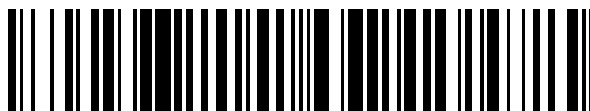


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 829 923**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2015 PCT/IN2015/050137**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15852227 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020 EP 3209767**

54 Título: **Un proceso novedoso de purificación para el aislamiento y la producción comercial de tnp-tpa recombinante (tenecteplase)**

30 Prioridad:

21.10.2014 IN 2343MU2014

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

02.06.2021

73 Titular/es:

**GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.
(100.0%)**

**P-1 IT-BT Park MIDC Phase-2
Hinjawadi, Pune - 411057, IN**

72 Inventor/es:

**RAGHUWANSHI, ARJUN;
SINGH KUMAR, SHRAWAN;
KUMAR, ANKIT;
SAHOO RANJAN, MIHIR y
SINGH, SANJAY**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 829 923 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

Un proceso novedoso de purificación para el aislamiento y la producción comercial de tnk-tpa recombinante (tenecteplase)

5 Campo de la invención

10 La presente invención está relacionada con un proceso novedoso de aislamiento, purificación y producción del activador de plasminógeno tisular (TNK-tPA) a partir de células de mamíferos, más específicamente de células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

Antecedentes de la invención

15 La Tenecteplase (TNK-tPA) es una glicoproteína recombinante de la familia de las serino proteasas con sustitución de seis aminoácidos en el activador del plasminógeno tisular humano nativo (t-PA) con 17 puentes disulfuro y un peso molecular de ~ 67 kDa. En el desarrollo de TNK-tPA, las modificaciones realizadas en el t-PA nativo incluyen la sustitución de la treonina 103 por asparagina, la sustitución de la asparagina 117 por glutamina tanto dentro del dominio kringle 1, y la sustitución de lisina, histidina y dos argininas por tetra- aminoácidos de alanina en posiciones 296-299 en el dominio de proteasa para hacer que la proteína resultante sea altamente específica por fibrina con una vida media plasmática más larga y una susceptibilidad disminuida en un 80 % a la degradación por el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) en comparación con el t-PA nativo.

25 La TNK en la TNK-TPA se refiere a los sitios de la molécula de t-PA que han sido modificados es decir T103; N117; y KHRR 296-299. Las modificaciones antes mencionadas de TNK-tPA hacen que su uso como un agente terapéutico mejorado para el tratamiento del infarto agudo de miocardio tiene un mejor cumplimiento terapéutico porque la mayor especificidad de la fibrina permite una lisis más rápida y completa del coágulo con una disminución de las complicaciones hemorrágicas y la vida útil prolongada permite una sola dosis en bolo con menos fibrinólisis sistémica y menores complicaciones hemorrágicas de los fármacos anticoagulantes anteriores.

30 El mecanismo de TNK-tPA se inicia en la unión de TNK-tPA al componente de fibrina del trombo (coágulo de sangre) que convierte selectivamente el plasminógeno inactivo en plasmina y, en consecuencia, la plasmina resultante degrada la matriz del trombo en la arteria ocluida mientras conserva el fibrinógeno y minimiza activación sistémica del plasminógeno debido a su naturaleza altamente específica.

35 Los beneficios de TNK-tPA observados en pacientes con infarto de miocardio y los alentadores resultados de estudios en animales en el contexto del Accidente Cerebrovascular Isquémico Agudo (AIS), sugirieron que TNK-tPA podría resultar una terapia más segura y efectiva que la alteplasa, el único fármaco aprobado por la USFDA para AIS. En los últimos años, varios ensayos clínicos evaluaron el uso de TNK-tPA en AIS y demostraron que TNK-tPA tiene un mejor perfil farmacológico que la alteplasa y también sugirieron que podría ser una opción terapéutica efectiva y segura en el tratamiento de AIS en pacientes que informan dentro de las 4,5 h posteriores al inicio de los síntomas. Recientemente, se ha considerado al TNK-tPA para el tratamiento de pacientes con embolia pulmonar y varios ensayos clínicos mostraron resultados prometedores. Todavía se está realizando un gran número de ensayos clínicos para evaluar la imagen concluyente completa de TNK-tPA en varias indicaciones.

45 En los últimos años, el desarrollo y la fabricación de glicoproteínas recombinantes se llevó a cabo mediante procesos de biorreactores de forma discontinua, discontinua alimentado, por semidiscontinuo alimentado y de perfusión y para la purificación de estas proteínas se empleó principalmente la cromatografía de adsorción e intercambio iónico.

50 Para el t-PA y sus variantes se conocen ciertos protocolos de purificación en el estado de la técnica, por ejemplo, purificación por inmunoadfinidad (anticuerpo policlonal de cabra anti-tPA), intercambio iónico, precipitación con etanol, cromatografía en fase inversa, cromatografía sobre sílice o intercambio aniónico, tal como dietilaminoetilo, precipitación con sulfato de amonio, sephadex-G-75 etc.

55 Algunos de los enfoques para la purificación de TNK t-PA que se enumeran en la técnica anterior incluyen el documento WO 2011/015922, que establece un proceso de purificación donde se usan una serie de etapas de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de inmunoadfinidad y ultrafiltración/diafiltración para la purificación de TNK- tPA. El documento WO 2012/066569 A, establece un proceso de purificación que se basa principalmente en el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica.

60 Las solicitudes de patente indias 1807/MUM/2006 y 3516/MUM/2010 (del Solicitante) describen métodos para purificar TNK-tPA. En el documento 1807/MUM/2006 el método comprende cromatografía de afinidad y cromatografía de quelatos metálicos. El método del documento 3516/MUM/2010 comprende dos etapas de cromatografía de afinidad seguidas de cromatografía de intercambio aniónico con resina Capto Q.

65 Sánchez y col. (Proyecto Final de Biotecnología, 2013, Universidad Autónoma de Barcelona), resumen que muestra un proceso de purificación de TNK-tPA que comprende tres etapas de cromatografía de afinidad y una etapa de aclaramiento viral.

Behrouz (J Neurol. 2014;261(6): 1069-72) relaciona con la utilidad de la Tenecteplase en el accidente cerebrovascular isquémico. Además, se comparan la alteplasa y Tenecteplase.

La cromatografía de inmunoafinidad usada en la técnica anterior no es una técnica adecuada para la fabricación comercial de TNK-tPA. No solo podría plantear muchas preocupaciones regulatorias, sino que el costo de los medios de cromatografía de inmunoafinidad también es muy alto en comparación con las matrices de cromatografía convencionales debido al uso de anticuerpos monoclonales para la preparación. La cromatografía de interacción hidrofóbica descrita en cierta técnica anterior para la purificación de TNK-tPA usa alcohol isopropílico (IPA) en el proceso, que es un disolvente orgánico y conocido por inducir la agregación y desnaturalización de proteínas y puede considerarse como una de las desventajas de la técnica anterior. El TNK-tPA es una molécula muy inestable y, por lo tanto, debe evitarse el uso de IPA en el proceso de purificación, ya que puede provocar la desnaturalización de la proteína. Además, el uso de gran volumen de IPA a escala comercial requeriría el reciclaje de IPA, lo que nuevamente exige un consumo de energía adicional y una inversión adicional, tal como una unidad de recuperación de solventes.

Por lo tanto, ninguno de los procesos antes mencionados es capaz de proporcionar una solución de purificación eficiente, escalable y robusta, que podría producir consistentemente el fármaco TNK-tPA a escala comercial, cumpliendo con todas las especificaciones requeridas.

Por tanto, existe la necesidad de un proceso efectivo y comercialmente viable para la purificación de TNK-tPA.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es desarrollar un proceso de purificación efectivo, robusto, escalable y comercialmente viable para la producción de TNK-tPA, lo que da como resultado un rendimiento no inferior al 60 % y una pureza superior al 95 % medida por cromatografía de Exclusión por Tamaño.

Resumen de la invención

La presente invención resuelve el objeto como se reivindica en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un proceso novedoso de aislamiento y purificación del activador de plasminógeno tisular y sus variantes, más específicamente TNK-tPA de células CHO y describe un proceso de purificación de TNK-tPA de aplicación industrial, simple, rentable, robusto y altamente efectivo.

Un proceso para el aislamiento y purificación de TNK-tPA de la presente invención, como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

i) someter el cultivo libre de células obtenida de cultivo de células CHO a cromatografía de afinidad para capturar TNK-tPA y obtener un eluato que contiene TNK-tPA parcialmente purificado;

en donde la cromatografía de afinidad comprende Blue Sepharose 6 FF como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato de sodio, cloruro de sodio y urea;

ii) someter el eluato de la etapa (i) a cromatografía de afinidad para una purificación adicional de TNK-tPA y obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA; en donde la cromatografía de afinidad comprende Lysine Hyper D como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón acetato de sodio, urea y ácido épsilon aminocaproico (EACA);

iii) inactivación viral del eluato de la etapa (ii) para obtener la muestra viral inactivada; en donde la inactivación viral se realiza por pH bajo e inactivación química, en donde la inactivación química se realiza al tratar la muestra con caprilato de sodio en presencia de urea;

iv) someter la muestra viral inactivada de la etapa (iii) a una cromatografía de afinidad adicional para una purificación adicional para obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA altamente purificado; en donde la cromatografía de afinidad comprende Hidroxiapatita Cerámica (CHT) como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato, hidrato de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES-hidrato), cloruro de sodio y urea;

v) someter el eluato de la etapa (iv) a cromatografía de intercambio catiónico para obtener un eluato que contiene una preparación altamente purificada de TNK-tPA;

en donde la cromatografía de intercambio catiónico comprende Fractogel SO₃ como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de L-Arginina, ácido O-fosfórico y polisorbato-20;

vi) someter el eluato de la etapa (v) a filtración para la reducción del virus para eliminar el virus presente; en donde la filtración del virus se lleva a cabo mediante un nanofiltro de polietersulfona (PES) que tiene un tamaño en un intervalo de 15 a 20 nm;

vii) concentrar la muestra de la etapa (vi) para obtener TNK-tPA por filtración de flujo tangencial;

en donde el rendimiento del proceso es superior al 60 % y la pureza del TNK-tPA obtenido es superior al 95 % según se mide mediante Cromatografía de exclusión por tamaño.

