la cadena ligera, y entre las cisteínas 7 y 12, 27 y 43, 156 y 170, y 181 y 209 de la cadena pesada.

Tabla 1. Secuencia de polipéptidos del factor X humano inactivo (SEQ ID NO: 1)

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC
	ETSPCQNQGK				
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC
	CARGYTLADN				
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP
	TENPFDLLDF				
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY
	ILTAAHCLYQ				

241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRF TKETYD	FDIAVLRLKT
	PITFRMNVAP				
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EV PYVDRNSC
	KLSSSFIITQ				
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
	IYTKVTAFLK				
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 2. Secuencia de polipéptidos del precursor del r-Antídoto antes de la eliminación del enlazador -RKRRKR- (SEQ ID NO. 6) (SEQ ID NO: 2)

Cadena ligera (SEQ ID NO: 4)					
1	ANSFL		F WNKYKDGDQC	ETSPCQNQ GK	
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS
	CARGYTLADN				
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			
Enlazador (SEQ ID NO: 6)					
	RKRRKR				
Cadena pesada (SEQ ID NO: 5)					
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRF TKETYD	FDIAVLRLKT
	PITFRMNVAP				
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EV PYVDRNSC
	KLSSSFIITQ				
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
	IYTKVTAFLK				
421	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK		

Tabla 3. Secuencia de polipéptidos de una mutante triple del Factor Xa humano después de la eliminación del enlazador -RKRRKR- (SEQ ID NO. 6) (SEQ ID NO: 3)

Cadena ligera (SEQ ID NO: 4)					
1	ANSFL		F WNKYKDGDQC	ETSPCQNQ GK	
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLCS	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS
	CARGYTLADN				
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER			

Cadena pesada (SEQ ID NO: 5)					
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ				
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETD	FDIAVLRLKT
	PITFRMNVAP				
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVPIVDRNSC
	KLSSSFIITQ				
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
	IYTKVTAFLK				
421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK				

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos que codifica el precursor del r-Antídoto (SEQ ID NO:7)

ATGGGGCGCC	CACTGCACCT	CGTCCTGCTC	AGTGCCTCCC	TGGCTGGCCT
CCTGCTGCTC	GGGGAAAGTC	TGTTTCATCCG	CAGGGAGCAG	GCCAACAACA
TCCTGGCGAG	GGTCACGAGG	GCCAATTCCT	TTCTTTTCTG	GAATAAATAC
AAAGATGGCG	ACCAAGTGTGA	GACCAGTCCT	TGCCAGAACC	AGGGCAAATG
TAAAGACGGC	CTCGGGGAAT	ACACCTGCAC	CTGTTTAGAA	GGATTGAAG
GCAAAACTG	TGAATTATTC	ACACGGAAGC	TCTGCAGCCT	GGACAACGGG
GACTGTGACC	AGTTCTGCCA	CGAGGAACAG	AACTCTGTGG	TGTGCTCCTG
CGCCCGCGGG	TACACCCTGG	CTGACAACGG	CAAGGCCTGC	ATTCCCACAG
GGCCCTACCC	CTGTGGGAAA	CAGACCCTGG	AACGCAGGAA	GAGGAGGAAG
AGGATCGTGG	GAGGCCAGGA	ATGCAAGGAC	GGGGAGTGTC	CCTGGCAGGC
CCTGCTCATC	AATGAGGAAA	ACGAGGGTTT	CTGTGGTGGA	ACCATTCTGA
GCGAGTTCTA	CATCCTAACG	GCAGCCCACT	GTCTCTACCA	AGCCAAGAGA
TTCAAGGTGA	GGGTAGGGGA	CCGGAACACG	GAGCAGGAGG	AGGGCGGTGA
GGCGGTGCAC	GAGGTGGAGG	TGGTCATCAA	GCACAACCGG	TTACAAAAGG
AGACCTATGA	CTTCGACATC	GCCGTGCTCC	GGCTCAAGAC	CCCCATCACC
TTCCGCATGA	ACGTGGCGCC	TGCCTGCCTC	CCCGAGCGTG	ACTGGGCCGA
GTCCACGCTG	ATGACGCAGA	AGACGGGGAT	TGTGAGCGGC	TTGGGGCGCA
CCCACGAGAA	GGGCCGGCAG	TCCACCAGGC	TCAAGATGCT	GGAGGTGCCC
TACGTGGACC	GCAACAGCTG	CAAGCTGTCC	AGCAGCTTCA	TCATCACCCA
GAACATGTTT	TGTGCCGGCT	ACGACACCAA	GCAGGAGGAT	GCCTGCCAGG
GGGACGCAGG	GGGCCCGCAC	GTCACCCGCT	TCAAGGACAC	CTACTTCGTG
ACAGGCATCG	TCAGCTGGGG	AGAGGGCTGT	GCCCGTAAGG	GGAAGTACGG
GATCTACACC	AAGGTCACCG	CCTTCCTCAA	GTGGATCGAC	AGGTCCATGA

AAACCAGGGG CTTGCCCAAG GCCAAGAGCC ATGCCCCGGA GGTGATAACG
TCCTCTCCAT TAAAGTGA

Otros antídotos de ejemplo pueden ser equivalentes biológicos del r-Antídoto (o sus precursores, representados por la SEQ ID NO: 2), o de manera alternativa polipéptidos que tienen determinada identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, dichos equivalentes biológicos retienen las características estructurales de la SEQ ID NO: 3, es decir, un sitio activo modificado y un dominio Gla eliminado o modificado. En otro aspecto, dichos equivalentes biológicos retienen las características funcionales de la SEQ ID NO: 3, es decir, no compiten con fXa por el ensamblaje en el complejo de protrombinasa y tiene actividades procoagulantes (por ejemplo, enzimáticas o catalíticas) reducidas o nulas.

El término «sitio activo» se refiere a la parte de una enzima o anticuerpo en donde se produce una reacción química. Un «sitio activo modificado» es un sitio activo que se ha modificado de manera estructural para proporcionar el sitio activo con especificidad o reactividad química aumentada o reducida. Los ejemplos de sitios activos incluyen, de modo no taxativo, el dominio catalítico del factor X humano que comprende los residuos de aminoácidos 235-488, y el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los residuos de aminoácidos 195-448. Los ejemplos de sitio activo modificado incluyen, de modo no taxativo, el dominio catalítico del factor Xa humano que comprende los residuos de aminoácidos 195-448 en la SEQ ID NO: 1 con al menos una sustitución de aminoácido en la posición Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414, o Arg424.

Preparación de antídotos

Los ejemplos experimentales (Ejemplos 1 y 2) demostraron el desarrollo de los métodos de cultivo y purificación para preparar antídotos de fXa. Las células cultivadas incluyen una construcción de polinucleótidos que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia (o al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 7. Típicamente, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Uno de los métodos de purificación se ilustra en la **Figura 1**. Después de que las células se cosechan (etapa 101) y se clarifican usando un filtro de profundidad para retirar la impureza de alto peso molecular (HWM, por sus siglas en inglés), la muestra se concentra (por ejemplo, en

alrededor de 10 veces) (etapa 102). La etapa de concentración puede utilizar celulosa regenerada, de modo no taxativo. En la etapa 103, se puede llevar a cabo la inactivación viral (por ejemplo, con un detergente/solvente; tal como Tritón X-100 al 1 %, fosfato de tributilo al 0,3 % (concentración final)) para inactivar los virus con envoltura en el cultivo celular. Después de la eliminación de los virus, se realizan las etapas 104 (intercambio catiónico de modo mixto), 105 (intercambio aniónico de modo mixto) y 106 (intercambio de iones de modo mixto) para retirar las proteínas de célula hospedadora y ADN y capturar el antídoto. En la etapa 107, se puede utilizar una resina de interacción hidrofóbica para retirar adicionalmente las proteínas de célula hospedadora restantes. Opcionalmente, después de estas etapas de purificación, se puede utilizar una etapa final de filtración de eliminación de virus para eliminar cualquier virus restante.

En otra modalidad, el proceso de purificación es tal como se ilustra en la **Figura 2** y como se demuestra en el Ejemplo 2. En algunas modalidades, el método incluye agregar un detergente a una muestra que contiene la construcción de polinucleótidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) y un producto de polipéptido expresado a partir de la construcción de polinucleótidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 3). En algunas modalidades, el detergente incluye Tritón X-100. En algunas modalidades, no se utiliza ningún solvente para tratar la muestra antes de someter la muestra a la purificación por afinidad posterior. En algunas modalidades, no se utiliza ningún solvente orgánico para tratar la muestra antes de someter la muestra a la purificación por afinidad posterior. En algunas modalidades, no se agrega fosfato de tributilo a la muestra antes de someter la muestra a la purificación por afinidad posterior. En algunas modalidades, la muestra luego se carga en un cromatógrafo por afinidad basado en el inhibidor la tripsina de soja (STI) y eluye con un amortiguador de elución para generar una muestra eluida. En algunas modalidades, la muestra cargada no ha sido tratada con ningún solvente orgánico ni contiene ningún solvente orgánico.

«STI» o «inhibidor de la tripsina de soja» se refiere a inhibidores de tripsina aislados de soja, o sus equivalentes biológicos. Los inhibidores de tripsina tienen un tamaño de alrededor de 20 kDa y reducen la tripsina (una enzima proteolítica) así como también la calicreína plasmática, el factor Xa y la actividad de plasmina. Los STI se encuentran comercialmente disponibles de vendedores tal como Life Technologies (Grand Island, NY). Un ejemplo de STI es el inhibidor de la tripsina Kunitz KTI3, de Glycine max (soja), que tiene el número de acceso GenBank NP_001238611.

El STI puede inmovilizarse en una resina de soporte sólido para la purificación de determinadas proteínas. Además del inhibidor de la tripsina de soja, también se pueden utilizar otras proteínas inhibidoras de tripsina tales como las que se aíslan del suero, judías de lima, páncreas bovino u

ovomucoide, o las formas modificadas de estos. También se contempla que determinados inhibidores de proteasa, en particular los inhibidores de la serina proteasa, se pueden utilizar para preparar resina de afinidad con el fin de purificar el antídoto. Luego el antídoto puede eluir con un amortiguador que contiene arginina. En algunas modalidades, el amortiguador de elución incluye arginina al menos 0,2M, 0,5M, 0,6M, 0,7M, 0,8M, 0,9M, 1M, 1,1M, 1,2M, 1,3M, 1,4M, 1,5M, o 2M. En algunas modalidades, el amortiguador de elución incluye arginina alrededor de 0,5M a 2M, o arginina alrededor de 0,7M a 1,5M o arginina 0,8M a 1,2M. En algunas modalidades, el amortiguador de elución tiene un pH de alrededor de 4,5 a 6, o de 4,6 a 5,6, o de 4,7 a 5,5, o de 4,8 a 5,4, o de 5 a 5,4, o de 5,1 a 5,3 o alrededor de 5,2. En una modalidad, el amortiguador de elución incluye acetato de sodio 25mM arginina 1,0M a pH 5,2.

En algunas modalidades, la muestra se carga luego en un cromatógrafo de modo mixto y de intercambio de iones. Los ejemplos no taxativos del cromatógrafo de modo mixto e intercambio de iones incluyen un cromatógrafo de hidroxapatita cerámica tipo I. Luego la muestra puede eluir con un amortiguador de elución que incluye una sal inorgánica. En algunas modalidades, la sal inorgánica es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En algunas modalidades, la concentración de la sal en el amortiguador de elución es al menos 0,5M, 1M, 1,5M, 2M, 2,5M o 3M.

En algunas modalidades, la elución implica el uso de un gradiente generado entre un amortiguador de equilibrio y un amortiguador de elución. El amortiguador de equilibrio, en algunas modalidades, incluye una concentración menor de la sal, por ejemplo, menos de 0,2M, menos de 0,1M, menos de 50mM, menos de 20mM, menos de 10mM. En algunas modalidades, el gradiente incluye un aumento de al menos 5 veces, o 10 veces, o 20 veces, o 50 veces, o 100 veces de la concentración de sal. En algunas modalidades, el amortiguador de equilibrio incluye MES 50 mM (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), fosfato de sodio 5 mM, a pH 7,0. En algunas modalidades, el amortiguador de elución incluye MES 50mM, fosfato de sodio 5mM, cloruro de sodio 2M pH 7,0. En algunas modalidades, el gradiente comienza con alrededor de 90 % del amortiguador de equilibrio y finaliza con alrededor de 90 % del amortiguador de elución.

En algunas modalidades, la muestra se carga adicionalmente en un cromatógrafo de interacción hidrofóbica. En algunas modalidades, el cromatógrafo de interacción hidrofóbica comprende un cromatógrafo de octil sefarosa. En algunas modalidades, la muestra eluye con un amortiguador de elución que incluyen cloruro de sodio al menos 2mM o, de manera alternativa, cloruro de sodio al menos 1M, 1,5M, 2,5M, 3M, 4M o 5M.

En algunas modalidades, una de las muestras intermedias descritas anteriormente se somete adicionalmente a una etapa de purificación con un cromatógrafo de intercambio de aniones. En algunas modalidades, el cromatógrafo de intercambio de aniones comprende una membrana de intercambio de iones Sartobind™. En algunas modalidades, la cromatografía de intercambio aniónico se aplica después de la cromatografía por afinidad.

En algunas modalidades, una de las muestras intermedias descritas anteriormente se somete adicionalmente a una etapa de purificación con un filtro de nanopolar. En algunas modalidades, la filtración de nanopolar se aplica antes de cargar la muestra al cromatografía por afinidad basado en STI.

En algunas modalidades, la muestra purificada contiene menos de alrededor de 1 % de proteínas contaminantes no expresadas por la construcción de polinucleótidos, tal como proteínas de célula hospedadora o STI que es liberado de la resina/columna de afinidad.

El proceso de purificación de cualquiera de las modalidades anteriores pueden recuperar al menos alrededor de 50 % (o al menos alrededor de 40 %, 45 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 85 %) de la proteína antídoto expresada en el cultivo celular. En algunas modalidades, la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 100 mg del producto de polipéptido por litro de medio. En algunas modalidades, la célula se cultiva en un medio en condiciones para producir al menos 120 mg (o al menos 210 mg, 220 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 270 mg, 280 mg, 290 mg, 300 mg, 310 mg, 320 mg, 330 mg, 340 mg, o 350 mg) del producto de polipéptido por litro de medio. En algunas modalidades, la muestra purificada contiene más de alrededor de 50 mg (o al menos 55 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 180 mg, 190 mg o 200 mg) del producto de polipéptido de cada litro de producción del medio.

Isómeros antídoto en el producto purificado

El producto antídoto purificado, a partir de un método de cualquiera de las modalidades de la presente descripción, se supone que incluye una cadena ligera y un cadena pesada. Sin embargo, los procesos de cultivo y purificación pueden introducir variaciones a la proteína real.

Tal como se demuestra en el Ejemplo 3, alrededor de 20 % a 50 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada intacta (SEQ ID NO: 5). Entre estos que tienen una cadena pesada intacta, alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada tiene dos glicosilaciones unidad a O y alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada tiene una glicosilación unida a O.

En algunas modalidades, al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 45 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada intacta. En algunas modalidades, no más de alrededor de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, u 80 %
5 del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada intacta.