Breve descripción de los dibujos

- 5
- Figura 1:** Representa un cromatograma de purificación por afinidad-I donde el primer pico representa impurezas y el segundo pico corresponde al eluato que contiene TNK-tPA.
- Figura 2:** Representa un perfil de SDS PAGE (teñido con plata) de purificación por afinidad-I donde los carriles núm. 5, 6 y 7 muestran las fracciones de lavado (1, 2 y 3 respectivamente) y el carril núm. 9 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA.
- Figura 3:** Representa un cromatograma de purificación por afinidad-II, el pico de UV 280 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA.
- Figura 4:** Representa un perfil SDS PAGE (teñido con plata) de purificación por afinidad-II donde el carril núm. 9 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA
- Figura 5:** Representa un cromatograma de purificación por afinidad-III, el pico de UV 280 (primero) corresponde al eluato que contiene TNK-tPA
- Figura 6:** Representa un perfil de SDS PAGE (teñido con plata) de purificación por afinidad-III donde el carril núm. 9 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA
- Figura 7:** Representa un cromatograma de purificación por intercambio catiónico, el pico de UV 280 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA.
- Figura 8:** Representa un perfil SDS PAGE (teñido con plata) de purificación de intercambio catiónico donde el carril núm. 5 corresponde al eluato que contiene TNK-tPA.
- Figura 9:** Representa una comparación de la reducción del perfil SDS-PAGE (teñido con plata) de la sustancia farmacológica obtenida después de la purificación mediante el uso de las etapas descritas en la presente invención y el producto innovador (Metalyse).
- Figura 10:** Representa una comparación del perfil SDS PAGE (teñido con plata) no reductor de la sustancia farmacológica obtenida después de la purificación mediante el uso de las etapas descritas en la presente invención y el producto innovador (Metalyse).
- Figura 11:** Representa un cromatograma de mapa de péptidos de la sustancia farmacológica obtenida después de la purificación mediante el uso de la etapa descrita en la presente invención que se asemeja al producto innovador (Metalyse)
- Figura 12:** Representa una inmunotransferencia de la sustancia farmacológica obtenida después de la purificación mediante el uso de las etapas descritas en la presente invención
- Figura 13:** Representa la curva de avance de Afinidad-I (Blue Sepharose FF) en modo discontinuo.
- Figura 14:** Representa Cromatogramas para el PCC ejecutados en dos ciclos para (a) Columna A - primera columna en la zona de carga; (b) Columna B - segunda columna en la zona de carga; (c) Columna C - tercera columna en la zona de carga. ; (d) Cromatogramas de columna superpuestos entre sí que muestran la ejecución completa de PCC. La UV se mide a 280 nm. Ejecución realizada en un XK16-5ml Blue Sepharose Fast Flow.
- Figura 15:** Representa el Cromatograma de la primera columna (columna A) sobrecargado y captura en la columna B, UV medido a 280 nm. Ejecución realizada en un XK16-5ml Blue Sepharose Fast Flow.
- Figura 16:** Representa el Cromatograma de la tercera columna (columna C) que muestra todos los lavados posteriores a la carga. El impacto de las etapas de lavado se indica mediante A - Lavado 1, B-Lavado 2, C-lavado 3, D - Elución, E-Regeneración 1, F-Regeneración 2, G-Regeneración 3, H-Regeneración 4. La UV se mide a 280 nm. Ejecución realizada en un XK16-5ml Blue Sepharose Fast Flow.

descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un proceso novedoso de aislamiento y purificación de TNK-tPA. El cultivo libre de células se obtiene de las células cultivadas en biorreactores. La lista de símbolos y abreviaturas utilizados en la especificación de la presente invención se enumeran en la Tabla A más abajo:

Tabla A: Lista de símbolos y abreviaturas

tPA	Activador de Plasminógeno Tisular
CHO	Ovario de Hámster Chino
kDa	Kilo-Dalton
PAI	Inhibidor del Activador del Plasminógeno
AIS	Accidente Cerebrovascular Isquémico Agudo
SDS PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio

Continuación

5	IPA	Alcohol Isopropílico
	CHT	Hidroxiapatita Cerámica
	FF	Flujo Rápido
	mM	Milli Molar
10	MTX	Metotrexato
	EACA	Ácido épsilon-aminocaproico
	MES-Hidrato	Hidrato de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
15	TFF	Filtración de Flujo Tangencial
	UF	Ultrafiltración
	DF	Diafiltración
20	PES	Polietersulfona
	PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
	μ	Micrón o Micrómetro
25	XMuLV	Virus de la Leucemia Murina Xenotrópica
	PRV	Virus de la Pseudorrabia
	Reo-3	Reovirus Tipo 3
30	MMV	Virus Minuto Murino
	CV	Volumen de Columna
	DBC	Capacidad de Unión Dinámica
35	HCP	Proteína de la Célula Huésped
	ADN	Ácido Desoxirribonucleico
	HCD	ADN de la Célula Huésped
40	SEC-HPLC	Cromatografía de Exclusión por Tamaño
	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
	LAL	Lisado de Amebocitos Limulosos
45	UV	Ultravioleta
	MMC	Cromatografía de Modo Mixto

50 La presente invención se refiere a un proceso novedoso de aislamiento y purificación de TNK-tPA a partir de células CHO y describe un proceso de purificación de TNK-tPA de aplicación industrial, simple, rentable, robusto y altamente efectivo.

55 Un proceso para el aislamiento y purificación de TNK-tPA de la presente invención, como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

i) someter el cultivo libre de células obtenida de cultivo de células CHO a cromatografía de afinidad para capturar TNK-tPA y obtener un eluato que contiene TNK-tPA parcialmente purificado; en donde la cromatografía de afinidad comprende Blue Sepharose 6 FF como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato de sodio, cloruro de sodio y urea;

60 (ii) someter el eluato de la etapa (i) a cromatografía de afinidad para una purificación adicional de TNK-tPA y obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA; en donde la cromatografía de afinidad comprende Lysine Hyper D como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón acetato de sodio, urea y ácido épsilon aminocaproico (EACA);

65 (iii) inactivación viral del eluato de la etapa (ii) para obtener la muestra viral inactivada;

en donde la inactivación viral se realiza por pH bajo e inactivación química, en donde la inactivación química se realiza al tratar la muestra con caprilato de sodio en presencia de urea;

5 (iv) someter la muestra viral inactivada de la etapa (iii) a una cromatografía de afinidad adicional para una purificación adicional para obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA altamente purificado; en donde la cromatografía de afinidad comprende Hidroxiapatita Cerámica (CHT) como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato, hidrato de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES-hidrato), cloruro de sodio y urea;

10 (v) someter el eluato de la etapa (iv) a cromatografía de intercambio catiónico para obtener un eluato que contiene una preparación altamente purificada de TNK-tPA; en donde la cromatografía de intercambio catiónico comprende Fractogel SO₃ como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de L-Arginina, ácido O-fosfórico y polisorbato-20;

15 (vi) someter el eluato de la etapa (v) a filtración para la reducción del virus para eliminar el virus presente; en donde la filtración del virus se lleva a cabo mediante un nanofiltro de polietersulfona (PES) que tiene un tamaño en un intervalo de 15 a 20 nm;

20 (vii) concentrar la muestra de la etapa (vi) para obtener TNK-tPA por filtración de flujo tangencial; en donde el rendimiento del proceso es superior al 60 % y la pureza del TNK-tPA obtenido es superior al 95 % según se mide mediante Cromatografía de exclusión por tamaño.

El proceso de la presente invención puede explicarse por la ilustración de las etapas más abajo:

25 (i) Someter el cultivo libre de células obtenida de cultivo de células CHO a cromatografía de afinidad para capturar TNK-tPA y obtener un eluato que contiene TNK-tPA parcialmente purificado.

30 El cultivo libre de células que contiene TNK-tPA puede obtenerse a partir de un sistema de fermentación basado en tecnología de perfusión mediante células CHO. El cultivo que contiene TNK-tPA puede filtrarse con 0,2 μ y recogerse en recipientes estériles y almacenarse de 2-8 °C hasta su uso posterior. El cultivo libre de células que contiene TNK-tPA se somete a cromatografía de afinidad. La fase estacionaria de la cromatografía de afinidad es Blue Sepharose 6 FF. La columna puede equilibrarse mediante el uso de un tampón que comprende tampón fosfato, cloruro de sodio y polisorbato 20 o sus mezclas. El tampón de elución o fase móvil se emplearon para la etapa de captura (la cromatografía de afinidad es una combinación de tampón fosfato, urea y cloruro de sodio. La concentración de fosfato de sodio en el tampón usado es preferentemente 20-40 mM. La concentración de cloruro de sodio usada en el tampón es preferentemente de 1,5-2 M. La concentración de urea en el tampón está preferentemente en el intervalo de 2-3 molar. El pH del tampón de elución o de la fase móvil está preferentemente en el intervalo de 7,2 a 7,4.

40 La eliminación de las proteínas de la célula huésped de productos producidos en células de mamíferos es siempre una tarea difícil. En la presente invención, el paso optimizado como cromatografía de captura en la presente invención elimina selectivamente las proteínas de la célula huésped en una extensión de 0,8 a 1,5 log, más específicamente 1,0 log lo que ayuda a lograr la concentración final de HCP en la preparación de TNK-tPA purificada, por debajo de 100 ppm. No sólo se reducen las proteínas de la célula huésped (HCP), sino que también se eliminan efectivamente impurezas relacionadas con el proceso tales como albúmina, gentamicina, metotrexato (MTX), etc., mediante la cromatografía de captura descrita en la presente invención.

(ii) Someter el eluato de la etapa (i) a cromatografía de afinidad para una purificación adicional de TNK-tPA para obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA.

50 El eluato de la etapa (i) se somete a cromatografía de afinidad. La fase estacionaria o el material de la columna es Lisina Hyper D. El tampón de equilibrio empleado en la etapa de cromatografía de afinidad puede seleccionarse individualmente o en combinación de tampón fosfato, cloruro de sodio y polisorbato. Con mayor preferencia, el tampón de equilibrado se usa en combinación.

55 La columna puede eluirse mediante un tampón de elución o uno móvil que sea una combinación de acetato de sodio, urea y ácido épsilon-aminocaproico (EACA). El pH del tampón de elución de la cromatografía de afinidad puede realizarse en el intervalo de 4,5 a 5.

60 La matriz de la cromatografía empleada para la purificación intermedia, por ejemplo, la etapa de cromatografía Afinidad-II es Lysine Hyper D.

La concentración de acetato de sodio en el tampón de elución está preferentemente en el intervalo de 5-15 mM. La concentración de EACA en el tampón está preferentemente en el intervalo de 0,1-0,2 M. La concentración de urea está preferentemente en el intervalo de 2-3 M.

65 El mérito inventivo del tampón de elución al usar EACA a pH ácido en esta etapa es proporcionar las condiciones más adecuadas. El proceso de la presente invención, como se expone en la presente descripción, es más adecuado para

la inactivación viral y reduce la manipulación y el consumo de material en varias veces. Aproximadamente una reducción logarítmica de 2-4 del aclaramiento viral y una reducción logarítmica de 1-1,5 de las proteínas de la célula huésped (HCP) se logran mediante la cromatografía de afinidad usada en la presente invención. En promedio, se consigue una reducción logarítmica de 1,69 con XMuLV y una reducción logarítmica de 4,30 con PRV mediante la cromatografía de afinidad usada en la presente invención.

(iii) Inactivación viral del eluato de la etapa (ii) para obtener la muestra viral inactivada;

La inactivación viral del eluato obtenido de la etapa (ii) se realiza mediante incubación a pH bajo y tratamientos químicos. La inactivación química o viral se realiza al tratar la muestra de caprilato de sodio a pH bajo en presencia de urea. La concentración de caprilato de sodio está en el intervalo de preferentemente 0,01 % - 0,07 % (p/v), con mayor preferencia 0,05 %. La concentración de urea es preferentemente 2-3 M. La activación viral también puede llevarse a cabo al incubar la muestra preferentemente durante un período de 40 a 80 minutos, en el intervalo de temperatura preferentemente en el intervalo de 20 a 30 °C.

Generalmente, el pH bajo es el método de inactivación viral de elección y más usado en los procesos de purificación. Se sabe que el pH bajo inactiva los virus con envoltura, pero no puede inactivar los virus sin envoltura altamente resistentes. El pH está en el intervalo de 4,0 a 4,7, con mayor preferencia en el intervalo de 4,3 a 4,7.