En algunas modalidades, alrededor de 40 %-80 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que tiene una eliminación de la lisina de extremo C (SEQ ID NO: 8). En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 8 constituye al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en la muestra purificada. En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 8 constituye no más de alrededor de 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % en la muestra purificada. En algunas modalidades, al menos alrededor de 90 % de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O.
10

En algunas modalidades, alrededor de 2 %-12 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que tiene una eliminación de 13 residuos de aminoácidos de extremo C (SEQ ID NO: 9). En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 9 constituye al menos alrededor de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 % o 5 % en la muestra purificada. En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 9 constituye no más de alrededor de 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 10 %, 15 %, 17 %, o 20 % en la muestra purificada.
15
20

En algunas modalidades, alrededor de 0,1 %-1,5% del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que tiene una eliminación de 14 residuos de aminoácidos de extremo C (SEQ ID NO: 10). En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 10 constituye al menos alrededor de 0,05 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 % o 0,5 % en la muestra purificada. En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 10 constituye no más de alrededor de 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, o 3 % en la muestra purificada.
25

En algunas modalidades, alrededor de 2 %-8 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena pesada que tiene una eliminación de 15 residuos de aminoácidos de extremo C (SEQ ID NO: 11). En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 11 constituye al menos alrededor de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 % o 5 % en la muestra purificada. En algunas modalidades, la SEQ ID NO: 11 constituye no más de alrededor de 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % en la muestra purificada.
30

El Ejemplo 3 también muestra que alrededor de 35 %-60 % del producto de polipéptido en la muestra purificada tiene una cadena ligera intacta (SEQ ID NO: 4) mientras algunas otras pueden estar modificadas o truncadas. En algunas modalidades, la cantidad de cadena ligera intacta en la cantidad total de cadena ligera es al menos alrededor de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 %. En algunas modalidades, la cantidad de cadena ligera intacta en la cantidad total de cadena ligera es no más que alrededor de 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 % o 90 %.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona una preparación farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una parte de polipéptido de polipéptido de dos cadenas donde alrededor de 35 %-60 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, alrededor de 20 %-50 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, alrededor de 40 %-80 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, menos de alrededor de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 % o 3 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, alrededor de 0,1 %-1,5 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, alrededor de 2 %-8 % de los polipéptidos de dos cadenas tiene una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene dos glicosilaciones unidas a O. En algunas modalidades, alrededor de 5 %-95 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 tiene una glicosilación unida a O. En algunas modalidades, al menos alrededor de 90 % de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 tiene una glicosilación unida a O.

Formulaciones, métodos y dosificaciones

También se proporcionan formulaciones preparadas con productos de proteína de antídoto purificadas. En algunas modalidades, se proporciona una formulación acuosa que es adecuada para la liofilización. En una modalidad, la formulación incluye un antídoto junto con un agente solubilizante, un agente estabilizante (o estabilizador), y un agente cristalino. La formulación puede incluir además un tensioactivo y/o un amortiguador. En algunos aspectos, la presencia de cada uno de estos agentes evita que el antídoto colapse durante la liofilización, por ejemplo, cuando la temperatura de liofilización sea mayor que $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, o $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, tan alta como $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Un «componente cristalino» hace referencia a una molécula que forma una matriz cristalina en una formulación que incluye un polipéptido, durante un proceso de liofilización. Los ejemplos no taxativos de componentes cristalinos incluyen manitol y glicina.

En algunos aspectos, el componente cristalino es manitol (por ejemplo, manitol cristalino). En un aspecto, la concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es al menos 1 % (p/v). En un aspecto, la concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es al menos 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 % o 4 % (p/v). En un aspecto, la concentración del componente cristalino en la formulación acuosa no es mayor que 8 % o de manera alternativa no es mayor que 7 %, 6,5 %, 6 %, 5,5 %, 5 %, 4,5 % o 4 % (p/v). En un aspecto, la concentración del componente cristalino en la formulación acuosa es de alrededor de 1 % a alrededor de 8 %, o de alrededor de 2 % a alrededor de 6 %, o de alrededor de 3 % a alrededor de 5,5 %, o de alrededor de 4,5 % a alrededor de 5,5 %, o de alrededor de 4,6 % a alrededor de 5,4 %, o de alrededor de 4,7 % a alrededor de 5,3 %, o de alrededor de 4,8 % a alrededor de 5,2 %, o de alrededor de 4,9 % a alrededor de 5,1 %, o a alrededor de 4 %, 4,5 %, o 5 % (p/v).

En algunos aspectos, un agente solubilizante está incluido en la formulación acuosa. El término «agente solubilizante» se refiere a sales, iones, carbohidratos, agentes formadores de complejos, polímeros y otros compuestos que, cuando están presentes en solución, aumentan la solubilidad de otra molécula (por ejemplo, un ingrediente activo) en la solución. Los ejemplos no taxativos de agentes solubilizantes incluyen arginina y citrato. En un aspecto, el agente solubilizante es arginina. En un aspecto, el agente solubilizante es citrato.

La presencia del agente solubilizante puede ser útil para mantener al polipéptido de fXa soluble y estable en la formulación. En algunos aspectos, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, arginina) es al menos 10 mM, o de manera alternativa al menos 20 mM, 25 mM, 30 mM, 36 mM, o 40 mM. En algunos aspectos, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, arginina) no es mayor que 100 mM, 96 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, o 50 mM. En algunos aspectos, la concentración del agente solubilizante es de alrededor de 10 mM o 20 mM alrededor de 60 mM, de alrededor de 10 mM o 20 mM a alrededor de 55 mM, de alrededor de 35 mM a alrededor de 55 mM, de alrededor de 40 mM a alrededor de 50 mM, de alrededor de 41 mM a alrededor de 49 mM, de alrededor de 42 mM a alrededor de 48 mM, de alrededor de 43 mM a alrededor de 47 mM, de alrededor de 44 mM a alrededor de 46 mM, o a alrededor de 40 mM, 45 mM o 50 mM. Cabe destacar que, tal como se usa en la presente, el término arginina se refiere al aminoácido así como también las sales (por ejemplo, HCl de arginina) de este. La arginina tiene un peso molecular de alrededor de 174,2 Dalton y el HCl de arginina (por ejemplo, HCl de L-arginina, acetato de L-arginina) tiene un peso molecular de alrededor de 210,7 Dalton.

En una modalidad, el agente solubilizante es citrato o una sal de este. La sal de citrato es citrato de sodio. En un aspecto, el citrato comprende una concentración de alrededor de 1,0 mM a alrededor de 200,0 mM. En un aspecto adicional, la concentración del citrato es de alrededor de 25 mM. En otro aspecto adicional, la concentración del citrato es de alrededor de 50 mM. En una modalidad adicional, la concentración del citrato es de alrededor de 5 mM, 10 mM, o 20 mM. En otra modalidad, el citrato comprende una concentración de alrededor de 0,05 M a alrededor de 0,2 M.

En algunos aspectos, un estabilizador está incluido en la formulación acuosa. El término «estabilizador» indica un excipiente farmacéuticamente aceptable, que protege al ingrediente activo (por ejemplo, los polipéptidos derivados de fXa) y/o la formulación de la degradación química y/o física durante la fabricación, almacenamiento y aplicación. Los ejemplos de estabilizadores pueden incluir sacarosa, arginina, citrato, manitol, trehalosa, glicina, cloruro de sodio, dextrano y glucosa. En un aspecto, el estabilizador es sacarosa.

En un aspecto, la concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es al menos alrededor de 0,5 % (p/v). En un aspecto, la concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es al menos alrededor de 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 % o 2 % (p/v). En un aspecto, la concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) no es mayor que

alrededor de 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5% o 2 % (p/v). En un aspecto, la concentración del estabilizador en la formulación acuosa (por ejemplo, sacarosa) es de alrededor de 1 % a alrededor de 5 %, o de alrededor de 1 % a alrededor de 4 %, o de alrededor de 1 % a alrededor de 3 %, o de alrededor de 1,5 % a alrededor de 2,5 %, o de alrededor de 1,6 % a alrededor de 2,4 %, o de
5 alrededor de 1,7 % a alrededor de 2,3 %, o de alrededor de 1,7 % a alrededor de 2,2 %, o de alrededor de 1,9 % a alrededor de 2,1 %, o a alrededor de 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, o 3 % (p/v).

En algunos aspectos, la formulación acuosa puede incluir además un tensioactivo, un amortiguador, un agente de tonicidad, un crioprotector, un tensioactivo, un lioprotector, un
10 conservante o combinaciones de estos.

En algunos aspectos, la formulación acuosa tiene un pH que es 6 o más, o 6,5 o más, o 7 o más, o 7,5 o más. En algunos aspectos, el pH no es mayor que 9, 8,5 u 8. En algunos aspectos, el pH está entre 6 y 9, entre 6,5 y 8,5, entre 7 y 8,5, entre 7,5 y 8,2, entre 7,6 y 8,1, entre 7,7 y 7,9, o a
15 alrededor de 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 o 8.