La composición del tampón de inactivación viral descrita en la presente invención está optimizada de tal manera que podría inactivar virus con y sin envoltura de manera eficiente. El uso de productos químicos/detergentes, urea, EACA y pH bajo de la presente invención hace que las condiciones sean letales para virus envueltos y no envueltos y hace que la combinación sea una elección óptima para inactivar virus altamente resistentes. En promedio, se consigue una reducción logarítmica de 5,65 con XMuLV y una reducción logarítmica de 5,38 con PRV mediante la inactivación química y el pH bajo de la presente invención.

(iv) Someter la muestra viral inactivada de la etapa (iii) a una cromatografía de afinidad adicional para obtener un eluato que contiene TNK-tPA;

La muestra viral inactivada de la etapa (iii) se somete a una cromatografía de afinidad adicional. La fase estacionaria o el material de columna de la cromatografía de afinidad es Hidroxiapatita Cerámica (CHT). La fase estacionaria o columna se eluye mediante una fase móvil o tampón que comprende una combinación de tampón fosfato, hidrato de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES-Hidrato), cloruro de sodio y urea. El pH del tampón de elución de la cromatografía de afinidad puede realizarse a un pH que varía de 6-9, preferentemente 6-8, con mayor preferencia 6-7.

La fase móvil o el tampón de elución empleado en la etapa de cromatografía de afinidad está preferentemente en el intervalo de 5-15 mM. La concentración de urea está preferentemente en el intervalo de 1-3 M. La concentración de MES-Hidrato usada puede ser de 2-20 mM en el tampón. La elución puede realizarse mediante el aumento de la concentración de sal. La sal de esta elución es cloruro de sodio y la concentración de cloruro de sodio está en el intervalo de 0,1-1,0 M de cloruro de sodio. El tipo de elución usado es gradiente salino lineal.

La cromatografía de afinidad (cromatografía multimodo) usada en la presente invención es para eliminar trazas de impurezas, específicamente ADN de la célula huésped (HCD), proteínas de la célula huésped (HCP) e impurezas virales, si las hubiera. Aproximadamente una reducción logarítmica de 2-4 del aclaramiento viral y una reducción logarítmica de 0,5 -1 de HCP se logran mediante el uso de la cromatografía de afinidad-III mencionada en la presente invención. En promedio, se consigue una reducción logarítmica de 4,23 con XMuLV, una reducción logarítmica de 4,06 con PRV, una reducción logarítmica de 3,73 con Reo-3 y una reducción logarítmica de 2,97 con MMV mediante la Cromatografía de Afinidad usada en la presente invención.

(v) Someter el eluato de la etapa (iv) a cromatografía de intercambio catiónico para obtener un eluato que contiene una preparación altamente purificada de TNK-tPA en tampón de formulación;

La cromatografía de intercambio catiónico del eluato de la etapa (iv) se realiza mediante el uso de Fractogel SO₃. El tampón de equilibrio empleado en la cromatografía de intercambio catiónico puede seleccionarse individualmente o en combinación del grupo que comprende tampón fosfato, urea, MES y cloruro de sodio, preferentemente el tampón de equilibrio se usa en combinación.

El tampón de elución o fase móvil empleado en la cromatografía de intercambio catiónico es una combinación de L-Arginina, ácido O-fosfórico y polisorbato-20. La fase móvil o tampón de elución empleado en la cromatografía de intercambio catiónico comprende L-Arginina presente preferentemente en el intervalo de 250-350 mM, ácido O-fosfórico presente preferentemente en el intervalo de 0,6 % -0,8 % y polisorbato-20 presente preferentemente en el intervalo de 0,04 a 0,05 %. El pH del tampón de elución de la cromatografía de intercambio catiónico o de la fase móvil está preferentemente en el intervalo de 7,3 a 7,5.

Generalmente, la cromatografía de intercambio iónico se usa como cromatografía de captura, intermedia y de pulido para eliminar el volumen o las trazas de impurezas. En la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se usa de forma diferente de lo que se usa convencionalmente. En la presente descripción, el eluato de la cromatografía previa se carga directamente en la cromatografía de intercambio catiónico para obtener la preparación altamente purificada de TNK-tPA en el tampón de formulación final que contiene arginina, ácido ortofosfórico y polisorbato 20. La ventaja de usar la cromatografía de intercambio catiónico de manera diferente es que el intercambio del tampón y la concentración y purificación simultáneas se logran en una sola etapa. En la técnica anterior se emplean técnicas como la cromatografía de filtración en gel y la diafiltración mediante el uso de Filtración de Flujo Tangencial (TFF) para el intercambio del tampón. Estas técnicas son eficaces y se usan con más frecuencia para el intercambio de tampones, pero no pueden purificar más la proteína diana. Debido al hecho de que solo se puede cargar un máximo del 30 % de la muestra al volumen de la columna en la cromatografía de filtración en gel, se requieren columnas de mayor tamaño en comparación con la cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de filtración en gel también provoca la dilución de la proteína diana durante el intercambio del tampón, lo que requiere además alguna etapa de concentración adicional como TFF. El intercambio del tampón mediante diafiltración tampoco es factible cuando los volúmenes a intercambiar el tampón son mayores, ya que requiere una cantidad muy alta de tampón y exige un gran tamaño de unidad UF/DF. Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas anteriormente de las técnicas de intercambio de tampón convencionales, la cromatografía de intercambio catiónico descrita en la presente invención es capaz de proporcionar una etapa de intercambio de tampón y también ayuda en la purificación adicional. Es posible conseguir un factor de reducción viral de 1,21 log con virus sin envoltura, por ejemplo, MMV mediante el uso de la cromatografía de intercambio iónico de la presente invención.

(vi) someter el eluato de la etapa (v) a filtración para la reducción del virus para eliminar el virus presente;

La filtración del virus se realiza después de la cromatografía de intercambio catiónico. El tamaño del nanofiltro está entre 15-20 nm. El nanofiltro usado es PES.

La filtración realizada después de la filtración del virus puede seleccionarse entre microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, macrofiltración, filtración de flujo tangencial, etc. Con mayor preferencia, la filtración es filtración de flujo tangencial. En promedio, se consigue una reducción logarítmica de 4,15 con XMuLV, una reducción logarítmica de 3,40 con PRV, una reducción logarítmica de 4,41 con Reo-3, una reducción logarítmica de 4,76 con MMV mediante la filtración para la reducción del virus usada en la presente invención.

El Proceso General proporciona una reducción logarítmica de más de 15 con XMuLV, una reducción logarítmica superior a 17 con PRV, una reducción logarítmica superior a 8 con Reo-3 y una reducción logarítmica superior a 8 con MMV.

El contaminante más probable en el proceso de TNK t-PA sería el retrovirus derivado de células CHO y XMuLV representa un retrovirus de tipo C no defectuoso para células CHO, una reducción logarítmica de más de 15 obtenida para XMuLV se considera más relevante y proporciona una alta seguridad en términos de seguridad viral.

(vii) Concentrar la muestra de la etapa (vi) para obtener TNK-tPA.

El filtrado obtenido en la etapa (vii) se somete a filtración de flujo tangencial. La membrana de ultrafiltración seleccionada para esta etapa puede ser de 5, 10, 30 o 50 kDa. Preferentemente, la membrana de ultrafiltración usada está en el intervalo de 5-30 kDa, con mayor preferencia el tamaño de la membrana de ultrafiltración usada es de 10 kDa. La membrana de ultrafiltración usada es preferentemente PES. La concentración del TNK-tPA retenido puede estar en el intervalo de 1,0±0,4 mg/ml a 7,0±0,4 mg/ml. Con mayor preferencia, la concentración de TNK-tPA puede estar en el intervalo de 1,0±0,4 mg/ml a 6,0±0,4 mg/ml. Con la máxima preferencia, la concentración de TNK-tPA es 5,5±0,4 mg/ml.

La sustancia farmacológica TNK-tPA (Tenecteplase) puede obtenerse preferentemente mediante la filtración estéril del TFF Retenido mediante el uso de filtros de grado de esterilización de 0,2 μ compuestos de PES, PVDF y celulosa. Con mayor preferencia, el filtro estéril está hecho de PES.

La presente invención también describe un proceso, en donde la cromatografía Afinidad-I discontinua también puede operarse en modo continuo mediante el uso de la cromatografía periódica en contracorriente (PCC). El uso de PCC proporciona una ventaja adicional, por ejemplo, menor consumo de tampón, mayor productividad, funcionamiento en estado estable y mejores controles del proceso. La presente invención incluye dentro de su alcance el uso de tampón en línea y acondicionamiento de carga de cromatografía con preparación mediante un sistema de proceso ÁKTA personalizado basado en cinco bombas con un régimen de flujo máximo de 600 l/h. Dicha actividad puede realizarse mediante el modo de control de retroalimentación de flujo o de retroalimentación de pH-flujo para la preparación de carga de tampón y cromatografía de las etapas de cromatografía Afinidad-I, II, III e IEC como se menciona en los Ejemplos 1 a 4.

El proceso de la presente invención da como resultado un producto purificado de TNK-tPA con mayor rendimiento y pureza. Los atributos de TNK-tPA obtenidos mediante el proceso de la presente invención se detallan en la Tabla B.

Tabla B: Resultados relacionados con la Calidad de TNK-tPA

S.No.	Atributo Crítico de Calidad	Calidad de del Volumen de TNK-tPA Purificado
1	Apariencia	Líquido transparente de incoloro a ligeramente amarillento
2	pH	7,0-7,6
3	Proteína (mg/ml)	No menos de 5,0 mg/ml
4	SDS PAGE	No se observa ninguna banda adicional que no sea la banda principal
5	Inmunotransferencia	Identificado con anticuerpos específicos y se asemeja a un estándar calificado
6	Bioactividad (U/mg)	160 U/ mg a 240 U/mg
7	Monómero (%)	Más del 95 %
8	Contenido de cadena simple (%)	Más del 60 %
9	HCP (ppm)	Menos de 100 ppm
10	Ácido Siálico (mol/ mol de TPA)	2,9 a 5,7 moles/mol de TNK-tPA
11	Azúcar Neutro (mol/mol de TPA)	10,5 a 13,5 moles/mol de TNK-tPA
12	Contenido de Tipo I, Tipo II	Tipo I 28-40 %, Tipo II 60-72 %
13	HCD	Menos de 10 ng/ dosis
14	BET	<1 UE/mg
15	Secuencia N-Terminal (Primeros 15 aminoácidos)	Serina(S)-Tirosina(Y)-Glutamina(Q)-Valina(V)-Isoleucina(I)-Cisteína(C)-Arginina(R)-Ácido aspártico(D)-Ácido glutámico(E)-Lisina(K)-Treonina(T)-Glutamina(Q)-Metionina(M)-Isoleucina(I)-Tirosina(Y)
16	Osmolalidad	260-320 mOsm/Kg
17	Contenido de Arginina	50-60 mg/ml
18	Mapeo de péptidos	El patrón del cromatograma se asemeja al estándar calificado
19	Espectro UV ($A_{máx}$)	280±2 nm

En una modalidad, el proceso de la presente invención es capaz de eliminar o inactivar virus como posibles agentes adventicios según se evalúa mediante el uso de un proceso de purificación a escala reducida. Los altos valores de aclaramiento logarítmico obtenidos para XMuLV, PRV, Reo-3 y MMV brindan una muy buena garantía de que cualquier virus accidental que no pudiera ser detectado, o que pudiera tener acceso al proceso de producción, se eliminaría/o inactivaría durante los procesos de purificación capaces, mencionados en la presente invención y lo que reduce así el riesgo global para la seguridad del paciente.