En un aspecto, la formulación acuosa incluye arginina alrededor de 45 mM, alrededor de 2 % de sacarosa (p/v), alrededor de 5 % de manitol p/v) y alrededor de 10 mg/mL de un r-Antídoto de dos cadenas, donde la formulación tiene un pH de alrededor de 7.8. En un aspecto, la formulación
20 acuosa incluye arginina alrededor de 45 mM, alrededor de 2 % de sacarosa (p/v), alrededor de 5 % de manitol p/v) y alrededor de 20 mg/mL de un r-Antídoto de dos cadenas, donde la formulación tiene un pH de alrededor de 7.8. En un aspecto, la formulación acuosa incluye arginina alrededor de 45 mM, alrededor de 2 % de sacarosa (p/v), alrededor de 5 % de manitol p/v) y alrededor de 40 mg/mL de un r-Antídoto de dos cadenas, donde la formulación tiene un pH de alrededor de 7.8. En
25 un aspecto, la formulación acuosa incluye además 0,01 %-0,02 % (p/v) de polisorbato 80 y un amortiguador.

En algunos aspectos, también se proporcionan composiciones liofilizadas preparadas mediante liofilización del a formulación acuoso de la presente descripción. En función de las concentraciones
30 de cada agente en la formulación acuosa, se puede determinar fácilmente el contenido relativo del agente en la composición liofilizada.

En un aspecto, la composición liofilizada incluye al menos 5 %, o de manera alternativa al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, o 35 % (p/p) del antídoto de fXa. Entonces, entre los otros
35 ingredientes principales, por ejemplo, puede haber un relación en peso para HCl de L-

arginina:sacarosa:manitol en el intervalo de (0,5-1,4):(1-3):(2-6). En algunos aspectos, la relación en peso de HCl de L-arginina:sacarosa:manitol se encuentra en el intervalo de (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5), o (0,91-0,99):(1,6-2,4):(4,6-5,4), o (0,92-0,98):(1,7-2,3):(4,7-5,3), (0,93-0,97):(1,8-2,2):(4,8-5,2), o (0,94-0,96):(1,9-2,1):(4,9-5,1). En algunos aspectos, la composición liofilizada incluye además un tensioactivo y/o la parte sólida de un amortiguador.

La presente descripción también se refiere a métodos terapéuticos para tratar, prevenir o reducir la hemorragia en un sujeto que recibe terapia anticoagulante con un inhibidor de fXa que comprende administrarle a un sujeto una cantidad eficaz de la formulación liofilizada tras haberse disuelto en un solvente adecuado. Se contempla que los antídotos o derivados de la presente descripción pueden ser fármacos de corta duración que se utilizarán en situaciones electivas o de emergencia, que pueden neutralizar de manera segura y específica las propiedades anticoagulantes convencionales de un inhibidor de fXa sin provocar efectos secundarios hemodinámicos perjudiciales o exacerbación de la respuesta vascular proliferativa a las lesiones.

Tal como se usa en la presente, los términos «tratar», «tratamiento» y similares se utilizan en la presente para hacer referencia a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o signo o síntoma de este y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o total de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

«Tratamiento» también abarca cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero e incluye: (a) evitar que el trastorno ocurra en un sujeto que pueda estar predispuesto al trastorno, pero es posible que aun no se lo hayan diagnosticado, por ejemplo, evitar la hemorragia en un paciente con sobredosis de anticoagulante; (b) inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo, por ejemplo., inhibir la hemorragia; o (c) aliviar o mejorar el trastorno, por ejemplo, reducir la hemorragia.

Tal como se usa en la presente, «tratar» incluye además la mejora sistémica de los síntomas asociados a la patología y/o un retraso en el comienzo de los síntomas. La evidencia clínica y sub-clínica del «tratamiento» variará según la patología, el individuo y el tratamiento.

La «administración» se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente durante todo el curso del tratamiento. Los expertos en la técnica conocen métodos para determinar los medios y las dosis de administración más eficaces, los que variarán conforme a la composición

utilizada en la terapia, el objetivo de la terapia, la célula objetivo que se trata y el sujeto que se trata. Se puede realizar una única administración o múltiples administraciones con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. En la técnica se conocen las formulaciones de dosificación y los métodos adecuados para administrar los agentes. Un «sujeto» de diagnóstico o tratamiento es una célula o un mamífero, que incluye un ser humano. Los animales no humanos sujetos a diagnóstico o tratamiento incluyen, por ejemplo, murino, tal como ratas, ratones, caninos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales de deporte y mascotas.

Los agentes y composiciones de la presente descripción se pueden utilizar en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de humanos y otros animales mediante la administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tal como un ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

Un agente de la presente descripción se puede administrar para terapia mediante cualquier vía adecuada, específicamente mediante administración parental (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). También se entenderá que la vía preferida variará según la afección y la edad del receptor y la enfermedad que se trata.

La frase «polímero farmacéuticamente aceptable» se refiere al grupo de compuestos que pueden conjugarse con uno o más polipéptidos descritos en la presente. Se contempla que la conjugación de un polímero con el polipéptido puede extender la semivida del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos no taxativos incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, polivinilalcoholes, derivados de celulosa, poliacrilatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles y mezclas de estos.

«Agentes anticoagulantes» o «anticoagulantes» son agentes que inhiben la formación de coágulos sanguíneos. Los ejemplos de anticoagulantes incluyen, de modo no taxativo, inhibidores específicos de trombina, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa o factor VIIa, heparina y derivados, antagonistas de la vitamina K, y anticuerpos del factor antitislular. Los ejemplos de inhibidores específicos de trombina incluyen, hirudina, bivalirudina (Angiomax®), argatroban y lepirudina (Refludan®). Los ejemplos de heparina y derivados incluyen heparina no fraccionada (UFH, por sus siglas en inglés), heparina de bajo peso molecular (LMWH, por sus siglas en inglés), tal como enoxaparina (Lovenox®), dalteparina (Fragmin®), y danaparoide (Orgaran®); y pentasacárido sintético, tal como fondaparinux (Arixtra®). Los ejemplos de antagonistas de la vitamina K incluyen warfarina (Coumadin®), fenocoumarol, acenocoumarol (Sintrom®), clorindiona, dicumarol, difenadiona, etil biscoumacetato, fenprocoumon, fenindiona, y tiocloamarol.

En una modalidad, el anticoagulante es un inhibidor del factor Xa. En una modalidad, el anticoagulante es betrixaban.

5 «Terapia anticoagulante» se refiere a un régimen terapéutico que se administra a un paciente para evitar los coágulos sanguíneos o trombosis no deseada. Una terapia anticoagulante comprende administrar uno o una combinación de dos o más agentes anticoagulantes u otros agentes con una dosificación y cronograma adecuado para tratar o evitar los coágulos sanguíneos o trombosis no deseados en el paciente.

10 El término «inhibidores del factor Xa» o «inhibidores del factor Xa» se refiere a compuestos que pueden inhibir, ya sea directamente o indirectamente la actividad del factor de coagulación Xa de catalizar la conversión de protrombina en trombina *in vitro* y/o *in vivo*.

15 Los «inhibidores del factor Xa directos» se unen al fXa directamente y los ejemplos no taxativos incluyen NAP-5, rNAPc2, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), DX- DX-9065a (tal como se describe en, por ejemplo, Herbert, J.M., et ál, *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 276(3):1030-8), YM-60828 (tal como se describe en, por ejemplo, Taniuchi, Y., et ál, *Thromb Haemost.* 1998 79(3):543-8), YM-150 (tal como se describe en, por ejemplo, Eriksson, B.I. et. ál, *Blood* 2005;106(11), Resumen 1865), apixaban, rivaroxaban, TAK-442, PD-348292 (tal como se describe en, por ejemplo, Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007),
20 otamixaban, edoxaban (tal como se describe en, por ejemplo, Hylek EM, *Curr Opin Invest Drugs* 2007 8(9):778-783), LY517717 (tal como se describe en, por ejemplo, Agnelli, G., et ál, *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4):746-53), GSK913893, razaxaban, betrixaban o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, y combinaciones de estos En un aspecto particular, el inhibidor del factor Xa
25 directo es rivaroxaban. En algunos aspectos, el inhibidor del factor Xa directo es un compuesto químico de moléculas pequeñas.

La inhibición de los «inhibidores del factor Xa indirectos» de la actividad de fXa es mediada por uno o más factores distintos. Los ejemplos no taxativos de los inhibidores del factor de Xa indirecto
30 incluyen fondaparinux, idraparinux, idraparinux biotinilado, enoxaparina, fragmin, tinzaparina, heparina de bajo peso molecular («LMWH»), y combinaciones de estos. En un aspecto particular, el inhibidor del factor Xa indirecto es enoxaparina.