Además de una mayor garantía de seguridad viral, las mejoras mencionadas anteriormente en el proceso de purificación de TNK-tPA también son beneficiosas en términos de menor intervención humana, menores gastos operativos y de capital para la preparación de TNK-tPA de mayor rendimiento.

La descripción también describe una composición farmacéutica que comprende el TNK-tPA retenido obtenido del proceso de la presente invención en una formulación I.V. parenteral líquida con excipientes farmacéuticamente aceptables para el infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular isquémico agudo.

Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender:

5

10

Ingrediente	Concentración
Tenecteplase	5 mg
Arginina	55 mg
Polisorbato - 20	0,43 mg
Ácido fosfórico	17 mg
Agua para inyección	q.s. hasta 1,0 ml

15

20

La descripción describe un TNK-tPA que puede obtenerse mediante un proceso de la presente invención, en donde la etapa (i) es como se define más detalladamente en la presente descripción, la etapa (ii) es como se define más detalladamente en la presente descripción, la etapa (iii) es como se define más detalladamente en la presente descripción, la etapa (iv) es como se define más detalladamente en la presente descripción y la etapa (v) es como se define más detalladamente en la presente descripción, que puede usarse en un método de tratamiento de infarto agudo de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico agudo, en donde el TNK-tPA está en una formulación I.V. líquida parenteral.

La invención se describe en detalle a continuación en la presente descripción con respecto a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

25

30

El cultivo libre de células que contiene TNK-tPA se somete a una columna de cromatografía de afinidad rellena con Blue Sepharose FF. antes de cargar, la Columna se equilibra con el 5 Volúmenes de Columna (CV) de tampón de equilibrio. La carga se detiene hasta que la columna alcanza la saturación. La capacidad de carga de la columna se decide en función de la capacidad de unión dinámica (DBC) de la columna, que está en el intervalo de 1 a 2 mg/ml. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio hasta que se eliminan por lavado las impurezas relacionadas con el proceso y el producto unidas y sueltas en el lavado de equilibrio. Para una mayor eliminación de las proteínas de la célula huésped se usa otro tampón de lavado que está compuesto de urea, cloruro de sodio, fosfato de sodio y polisorbato 20.

35

40

Después del lavado de la columna, se eluye TNK-tPA mediante el uso del tampón de elución que contiene fosfato de sodio 20-50 mM, NaCl 1-2 M, urea 2-3 M y polisorbato 20 al 0,04-0,1 %. El eluato de Afinidad-I se filtra con un filtro de 0,2 µm. Las muestras se extraen y analizan mediante SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para conocer el perfil de pureza y el contenido de cadena simple/cadena doble. Los expertos en la técnica pueden comprender la importancia de la composición de cadena simple/cadena doble en la sustancia farmacológica TNK-tPA final.

La presente invención es ventajosa debido a la captura directa del cultivo clarificado sin mezclar en grandes tanques de mezcla.

Ejemplo 2

45

50

55

El eluato de la cromatografía de afinidad-I se diluye con una dilución de afinidad-II o un tampón de equilibrio de la cromatografía de afinidad que contiene fosfato de sodio 20-50 mM, polisorbato 20 al 0,04-0,1 % a pH 7,2 para reducir la conductividad hasta menos de 15 ms/cm. La muestra diluida se clarifica mediante el uso de un filtro de 0,2 µm y se carga en la cromatografía Afinidad-II. La columna se lava con tampón de equilibrio para llevar la absorbancia de UV280 a la línea base. La columna se lava más para eliminar las impurezas relacionadas con el proceso y el producto con tampón de lavado que contiene fosfato de sodio 20-50 mM, NaCl 1-3 M, polisorbato 20 al 0,04-0,1 % y pH 7,2. El TNK-tPA purificado se recupera y eluye de la columna mediante el paso de tampón de elución que consta de acetato de sodio 5-25 mM, urea 1-4 M, EACA 0,1-0,4 M y pH 4,0-5,0. Todas las muestras de cromatografía, incluidas la carga, el flujo, los lavados y elución, se analizaron mediante el uso de los siguientes métodos analíticos:

SDS PAGE (reductor/no reductor) para pureza y contenido de cadena simple/cadena doble.

Cromatografía de Alto Rendimiento de Exclusión por Tamaño (SEC-HPLC) Para Contenido Agregado

Contenido de TNK -tPA medido por ensayo de Lisis de Coágulo.

Proteínas Totales por Bradford y UV280 nm.

60

Contenido de HCP mediante el uso de ELISA (kit Cygnus de tercera generación)

65

La cromatografía de afinidad está optimizada para eliminar impurezas relacionadas con el proceso y el producto. El método de elución en esta etapa se optimiza de tal manera que se complementa con la etapa de inactivación viral y la composición con la condición del tampón de elución, por ejemplo, urea, EACA y pH bajo, se optimizan para alinearse con la inactivación viral. Aproximadamente se logra una reducción logarítmica de 2 a 4 del aclaramiento viral y una

reducción logarítmica de las proteínas de la célula huésped (HCP) de 1,0 a 1,5 después de la etapa de la cromatografía Afinidad-II.

5 La otra ventaja es usar EACA a pH ácido en la Cromatografía de Afinidad-II en el tampón de elución en vez de L-Arginina y EACA a pH neutro. Este cambio particular en la etapa de purificación es valioso para reducir el costo de la L-Arginina y también proporciona una condición óptima para la inactivación viral. Por tanto, puede afirmarse que la misma etapa no solo es favorable para la elución de TNK-tPA sino también óptima para la inactivación viral que a su vez reduce la carga de trabajo y el consumo de material con el tiempo.

10 Ejemplo-3

La Elución de la Cromatografía de Afinidad se somete a pH bajo e inactivación química mediante el uso de caprilato de sodio. La mezcla se incuba entre 20 y 25 °C durante 60 min. En la etapa de inactivación viral, el caprilato de sodio usado es en una cantidad muy baja que elimina la necesidad de grandes recipientes de mezcla. En la técnica anterior, se usaba caprilato de sodio para inactivar los virus presentes en la cromatografía antes de la captura donde los volúmenes son comparativamente más altos, por lo que la cantidad de caprilato de sodio requerida también era alta. En la presente invención, el Caprilato de sodio se agrega después de las segundas etapas de cromatografía donde el volumen a manipular es bajo y, por lo tanto, requiere menos cantidad de caprilato de sodio y un recipiente mucho más pequeño para su manipulación. Aparte de eso, el uso de caprilato de sodio a pH 4,5 en comparación con pH neutro o alcalino, proporciona una inactivación viral más efectiva y robusta en el proceso.

Después de la inactivación viral, la solución se diluye mediante el uso de tampón fosfato para cargarla en la Cromatografía de afinidad (cromatografía de modo mixto) para eliminar las trazas de impurezas, específicamente HCD, HCP e impurezas virales, si las hubiera. Aproximadamente una reducción logarítmica de 2-4 del aclaramiento viral y una reducción logarítmica de 0,5 -1 del aclaramiento de HCP se logran mediante la cromatografía de afinidad. En la técnica anterior se describe la misma hidroxilapatita cerámica para la purificación del activador del plasminógeno de tejido, pero ninguno de los procesos ha descrito la capacidad para eliminar impurezas, por ejemplo, HCP, ADN y virus. La importancia de eliminar tales impurezas es evidente por el hecho de que la cantidad de estas impurezas se prueba en el producto final (excepto la carga viral) y es parte de las especificaciones finales de liberación de la sustancia farmacéutica. Todas las muestras de cromatografía, incluidas la carga, el flujo, los lavados y la elución se analizan mediante el uso de los siguientes métodos analíticos:

SDS PAGE (reductor/no reductor) para pureza y contenido de cadena simple/cadena doble.

35 Cromatografía de Alto Rendimiento de Exclusión por Tamaño (SEC-HPLC) para contenido agregado

Contenido de TNK -tPA medido por ensayo de Lisis de Coágulo.

40 Proteínas Totales por Bradford y UV280 nm.

Contenido de HCP mediante el uso de ELISA (kit Cygnus de tercera generación)

Ejemplo 4

45 El eluato de la cromatografía de afinidad sin ningún acondicionamiento se carga directamente en la cromatografía de intercambio catiónico para la concentración y el intercambio de tampón de la proteína diana. La cromatografía de intercambio catiónico se optimiza de tal manera que evita las engorrosas etapas de dilución para el acondicionamiento de la alimentación y, por lo tanto, el eluato de afinidad-III puede cargarse directamente en la cromatografía de intercambio catiónico. El TNK-tPA se recupera de la columna al pasar tampón de elución que contiene 55 mg/ml de L-Arginina, 17 mg/ml de ácido ortofosfórico, 0,43 mg/ml de Polisorbato 20 y pH 7,4. El eluato de la cromatografía de intercambio catiónico se somete a filtración para la reducción viral y el filtrado resultante se concentra adicionalmente mediante el uso del sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) para lograr la concentración final de la sustancia farmacéutica. Después de la concentración, el TFF Retenido se filtra de forma estéril y se mantiene a -20 °C para su uso posterior. La sustancia farmacéutica producida por el proceso de purificación de la presente invención se analiza a fondo mediante el estado de la técnica y los procedimientos analíticos validados que incluyen, pero que no se limitan a;

55 a; Verificación de identidad y pureza mediante SDS PAGE, Transferencia Western, análisis de secuencia N-terminal y mapeo de péptidos,
Determinación de HCP mediante el uso de ELISA,
Bioactividad y cuantificación de TNK-tPA mediante el uso del ensayo de lisis de coágulo,
60 Cuantificación del ADN de la célula huésped mediante el uso de qPCR,
Cuantificación de endotoxinas mediante el uso de la prueba LAL,
Contenido agregado y de cadena simple/cadena doble mediante el uso de HPLC de exclusión de tamaño,
Contenido de arginina y Osmolalidad,
Análisis de ácido siálico, azúcares neutros, glicofomas tipo I y tipo II,
65 Análisis de impurezas relacionadas con el proceso, por ejemplo, gentamicina, MTX, urea, caprilato de sodio y EACA mediante el uso de métodos desarrollados internamente.

Después de un análisis exhaustivo y una comparación biofísica con el producto innovador, puede concluirse que el producto purificado mediante el proceso descrito en la invención actual produce un producto TNK-tPA que es muy similar al producto innovador con un rendimiento general del proceso de más del 60 %.

5

Ejemplo 5:

Se ha realizado una cromatografía periódica en contracorriente (PCC) para la etapa de afinidad-I con el sobrenadante de cultivo celular que contiene TNK-tPA de un biorreactor de perfusión. En el modo discontinuo, se evaluó la capacidad de unión dinámica para los medios para la cromatografía de afinidad-I y, con base en la información obtenida del análisis de ruptura, se experimentó una PCC de tres columnas en XK16-5 ml de BLUE SEPAHROSE FF. Las composiciones del tampón cromatográfico se mantuvieron igual que las mencionadas en el Ejemplo-1.