En una modalidad, el inhibidor del factor Xa se selecciona de betrixaban, rivaroxaban, LMWH, DX-9065a, YM-60828, YM-150, PD-348292, otamixaban, edoxaban, LY517717, GSK913893, razaxaban, apixaban, y combinaciones de estos.

El término «betrixaban» se refiere al compuesto «[2-({4-
5 [(dimetilamino)iminometil]fenil}carbonilamino)-5-metoxifenil]-N-(5-cloro(2-piridil))carboxamida» o sales farmacéuticamente aceptables de estos. Betrixaban se describe en la patente estadounidense n.º 6,376,515, 6,835,739 y 7,598,276, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Se sabe que betrixaban es un inhibidor específico del factor Xa.

10 «Neutralizar», «revertir» o «contrarrestar» la actividad de un inhibidor de fXa o frases similares se refieren a inhibir o bloquear la función inhibidora o anticoagulante del factor Xa de un inhibidor del fXa. Dichas frases se refieren a la inhibición o bloqueo parcial de la función, así como también a la inhibición o bloqueo de la mayoría o la totalidad de la actividad inhibidora del fXa, *in vitro* y/o *in*
15 *vivo*.

Una «cantidad eficaz» se refiere a la cantidad de un derivado suficiente para inducir un resultado biológico y/o terapéutico deseado. El resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente descripción, el resultado típicamente implicará uno o más de los siguientes:
20 neutralización de un inhibidor del fXa que ha sido administrado a un paciente, reversión de la actividad anticoagulante del inhibidor del fXa, eliminación del inhibidor del fXa del plasma, restauración de hemostasia, y reducción o cese de la hemorragia. La cantidad eficaz variará dependiendo el agente antídoto específico usado, el inhibidor del fXa específico que se administró al sujeto, el régimen de dosificación del inhibidor del fXa, tiempo de administración del antídoto, el
25 sujeto y la enfermedad que se trata, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la manera de administración y similares, todas las cuales pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

En determinados aspectos, la solución se administra para administrar una cantidad del antídoto del
30 fXa de alrededor de 10 miligramos (mg) a alrededor de 2 gramos (g). Otras cantidades del r-antídoto usado incluyen de alrededor de 100 mg a alrededor de 1,5 g; de alrededor de 200 mg a alrededor de 1 g; y de alrededor de 400 mg a alrededor de 900 mg. En algunos aspectos, la cantidad del r-antídoto usado es alrededor de 400 mg o 960 mg. En algunos aspectos, la cantidad del r-antídoto usado es alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg; de alrededor de 15 mg a
35 alrededor de 95 mg; y de alrededor de 20 mg a alrededor de 80 mg.

La formulación, cuando se administra, neutraliza el inhibidor del factor Xa en al menos alrededor de 20 %, o en al menos alrededor de 50 %, o en al menos alrededor de 75 %, o en al menos alrededor de 90 %, o en al menos alrededor de 95 %.

5

Se puede determinar si el método, es decir, la inhibición o reversión de un inhibidor del factor Xa se logra mediante una cantidad de ensayos *in vitro*, tal como ensayo de generación de trombina, y ensayos de coagulación clínicos tales como aPTT, PT y ACT.

- 10 Un aspecto de la presente descripción se refiere a métodos para unir e inhibir de manera selectiva un inhibidor del fXa administrado de manera exógena en un sujeto que recibe terapia anticoagulante con un inhibidor del fXa que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una solución de la formulación liofilizada. Los pacientes adecuados para esta terapia han recibido anteriormente terapia anticoagulante, por ejemplo, se les ha administrado uno o más de
- 15 un anticoagulante, tal como inhibidor de fXa directo o indirecto.

En otro aspecto, el método proporcionado en la presente une e inhibe de manera selectiva un inhibidor del factor Xa administrado de manera exógena en un sujeto que recibe terapia anticoagulante con un inhibidor del factor Xa que comprende administrarle una solución de la

20 formulación liofilizada al sujeto. El sujeto puede ser una célula o un mamífero, tal como un ser humano.

- Los sujetos que se beneficiarán de la administración de la formulación liofilizada disuelta descrita en la presente y los métodos que los acompañan incluyen aquellos que están experimentando, o
- 25 están predispuestos a un evento grave de hemorragia clínica o un evento no grave de hemorragia clínicamente significativo. Los ejemplos de eventos graves de hemorragia clínica se selecciona del grupo que consiste en hemorragia, sangrado en los órganos vitales, sangrado que requiere nueva operación o un nuevo procedimiento terapéutico, y un índice de sangrado de $\geq 2,0$ con un sangrado evidente asociado. (Turpie AGG, *et al*, *NEJM*, 2001, 344: 619-625). De manera adicional,
- 30 el sujeto puede estar experimentando o estar predispuesto a un evento no grave de hemorragia que se selecciona del grupo que consiste en epistaxis que es persistente o recurrente y en cantidad sustancial o que no se detendrá sin intervención, hemorragia del tracto rectal o urinario que no aumenta a un nivel que requiera un procedimiento terapéutico, hematomas sustanciales en sitios de inyección o en otro lugar que son espontáneos o que se producen con trauma trivial,

pérdida de sangre sustancial más que la asociada frecuentemente a un procedimiento quirúrgico que no requiere drenaje, y hemorragia que requiere transfusión no planificada.

5 En algunas modalidades, la formulación liofilizada disuelta se administra después de la administración de una sobredosis de un inhibidor de fXa o antes de una cirugía, que puede exponer a los sujetos al riesgo de hemorragia.

EJEMPLOS

10 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar modalidades específicas de la descripción. Los expertos en la técnica deben observar que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas que funcionan de forma correcta en la práctica de la descripción y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos específicos de ponerla en práctica. No obstante, los expertos en la técnica, en función de la presente descripción, deben observar que se
15 pueden realizar diversos cambios en las modalidades específicas descritas y seguir obteniendo un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la descripción.

Ejemplo 1: Purificación del r-Antídoto a partir del cultivo celular

20 Este ejemplo demuestra el desarrollo de las condiciones de cultivo y el proceso de purificación posterior para elaborar el r-Antídoto. Un medio de cultivo comercial hecho especialmente para células CHO se analizó para las células CHO transfectadas con una construcción que contiene una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 7) que codifica el precursor del r-Antídoto (SEQ ID NO: 2) que, tras la eliminación del enlazador -RKRRKR- (SEQ ID NO: 6), genera el r-Antídoto de
25 dos cadenas (SEQ ID NO: 3). El medio ProCHO™, en condiciones adecuadas, pudo producir una titulación tan alta como 75-95 mg/L.

Un proceso de purificación posterior («proceso posterior») se desarrolló para purificar el antídoto a partir de las células cultivadas. En algunas ejecuciones iniciales, se analizaron diversas
30 membranas y columnas.

En dos ejecuciones de prueba, se descubrió que la cosecha clarificada contamina las membranas cuando el producto se concentra mediante ultrafiltración (UF), o contamina el medio de cromatografía si se evita la UF y el producto se concentra mediante la primera etapa de
35 cromatografía. Se realizaron experimentos para determinar la causa de la contaminación y

determinar las etapas para eliminarla ya que la concentración del producto se creía necesaria más temprano en el proceso. Posteriormente, se determinó que la contaminación era provocada por una impureza de proteína de alto peso molecular que se secretó en el medio durante el cultivo celular. Esta proteína de HMW era solamente parcialmente soluble en la cosecha clarificada, y tras la concentración se hizo más y más insoluble, lo que provoca contaminación inaceptable de la membrana de UF o columna de cromatografía.

Después de una evaluación de filtros de varias profundidades, membranas de intercambio de iones, y medio de cromatografía, se descubrió que un filtro de profundidad particular (filtro de grado X0HC Millipore™) podría retirar la mayoría de la impureza y al mismo tiempo lograr un rendimiento de producto aceptable. Luego el producto podría concentrarse mediante UF hasta 10 veces. Este filtro reemplazó uno de los filtros originales en el proceso de clarificación y se implementó por dos ejecuciones adicionales.