10

Ejemplo 6:

El método para la preparación de una mezcla líquida de pH y fuerza iónica controlados para los tampones requeridos, dilución y/o acondicionamiento de la carga cromatográfica mediante un sistema de proceso ÄKTA personalizado basado en cinco bombas con un régimen de flujo máximo de 600 l/h para el procesamiento posterior de TNK-tPA. Las mezclas líquidas preparadas con el sistema anterior con recetas definidas son adecuadas para la purificación de TNK-tPA en diferentes etapas de cromatografía como se menciona en los Ejemplos-1 a 4.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para el aislamiento y purificación de TNK-tPA que comprende las etapas de:

- 5 (i) someter el cultivo libre de células obtenida de cultivo de células CHO a cromatografía de afinidad para capturar TNK-tPA y obtener un eluato que contiene TNK-tPA parcialmente purificado; en donde la cromatografía de afinidad comprende Blue Sepharose 6 FF como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato de sodio, cloruro de sodio y urea;
- 10 (ii) someter el eluato de la etapa (i) a cromatografía de afinidad para una purificación adicional de TNK-tPA y obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA; en donde la cromatografía de afinidad comprende Lysine Hyper D como una fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón acetato de sodio, urea y ácido épsilon aminocaproico (EACA);
- 15 (iii) inactivación viral del eluato de la etapa (ii) para obtener la muestra viral inactivada; en donde la inactivación viral se realiza por pH bajo e inactivación química, en donde la inactivación química se realiza al tratar la muestra con caprilato de sodio en presencia de urea;
- 20 (iv) someter la muestra viral inactivada de la etapa (iii) a una cromatografía de afinidad-III adicional para una purificación adicional para obtener un eluato que contiene principalmente TNK-tPA altamente purificado; en donde la cromatografía de afinidad comprende Hidroxiapatita Cerámica (CHT) como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de tampón fosfato, hidrato de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES-hidrato), cloruro de sodio y urea;
- 25 (v) someter el eluato de la etapa (iv) a cromatografía de intercambio catiónico para obtener un eluato que contiene una preparación altamente purificada de TNK-tPA; en donde la cromatografía de intercambio catiónico comprende Fractogel SO₃ como fase estacionaria y una fase móvil, en donde la fase móvil es una mezcla de L-Arginina, ácido O-fosfórico y polisorbato-20;
- 30 (vi) someter el eluato de la etapa (v) a filtración para la reducción del virus para eliminar el virus presente; en donde la filtración del virus se lleva a cabo mediante un nanofiltro de polietersulfona (PES) que tiene un tamaño en un intervalo de 15 a 20 nm;
- 35 (vii) concentrar la muestra de la etapa (vi) para obtener TNK-tPA por filtración de flujo tangencial; en donde el rendimiento del proceso es superior al 60 % y la pureza del TNK-tPA obtenido es superior al 95 % según se mide mediante Cromatografía de exclusión por tamaño.

2. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la pureza de TNK-tPA es superior al 95 % por Cromatografía de Exclusión de Tamaño y en donde los otros atributos críticos de calidad son:

35

SDS PAGE	No se observa ninguna banda adicional que no sea la banda principal
Monómero (%)	Más del 95 %
Contenido de cadena simple (%)	Más del 60 %
Proteína de la célula huésped (HCP) (ppm)	Menos de 100
ADN de la Célula Huésped (HCD) (ng/dosis)	Menos de 10

40

45

50 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (i) el fosfato de sodio está presente en el intervalo de 20-40 mM, el cloruro de sodio está presente en el intervalo de 1,5-2 M y la urea está presente en el intervalo de 2-3 M; en donde el pH de la fase móvil está presente en el intervalo de 7,2-7,4.

55

4. El proceso como se reivindica en la reivindicación 3, en donde la cromatografía de afinidad proporciona una reducción logarítmica de 0,8 - 1,5 en las proteínas de la célula huésped (HCP).

5.

El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (ii) el acetato de sodio está presente en el intervalo de 5-15 mM, la urea está presente en el intervalo de 2-3 M y el EACA está presente en el intervalo de 0,1-0,2 mM; en donde el pH de la fase móvil de la cromatografía de afinidad está en el intervalo de pH 4,5-5.

60

6. El proceso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde la cromatografía de afinidad da como resultado una reducción logarítmica de 1-1,5 en las proteínas de la célula huésped (HCP) y una reducción logarítmica de la eliminación viral de 1 a 4;

65

en donde, preferentemente, la cromatografía de afinidad da como resultado una reducción logarítmica de más de 1,5 con XMuLV y una reducción logarítmica de más de 4 con PRV.

- 5 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (iii) el capilato de sodio está presente en el intervalo de 0,01 % - 0,07 % (p/v), preferentemente en el intervalo de 0,05 %; en donde la concentración de urea está presente en el intervalo de 2-3 M; en donde la inactivación viral se realiza manteniendo la muestra durante un período de 40-80 minutos; en donde la muestra se mantiene en un intervalo de temperatura de 20-30 °C.
- 10 8. El proceso como se reivindica en la reivindicación 7, en donde el pH bajo y la inactivación química dan como resultado una reducción logarítmica de más de 5 con XMuLV y PRV.
- 15 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (iv) el tampón fosfato está presente en el intervalo de 5-15 mM, el MES-hidrato está presente en el intervalo de 2-20 mM, la urea está presente en el intervalo de 1-3 M y el cloruro de sodio está presente en un intervalo de 0,1 a 0,5 M. en donde el pH de la fase móvil está en el intervalo de 6 - 9; en donde la elución de la cromatografía de afinidad usada es un gradiente salino lineal; en donde la sal es cloruro de sodio y la concentración de cloruro de sodio está en un intervalo de cloruro de sodio de 0,1 a 1,0 M.
- 20 10. El proceso como se reivindica en la reivindicación 9, en donde la cromatografía de afinidad da como resultado una reducción logarítmica de 0,5-1 en las proteínas de la célula huésped (HCP) y de 2 - 4 de aclaramiento viral, o en donde la cromatografía de afinidad da como resultado una reducción logarítmica de más de 4 con XMuLV y PRV y una reducción logarítmica de más de 3 con los virus MMV y Reo 3.
- 25 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (v) la L-Arginina está presente en el intervalo de 250-350 mM, el ácido O-fosfórico está presente en el intervalo de 0,6 %-0,8 % y el polisorbato-20 está presente en el intervalo de 0,04 al 0,05 %; en donde el pH de la fase móvil está en el intervalo de 7,3 a 7,5.
- 30 12. El proceso como se reivindica en la reivindicación 11, en donde la cromatografía de intercambio catiónico da como resultado más de 1 log de aclaramiento viral con MMV y más de 0,5 log de aclaramiento para proteínas de la célula huésped (HCP).
- 35 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (vi) la filtración del virus da como resultado una reducción logarítmica de más de 4 de XMuLV, una reducción logarítmica de más de 3 de PRV, una reducción logarítmica de más de 4 de Reo-3 y una reducción logarítmica de más de 4,5 de MMV.
- 40 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en la etapa (vii) el filtro es una membrana de ultrafiltración; en donde la membrana de ultrafiltración es PES; en donde el tamaño de la membrana de ultrafiltración está en un intervalo de 5-30 kDa, preferentemente el tamaño de la membrana de ultrafiltración es 10 kDa en donde, preferentemente, el concentrado es TNK-tPA retenido.
- 45 15. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde se usa cromatografía periódica en contracorriente para la cromatografía de Afinidad-I definida en la etapa (i) de la reivindicación 1.
- 50 16. Un proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el enfoque de acondicionamiento en línea se usa para la preparación de tampón y carga para la cromatografía Afinidad-I definida en la etapa (i) de la reivindicación 1, cromatografía Afinidad-II como se definió en la etapa (ii) de la reivindicación 1, cromatografía Afinidad-III (cromatografía de modo mixto MMC) como se definió en la etapa (iv) de la reivindicación 1, y cromatografía de intercambio iónico como se definió en la etapa (v) de la reivindicación 1.