La **Figura 1** ilustra el proceso de purificación resultante 100 de este esfuerzo de desarrollo. Después de que las células se cosechan (etapa 101) y se clarifican usando un filtro X0HC Millipore™ para retirar la impureza de HWM, la muestra se concentra 10 veces (etapa 102). La concentración puede usar celulosa regenerada. En la etapa 103, se puede llevar a cabo la inactivación viral (con un detergente/solvente; concentración final: Tritón X-100 al 1 %, fosfato de tributilo al 0,3 %) para inactivar los virus con envoltura en el cultivo celular. Después de la eliminación de los virus, se realizan las etapas 104 (intercambio catiónico de modo mixto), 105 (intercambio aniónico de modo mixto) y 106 (intercambio de iones de modo mixto) para retirar las proteínas de célula hospedadora y ADN y capturar el antídoto. En la etapa 107, se puede utilizar una resina de interacción hidrofóbica para retirar adicionalmente las proteínas de célula hospedadora restantes. Opcionalmente, después de estas etapas de purificación, se puede utilizar una etapa final de filtración de eliminación de virus para eliminar cualquier virus restante. Este proceso pudo recuperar alrededor de 30-35 % del antídoto expresado en el cultivo celular, lo que da como resultado la producción de alrededor de 22-33 mg de la proteína antídoto de cada litro de cultivo celular.

Ejemplo 2: Proceso de fabricación de aumento

En función del proceso mostrado en el Ejemplo 1, se desarrolló un proceso modificado con el fin de aumentar la producción.

El medio de cultivo del Ejemplo 1 pudo generar una titulación de alrededor de 75-95 mg/L. Para aumentar la producción, se analizó una cantidad de otros medios de cultivo de CHO. Uno de ellos presentó un aumento 2-3 veces en el crecimiento celular y densidad celular pico (titulación = 200-225 mg/L), y también permitió el aumento a 10.000 L.

5

Se desarrolló una cromatografía por afinidad para la extracción de gran volumen del antídoto. El ligando de afinidad incluyó el inhibidor de la tripsina Kunitz (21kDa; pI=4,5) extraído de soja entera o harina. El inhibidor de la tripsina de soja (STI) forma un complejo 1:1 con el antídoto. Se identificó una condición de elución del inhibidor no competitivo para la escalabilidad y compatibilidad, que incluía acetato de Na 25 mM, arginina 1M a pH 5,2.

10

En el proceso desarrollado en el Ejemplo 1, se utilizó una etapa de clarificación de cosecha con un filtro de profundidad para retirar la impureza de HMW, seguido de una concentración de 10 veces. Adicionalmente, la etapa de inactivación del virus empleó un detergente (Tritón X-100) así como también un solvente (fosfato de tributilo). Se evaluaron la idoneidad y la eficacia de estas etapas para determinar la captura por afinidad.

15

Los datos muestran que la filtración de profundidad no era necesaria y que el uso de un solvente y la etapa de concentración 10x redujo la recuperación del producto. Por lo tanto, en el desarrollo adicional, se eliminaron la filtración de profundidad y la etapa de concentración y la inactivación del virus utilizó solamente un detergente (Tritón X-100) sin un solvente. La inactivación del virus se logró mediante la adición de Tritón X-100 al 10 % en una relación de 52,7 ml de amortiguador por cada litro de producto (concentración final: Tritón X-100 al 0,5%). Este descubrimiento fue inesperado ya que los solventes se utilizan comúnmente para la preparación de muestras antes de cargarlas a una columna de afinidad. Cabe destacar también que cuando se cosechó el cultivo celular se utilizó una etapa de flujo a través de centrifugación para retirar los precipitados.

20

25

Después de un tiempo de mezclado de 15 minutos y un mínimo de espera de una hora a temperatura ambiente, el producto tratado se filtró a través de un tren de filtro compuesto por un pre-filtro de filtro NF Sartogruad (0,8/0,2 μ m) en un pre-filtro Sartopore 2 (0,45/0,22 μ m) en un recipiente de 500 L con filtro integral de 0,22 μ m, con cada carga de columna filtrada el día de uso. La elución del producto a partir de las resinas de afinidad de STI utilizó un amortiguador de elución que contenía arginina (acetato de sodio 25 mM/arginina 1,0 M pH 5,2).

30

Después de la captura por afinidad, se emplearon algunas etapas de pulido para retirar las impurezas restantes, que incluyen ADN, proteínas de célula hospedadora (HCP, por sus siglas en inglés) y lixiviado del ligando de afinidad. Se analizaron dos opciones de cromatografía, que incluyen intercambio de cationes e intercambio de iones de modo mixto. Sin embargo, no hubo ensayo de proteína de célula hospedadora específico del proceso disponible para la caracterización. Por lo tanto, se utilizaron ELISA comerciales como sustitutos, y se utilizó la cuantificación de LC-MS/MS de HCP específicas como caracterización complementaria. Adicionalmente, la evaluación de tinción argéntica 2D para caracterización cualitativa.

La Figura 3 muestra la evaluación de tres procesos posteriores (DSP, por sus siglas en inglés) potenciales. Se identificaron tres DSP en función de la depuración del lixiviado del ligando de afinidad. Para evaluar la calidad del producto y la depuración de impurezas relacionada con el proceso, el mismo grupo de eluato de afinidad se procesó en cada flujo y se comparó para determinar la recuperación del producto y la depuración de proteína de célula hospedadora CHO (HCP; expresada en partes por millón (ppm)) . Los eluatos de cada proceso DSP se analizaron de manera adicional para determinar la calidad del producto (Tabla más adelante).

% de picos mediante IEX	Muestra	Picos ácidos	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Picos básicos
	Eluato de afinidad	27.8%	17.8%	12.9%	16.6%	13.9%
	Eluato de intercambio de cationes	24.9%	14.5%	26.9%	20.8%	13.1%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-2	23.4%	15.7%	17.3%	20.4%	13.3%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-1	23.6%	15.2%	26.9%	20.0%	13.3%

% de monómero mediante SEC	Muestra	% HMW	% de monómero
	Eluato de afinidad	0.29%	99.71%
	Eluato de intercambio de cationes	4.30%	95.70%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-2	0.13%	99.87%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-1	0 %	100%

% de pico principal mediante RP	Pre-principal	Pico principal	Pico beta	
	Eluato de afinidad	0.8%	93.4%	5.7%
	Eluato de intercambio de cationes	1.2%	92.9%	5.9%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-2	0.5%	94.2%	5.3%
	Eluato de IEX de modo mixto DSP-1	0.9%	93.4%	5.8%

Notas de la tabla: Evaluación de la calidad del producto de los tres procesos posteriores evaluados. Los eluatos tomados de los tres DSP (Figura 3) se evaluaron para determinar el

impacto de la calidad del producto. No se observó impacto en la heterogeneidad basada en la carga (IEX, por sus siglas en inglés) o fase inversa (RP, por sus siglas en inglés) . Sin embargo, las muestras del DSP-2, que habían sido purificadas mediante una etapa de pulido de intercambio de cationes mostró un aumento en el % de agregados de alto peso molecular, mediante exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés).

En función del análisis, se desarrolló un proceso posterior de aumento, que se ilustra en la **Figura 2**. Este proceso es más simple que el mostrado en la Figura 1. Sin embargo, el rendimiento es 2 veces mayor. En combinación con el nuevo sistema de cultivo celular que tuvo un aumento de 2-3 veces de la producción de proteínas, el método descrito en el Ejemplo 2 pudo tener un aumento de 4 a 6 veces en la producción general del antídoto y permitió un aumento de producción con al menos 10.000 L.

En la **Figura 2**, el proceso posterior 200 emplea la etapa de inactivación del virus (202), después de la cosecha (201), que utiliza solamente un detergente (Tritón X-100) sin un solvente. En la etapa de captura por afinidad 203, se utilizan las resinas con un ligando de STI, y el antídoto eluye con un amortiguador de elución con arginina (pH 5). Se puede utilizar una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) opcional después de la captura por afinidad, que puede concentrar la proteína y llevar el pH a alrededor de 7.

En la etapa 204, se utiliza una membrana aniónica para retirar determinada impureza de la muestra (por ejemplo, ADN, HCP). Una membrana aniónica de ejemplo analizada fue la membrana Sartobind Q, que no presentó efecto perjudicial para el antídoto.