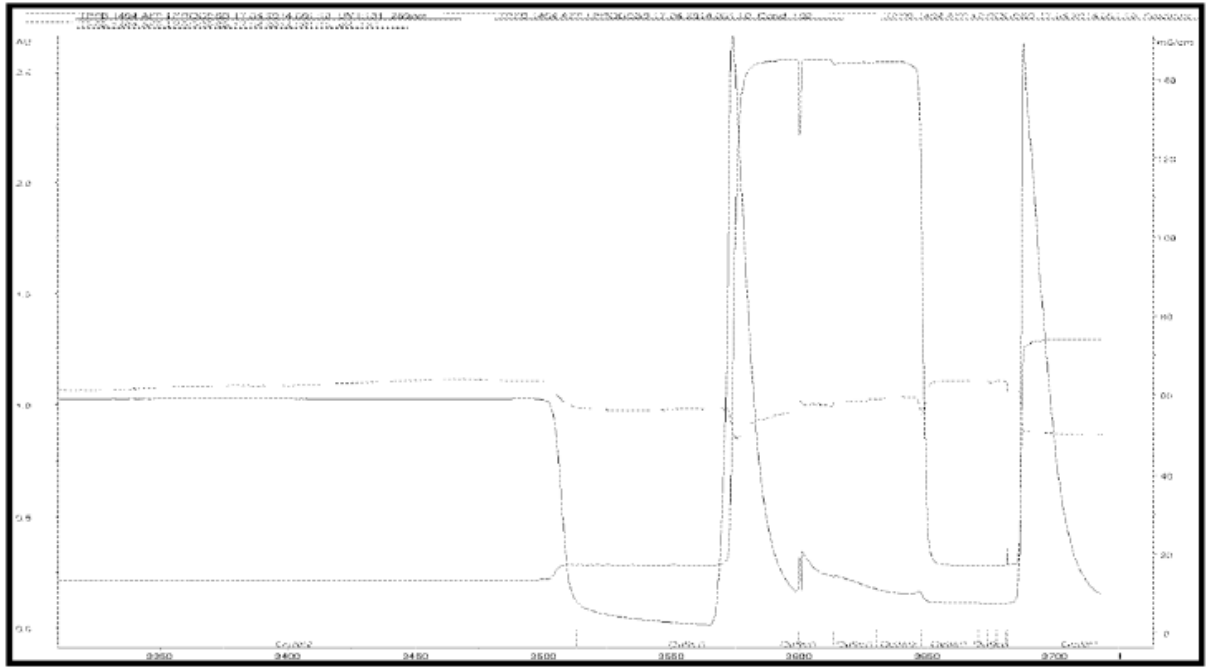


Figura 1

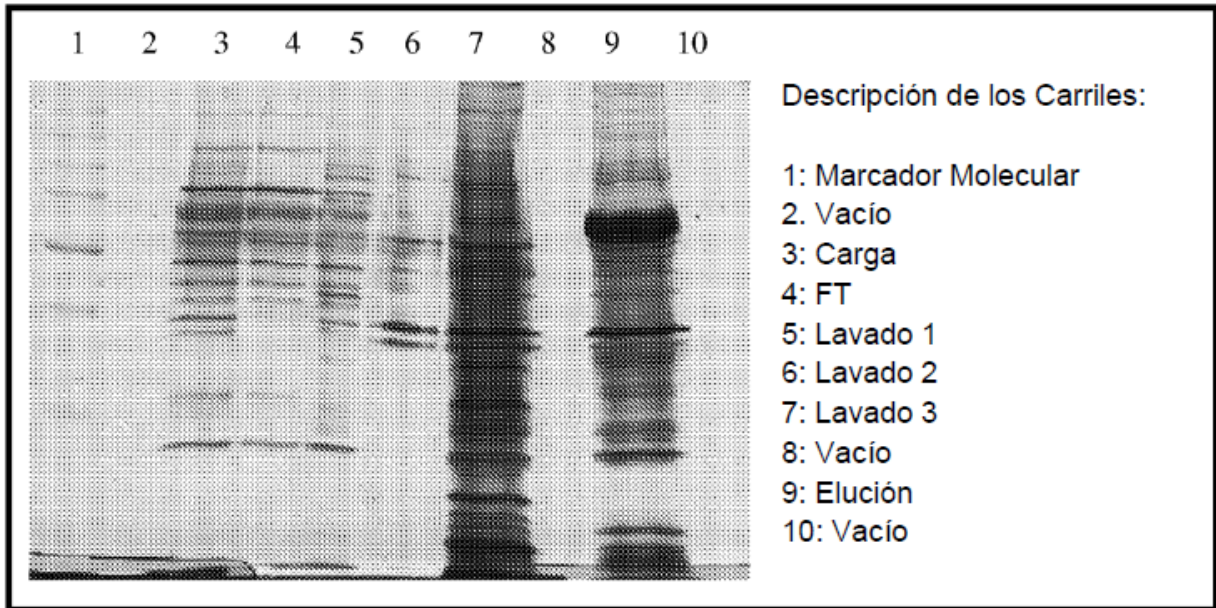


Figura 2

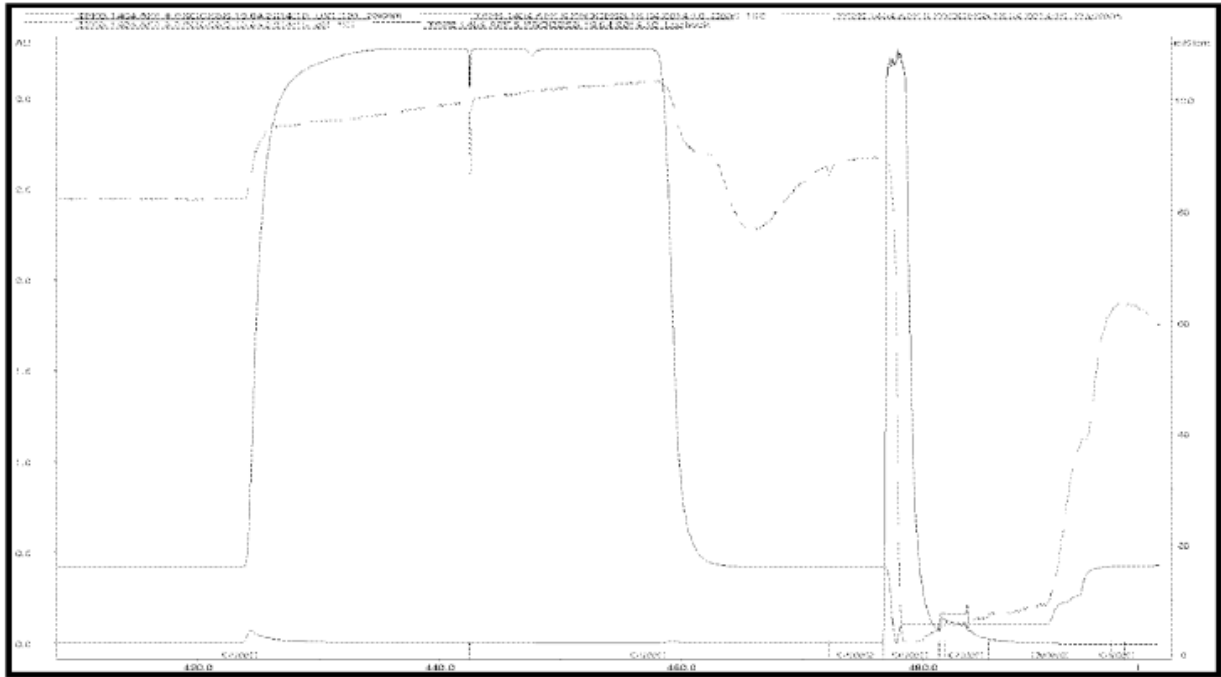


Figura 3

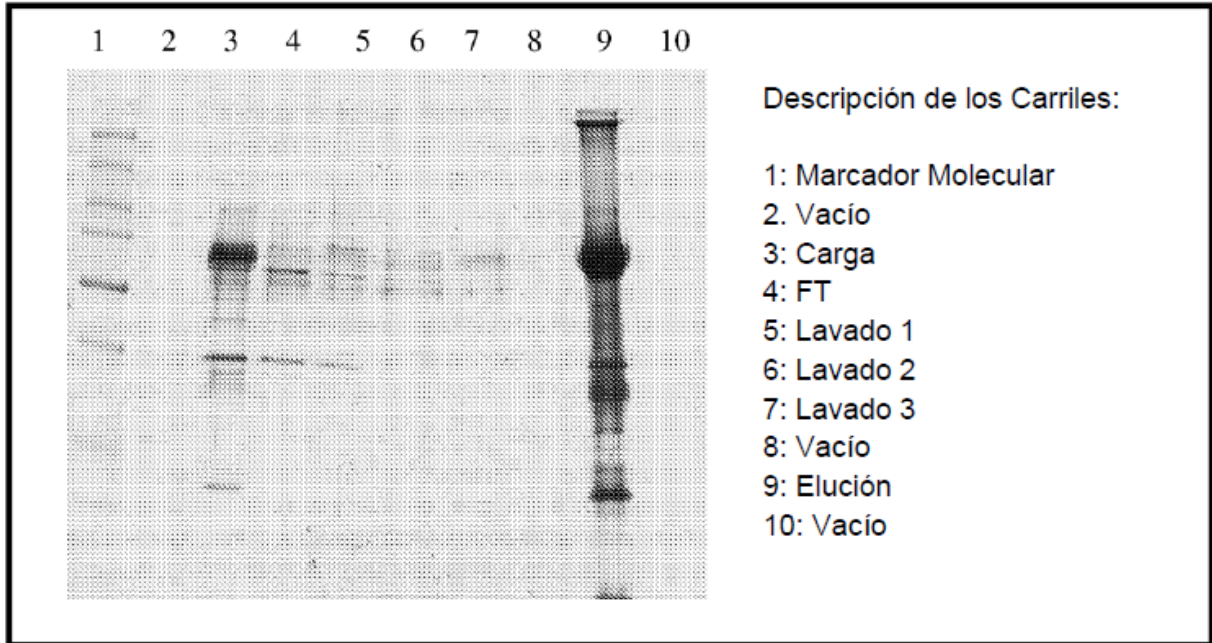


Figura 4

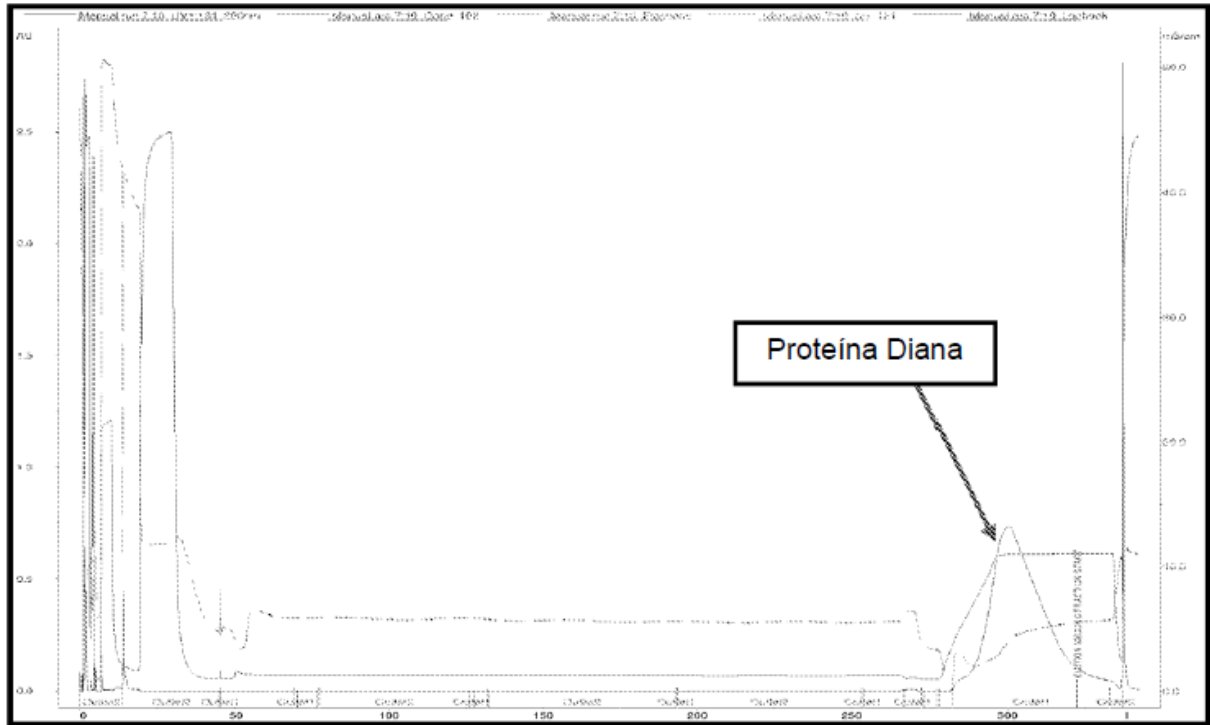


Figura 5

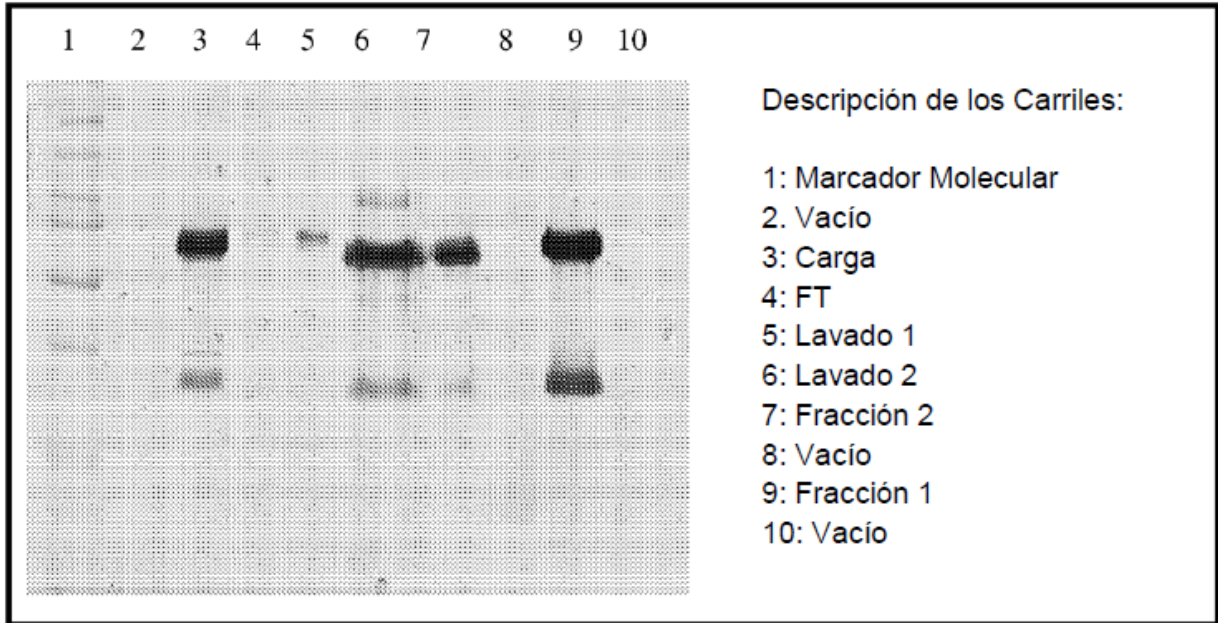


Figura 6

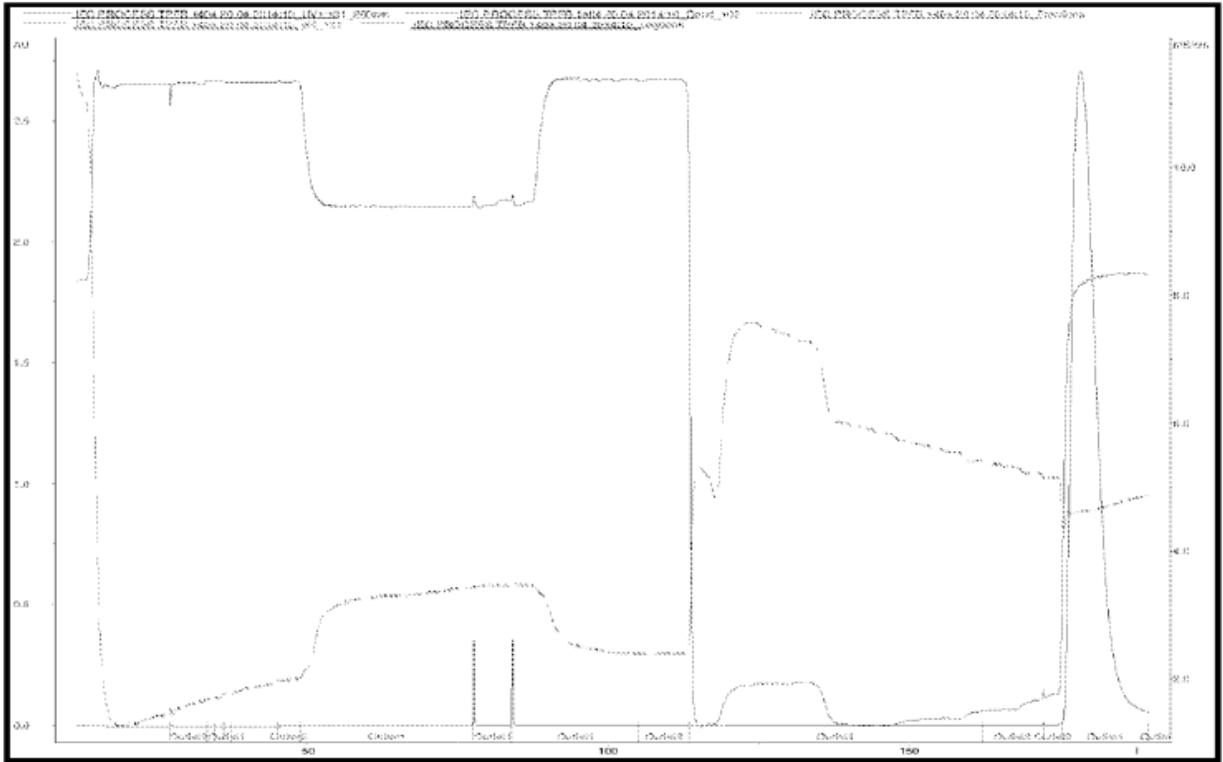


Figura 7

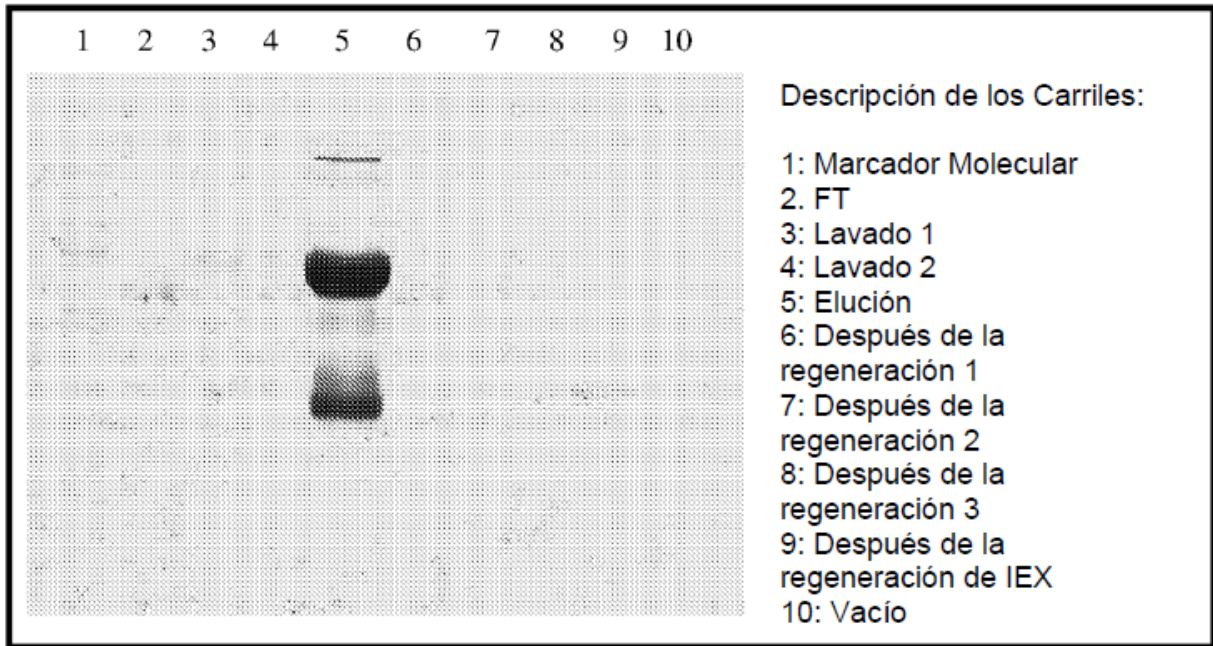


Figura 8

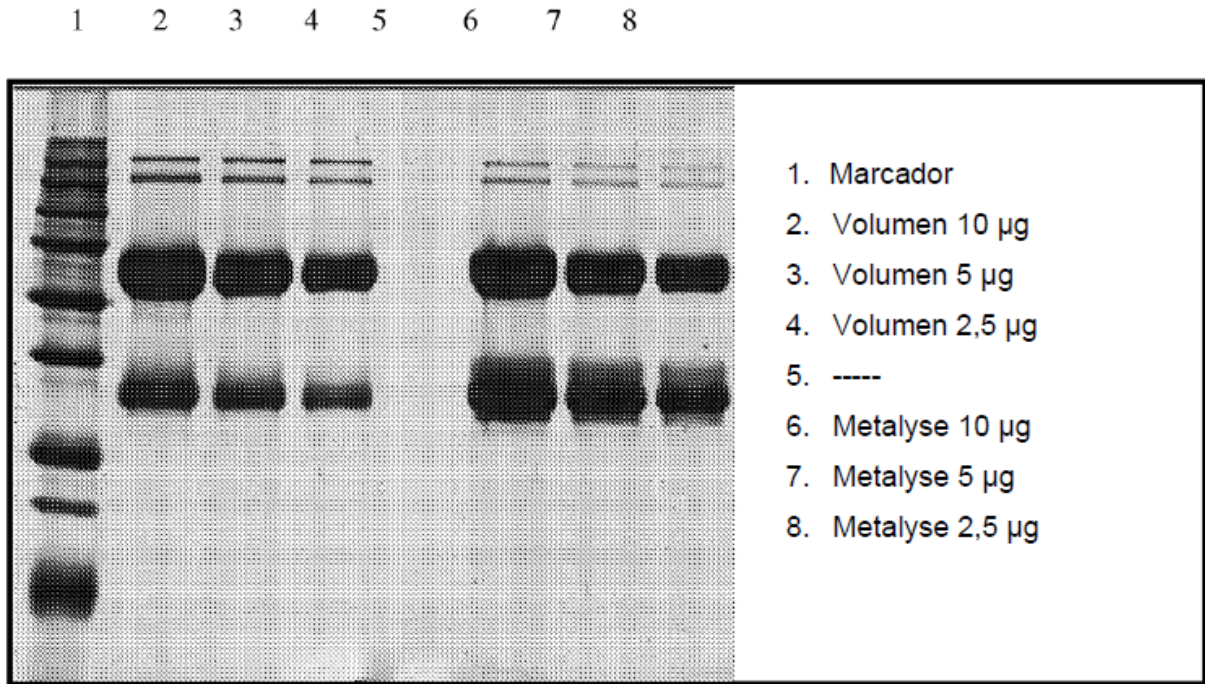


Figura 9