En la etapa 205, un tipo de ejemplo del intercambio de iones de modo mixto es un IEX-modo mixto con CHT hidroxipatita cerámica). Un amortiguador de elución de ejemplo es un amortiguador de sal de fosfato. Esta etapa es útil para retirar el lixiviado de STI.

En la etapa 206, la separación hidrofóbica se puede lograr con cromatografía de octil sefarosa como ejemplo, y la proteína puede eluir con un amortiguador que incluye NaCl. Esta etapa es útil para retirar las HCP restantes.

La siguiente tabla muestra la purificación y rendimiento de recuperación en algunas ejecuciones de prueba.

	Escala de referencia (10 L)	Piloto 1 (400 L)	Piloto 2 (400 L)
Captura de afinidad	178 mg/L de cultivo celular	122 mg/L de cultivo celular	150 mg/L de cultivo celular
Diafiltración	95 %	98 %	99 %
Sartobind-Q	-	-	95 %
Ilex-Modo mixto	92 %	95 %	93 %
Interacción hidrofóbica (Octilo)	100 %	103 %	99 %
Filtración viral	95 %	92 %	94 %
Uf/Df Final Sustancia de fármaco a granel	89 %	91 %	92 %
Rendimiento acumulado	60 %	69 %	66 %

Ejemplo 3: Caracterización de la proteína elaborada

En este ejemplo, se desarrollaron métodos para caracterizar el producto proteico generado a partir de los procesos desarrollados anteriormente. Los métodos analizados incluyeron enfoque isoelectrico (IEF), fase inversa reducida (Red-RP), y mapa de péptidos reducido (PMAP).

El enfoque isoelectrico se utilizó para determinar la heterogeneidad de carga de la proteína antídoto. El enfoque isoelectrico es una técnica electroforética para separar proteínas en función de su punto isoelectrico (pI), o el pH con el cual la proteína no tiene carga neta. El enfoque isoelectrico se realizó usando geles de pH 3-10 y reactivos según las instrucciones del fabricante Life Technologies para la electroforesis (geles de IEF Novex) y tinción con el kit de tinción de azul coloide (Invitrogen). Los resultados se compararon con marcadores Serva 3-10 pI.

Los lotes de prueba se diluyeron hasta 1.6 mg/mL en agua, luego 1:1 en amortiguador de prueba IEF pH 3 10. Cada muestra se cargó a 10 µL (8.0 µg) y se realizó electroforesis a 100 V durante 1 hora seguido de 200 V durante 1 hora y 500 V durante 30 minutos. Los geles se fijaron durante 30

minutos en solución fijadora (Sigma-Aldrich), se tiñeron durante 1 hora en tinción de azul coloide y se destiñeron en agua durante la noche.

La fase inversa reducida es un método de HPLC que utiliza la separación cromatográfica de fase inversa para la detección de formas de longitud completa y formas truncadas de la proteína. Las muestras se intercambiaron mediante amortiguador en HCl de guanidina 6 M/ Tris 50 mM pH 7,5 y se redujeron con DTT antes de la incubación a 50°C durante 30 minutos. Las muestra se alquilan usando vinilpiridina a temperatura ambiente durante 90 minutos en la oscuridad seguido de inactivación con DTT 1M. El método utiliza una columna de HPLC Agilent Zorbax C18 para unir proteínas a la fase inmóvil y un gradiente de 15 a 95 % de una fase móvil cada vez menos polar (ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo) para separar proteínas en función de su hidrofobicidad. La longitud de onda de UV es 214 nm.

El mapa de péptidos digeridos Lys-C utilizó el análisis UPLC-UV/MS^E de digestiones Lys-C. Este método pudo proporcionar más de 98 % de cobertura de secuencia y caracterizar modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, hidroxilación de aspartato y truncamiento de lisina de extremo C. Este método también pudo monitorear los marcadores indicadores de estabilidad tales como desamidación de asparagina y oxidación de metionina. Cada uno de los lotes se redujo, alquiló y se trató con Lisil endopeptidasa (Lys-C). Los péptidos generados mediante la digestión enzimática se separaron mediante RP-UPLC y se analizaron mediante espectroscopía de masas. Las siguientes tablas muestran el tipo de isoformas de proteína detectadas a partir de los productos de proteína purificados y sus porcentajes y secuencias (Lote #1: con proceso posterior desarrollado en el Ejemplo 1; Lote #2: con proceso posterior desarrollado en el Ejemplo 2). Cabe destacar que, en comparación con el proceso del Ejemplo 1, el proceso del Ejemplo 2 redujo considerablemente el porcentaje de la SEQ ID NO: 9 (de 9,0 % a 2,7 %), posiblemente debido a una mayor eficacia de purificación.

Isoformas de cadena ligera:

	Lote N.º1	Lote N.º2
Cadena ligera intacta (SEQ ID NO: 4)	46,8 %	37,9 %
Cadena ligera modificada o truncada	53,2 %	62,1 %

Isoformas de cadena pesada:

		Lote N.º1	Lote N.º2
5	Cadena pesada intacta (SEQ ID NO: 5) con 2 glicosilaciones unidas a O	10,2 %	22,0 %
	Cadena pesada intacta (SEQ ID NO: 5) con 1 glicosilación unida a O	18,3 %	22,6 %
10	K de extremo C truncada (SEQ ID NO: 8) con 1 glicosilación unida a O	57,8 %	46,9 %
	Pérdida de 13 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 9)	9,0 %	2,7 %
15	Pérdida de 14 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 10)	0,6 %	0,8 %
	Pérdida de 15 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 11)	4,0 %	5,0 %

20

	Cadena pesada sin K de extremo C (SEQ ID NO: 8)				
	181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ			
	241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFTKETD FDI AVLRLKT
		PITFRMNVAP			
25	301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML
		KLSSSFIITQ			
	361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG
		EGCARKGKYG			
		IYTKVTAFLK			
	421	WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPL			

30

35

Cadena pesada sin 13 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 9)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
5	241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTR LKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
10	421 WIDRSMKTRG LPKAK

Cadena pesada sin 14 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 10)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
15	241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTR LKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
20	421 WIDRSMKTRG LPKA

Cadena pesada sin 15 residuos de extremo C (SEQ ID NO: 11)	
181	IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ
25	241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDI AVLRLKT PITFRMNVAP
	301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTR LKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ
	361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK
30	421 WIDRSMKTRG LPK

Ejemplo 4: Validación de proceso aumentado

Este ejemplo describe un proceso en función de los procesos tal como se muestran en los Ejemplos 1 y 2 para validación adicional.

5

Inactivación viral mediante el detergente

La etapa de inactivación viral se realizó al agregar Tritón X-100 al 10 % a la proteína cosechada. La proteína cosechada correspondiente a 1 ciclo de STI Capto (tal como se describió anteriormente) se filtró del tanque de cosecha al tanque de adición de Tritón X-100 al 10 % a través de filtros Sartoguard NF de 4x30" que se utilizaron como pre-filtros y luego se filtraron a través de filtros Sartoguard NF de 3x20" 0,8/0,2 µm. Después de la adición de Tritón X-100 al 10 % el grupo se mezcló y luego se transfirió al tanque de espera a través de filtros de 0,8/0,2 µm Sartoguard NF de 3x30". Una vez que se completó el tiempo de espera el grupo inactivado se carga en la columna de STI Capto a través de filtros de 0,8/0,2 µm filtro Sartoguard NF de 6x30" en serie con filtros de 0,45/0,2 µm Sartopore 2 de 3x30". Esta secuencia se repitió hasta que se completen los 4 ciclos que se realizarán durante la operación de STI Capto. Los filtros de 0,8/0,2 µm Sartoguard NF de 6x30" se colocaron después de cargar el segundo ciclo.

20 *Cromatografía de STI Capto*

La cromatografía en columna de afinidad se realizó usando una resina de STI Capto a temperatura ambiente. Durante la fase de carga, el producto se unió a la resina mientras los contaminantes volaban. El producto se recuperó al alterar las interacciones de proteína con una concentración alta de arginina en el amortiguador de elución. Antes del uso, la columna se enjuagó con agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés), se lavó con ácido fosfórico 100mM pH 3.0, y se enjuagó con WFI. La columna se pre-equilibró inicialmente con el amortiguador de pre-equilibrio (HCl de Tris 20 mM, pH 7,4), luego se equilibró con el amortiguador de equilibrio (HCl de Tris 20 mM NaCl 200 mM, pH 7,4), y una vez que el pH y la conductividad de la columna estuvieron dentro de las especificaciones, se cargó con la cosecha clarificada tratada con Tritón-X 100 (HCCF). Cada ciclo del material de HCCF se transfirió desde su tanque de espera de inactivación viral directamente a la columna.

Después de la carga, la columna se lavó con el amortiguador de equilibrio, y eluyó con amortiguador de elución con arginina alta y pH bajo (amortiguador de elución: Acetato de sodio

25mM arginina 1,0M pH 5,2). Al final del ciclo, y antes del siguiente ciclo, la columna se enjuagó con WFI, se limpió nuevamente con ácido fosfórico 100mM pH 3,0, y se enjuagó nuevamente con WFI. Todos los eluatos de varios ciclos se agruparon juntos. Después de recolectar el último ciclo, se realizó una persecución de amortiguador, evitando la columna, con el fin de descargar el producto eluido de las líneas posteriores de la columna dentro del recipiente de recolección. Después de que se completaron todos los ciclos, la columna se enjuagó con WFI, se limpió con ácido fosfórico 100mM pH 3,0, se enjuagó con WFI, se neutralizó con amortiguador de pre-equilibrio y equilibrio y se almacenó en solución de almacenamiento de etanol.

El grupo de eluato de STI Capto se mezcló con HCl de arginina 1,0M pH 7,0 hasta una concentración final de HCl de arginina 100mM para estabilizar el grupo. El grupo resultante luego se concentró y se diafiltró en una membrana Ultracel Pellicon 3 de 10KDa para retirar la mayoría de la arginina, lo que permite la carga en las etapas de cromatografía posteriores.

15 *Cromatografía de membrana Sartobind Q*

La cromatografía de membrana de intercambio de aniones se realizó usando un cartucho Sartobind Q Jumbo a temperatura ambiente. Durante la fase de carga, el producto se voló a través de la membrana mientras los contaminantes se unían. Antes de usarlo el cartucho se enjuagó con el amortiguador de equilibrio para retirar el humectante de almacenamiento. El cartucho se limpió con NaOH 0,5M. Luego el cartucho se equilibró con el amortiguador de equilibrio y, una vez que el pH y la conductividad del cartucho estuvieron dentro de las especificaciones, se cargó con el eluato de STI Capto concentrado y diafiltrado. Un ciclo de material de carga se cargó directamente desde el tanque de recolección post UF/DF. Luego de la carga, el cartucho se lavó con el amortiguador de equilibrio. Después de recolectar el producto, se realizó una persecución de amortiguador, evitando el cartucho, con el fin de descargar el producto de las líneas posteriores del cartucho dentro del recipiente de recolección.

Cromatografía de hidroxiapatita cerámica (CHT)

La cromatografía en columna de modo mixto se realizó usando resina de 40µm de CHT Tipo I a temperatura ambiente. Durante la fase de carga, el producto se unió a la resina mientras algunos contaminantes volaban. El producto se recuperó al aumentar la concentración de sodio en un gradiente lineal. Antes del uso, la columna se limpió con NaOH 1,0M y se enjuagó con un pequeño volumen de amortiguador de equilibrio. La columna se pre-equilibró inicialmente con el

amortiguador de pre-equilibrio, y luego se equilibró con el amortiguador de equilibrio, y una vez que el pH y la conductividad de la columna estuvieron dentro de las especificaciones, se cargó con el eluato Sartobind Q.

- 5 Cada ciclo de carga se transfirió desde su tanque de recolección directamente a la columna. Luego de la carga, la columna se lavó con el amortiguador de equilibrio. Luego se ejecutó un gradiente 90 % de amortiguador de equilibrio (MES 50 mM, fosfato de sodio 5 mM, pH 7,0) a 90 % de amortiguador de elución (MES 50mM, fosfato de sodio 5mM , cloruro de sodio 2M pH 7,0). Al final del ciclo, y antes del siguiente ciclo, la columna se enjuagó con amortiguador de equilibrio
- 10 antes de retirarse con amortiguador de lavado post-elución con fosfato alto, se enjuagó con amortiguador de equilibrio, se limpió nuevamente con NaOH 1,0M, y se enjuagó nuevamente con amortiguador de equilibrio Todos los eluatos de varios ciclos se agruparon juntos. Después de recolectar el último ciclo, se realizó una persecución de amortiguador, evitando la columna, con el fin de descargar el producto eluido de las líneas posteriores de la columna dentro del recipiente de
- 15 recolección. Después de que se completaron todos los ciclos, la columna se enjuagó con amortiguador de equilibrio, se limpió con NaOH 1,0M, y se almacenó en solución de almacenamiento cáustica/fosfato.

Cromatografía de octil sefarosa 4FF

- 20 La cromatografía de interacción hidrofóbica se realizó usando resina de octil sefarosa FF a temperatura ambiente. Durante la fase de carga, el producto se voló a través de la resina mientras los contaminantes se unían. Antes de usarla la columna se limpió con NaOH 1,0M. La columna se pre-equilibró inicialmente con WFI, y luego se equilibró con el amortiguador de equilibrio, y una vez
- 25 que el pH y la conductividad de la columna estuvieron dentro de las especificaciones, se cargó con el eluato CHT. Cada ciclo de carga se transfirió desde su tanque de recolección directamente a la columna. Luego de la carga, la columna se lavó con el amortiguador de equilibrio. Al final del ciclo, y antes del siguiente ciclo, la columna se retiró con WFI, y se limpió nuevamente con NaOH 1,0M. Después de recolectar el último ciclo, se realizó una persecución de amortiguador, evitando la
- 30 columna, con el fin de descargar el producto de las líneas posteriores del cartucho dentro del recipiente de recolección. Después de que se completaron todos los ciclos, la columna se retiró con WFI, se limpió con NaOH 1,0M, y se almacenó en solución de almacenamiento cáustica.

Filtración de reducción viral Planova 20N (VRF)

La filtración de reducción de virus se realizó en un filtro de reducción de virus Planova 20N. El filtro se operó en el modo de punto muerto, el producto pasó a través del filtro mientras que las partículas virales restantes se retuvieron en las fibras. El filtro se enjuagó con el amortiguador de equilibrio de octil sefarosa antes de usarlo. Luego el producto se pasó a través del filtro y luego se enjuagó con un amortiguador de equilibrio adicional. Se analizó la integridad del filtro y se desechó después de su uso.

El filtrado de VRF se concentró en una membrana Ultracel Pellicon 3 de 10 KDa. Después de la concentración parcial se diafiltró en la formulación final. Luego el producto se concentró hasta la concentración objetivo final y se recuperó.

* * *

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado que comprende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Las invenciones descritas de forma ilustrativa en la presente pueden llevarse a la práctica de manera adecuada sin cualquier elemento o limitación que no se describa de forma específica en la presente. Por lo tanto, por ejemplo, los términos «que comprende», «que incluye», «que contiene», etc. deben interpretarse en sentido amplio y de modo no taxativo. De forma adicional, los términos y las expresiones que se utilizan en la presente se emplean como términos descriptivos y no taxativos y no se pretende utilizar dichos términos y expresiones para excluir ningún equivalente de las características que se ilustran y se describen o partes de estas, sino que se reconoce la posibilidad de realizar diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

Por lo tanto, se debería entender que si bien la presente invención fue descrita específicamente mediante modalidades preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación, mejora y variación de la invención descrita en la presente, y que se considera que dichas modificaciones, mejoras y variaciones se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos que se proporcionan en la presente son representativos de las modalidades preferidas, son ejemplos y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

La invención se ha descrito de forma amplia y genérica en la presente. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos comprendidos dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una
5 condición o limitación negativa que elimina cualquier materia del género, independientemente de si el material eliminado se menciona o no específicamente en la presente.

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describan en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención se describe también en términos
10 de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Todas la publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad mediante referencia, en el mismo grado que si cada una de estas se incorporaran mediante referencia de forma individual. En caso de conflicto,
15 prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

Se debe comprende que, si bien la descripción se describió en conjunto con las modalidades anteriores, la descripción y los ejemplos precedentes pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la descripción. Otros aspectos, ventajas y modificaciones comprendidos en el alcance de la
20 descripción resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la descripción.