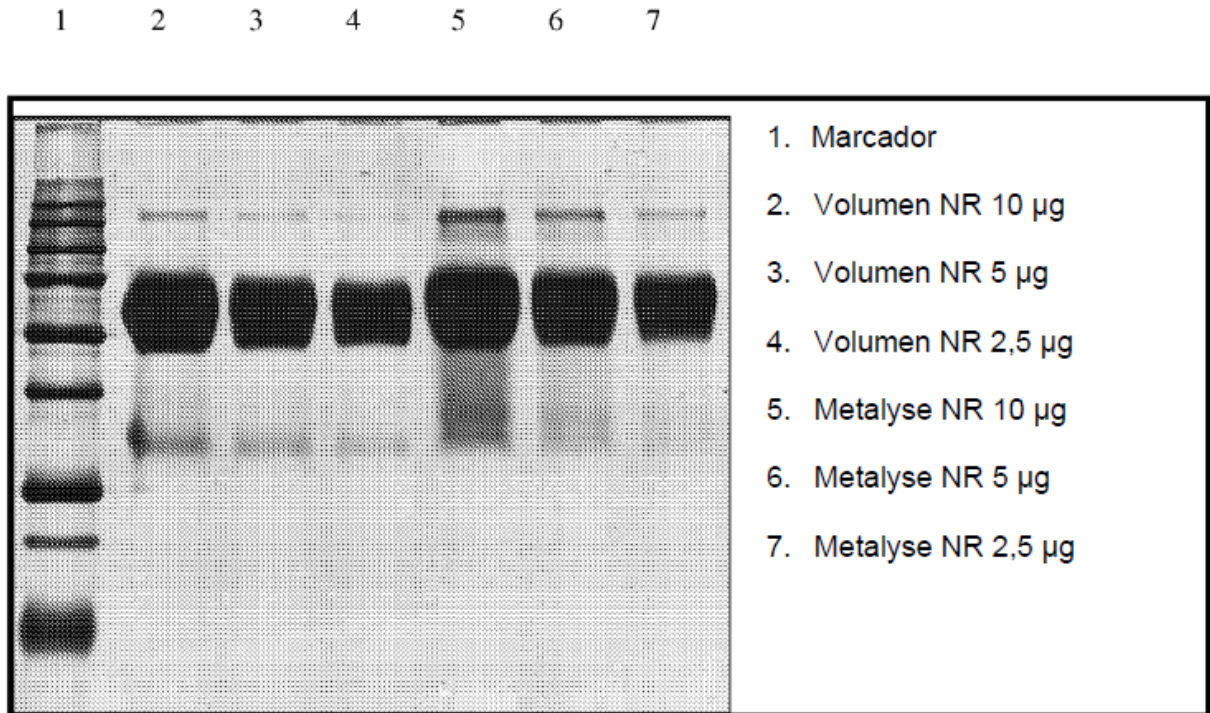


Figura 10

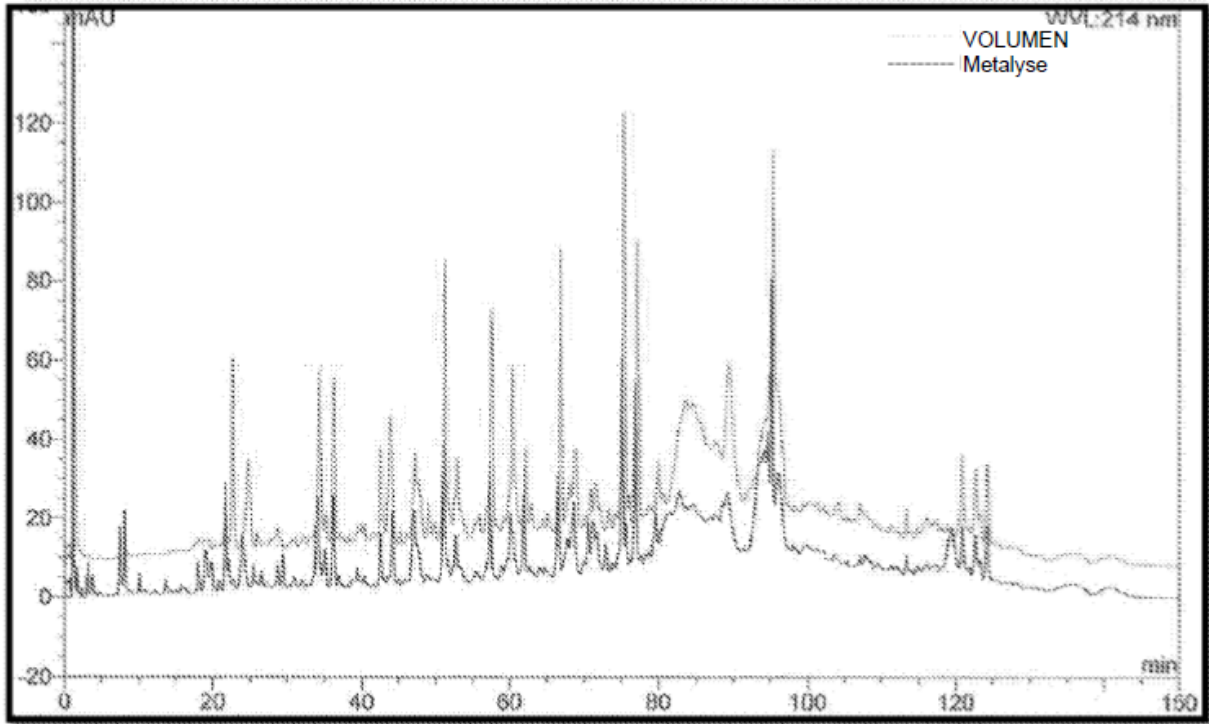


Figura 11

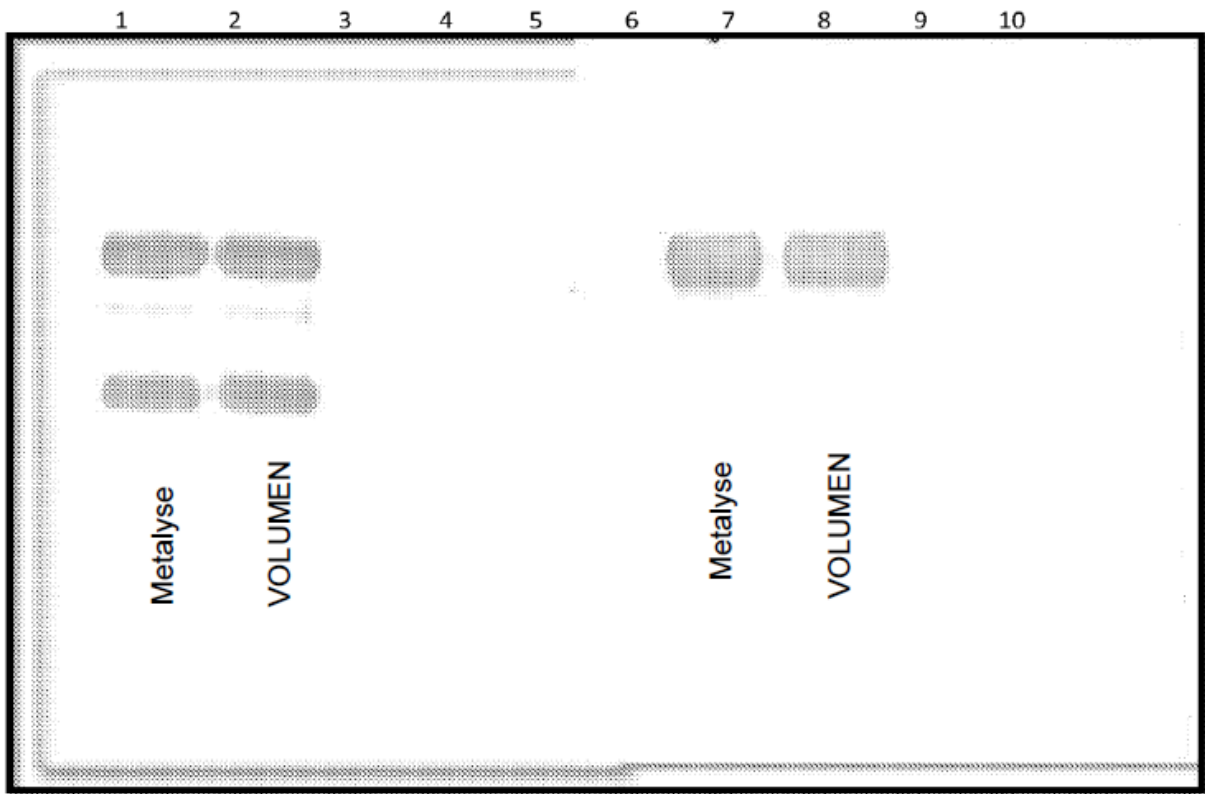


Figura 12

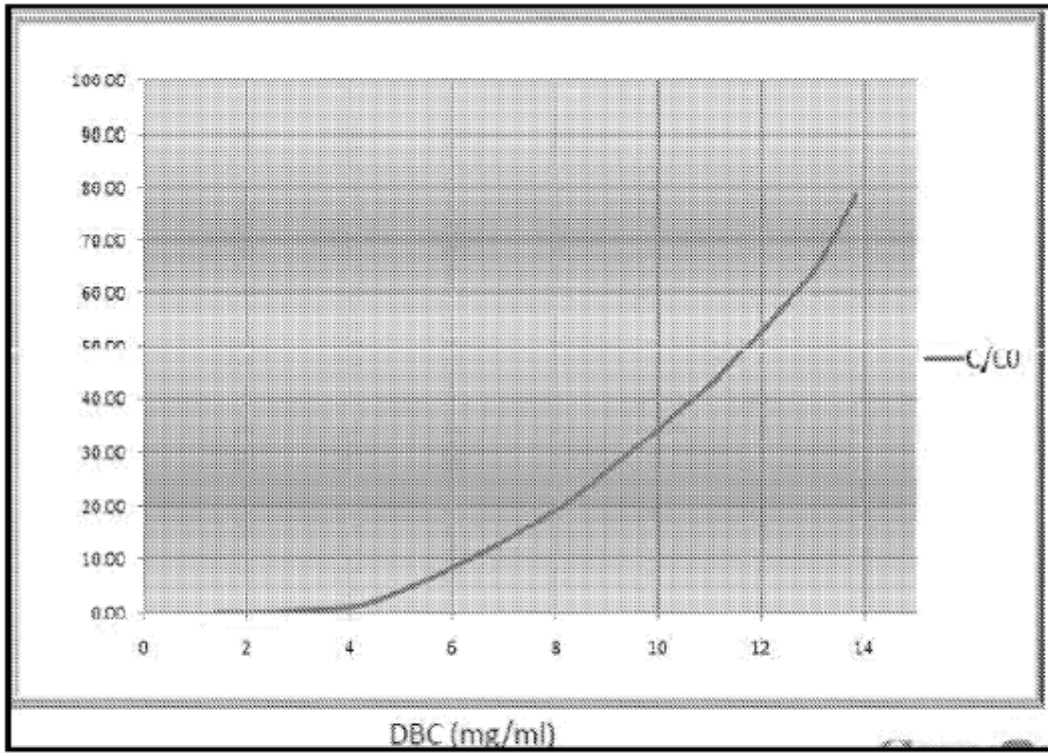


Figura 13

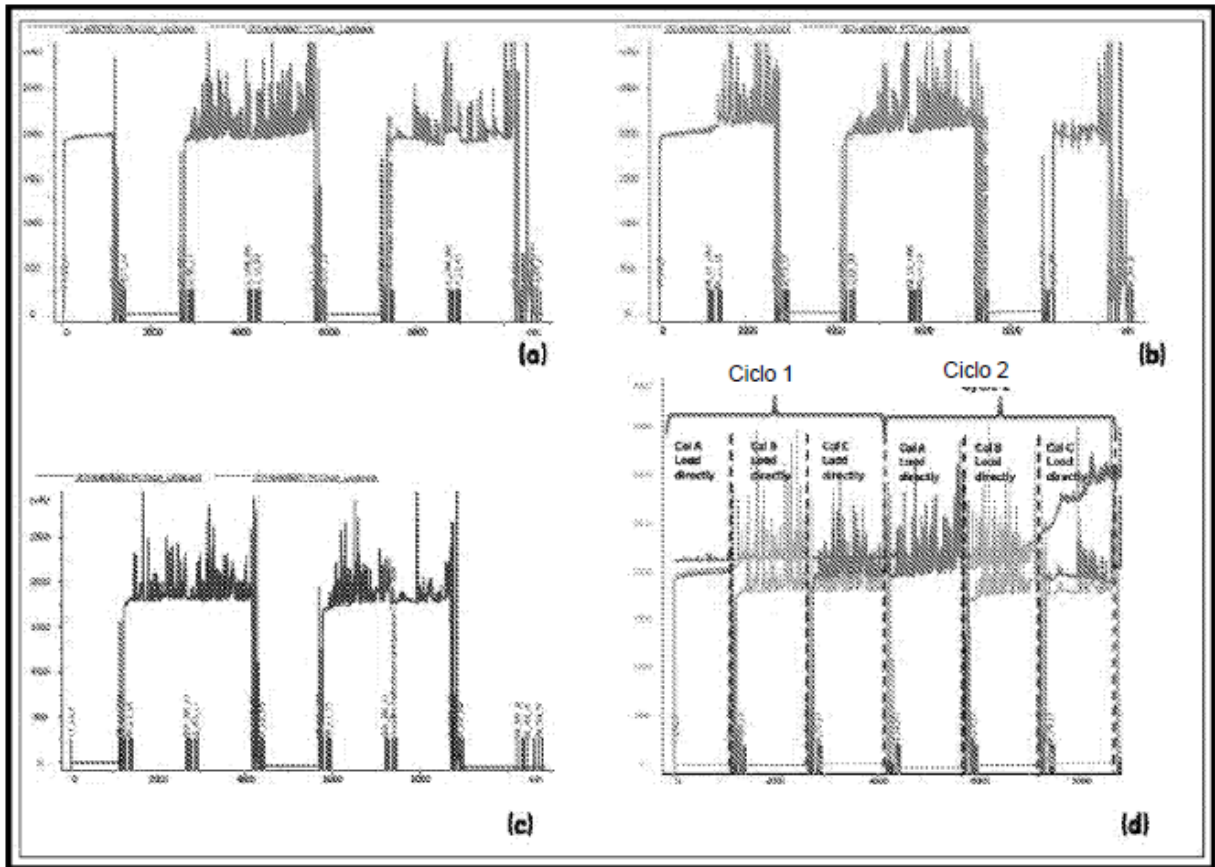


Figura 14

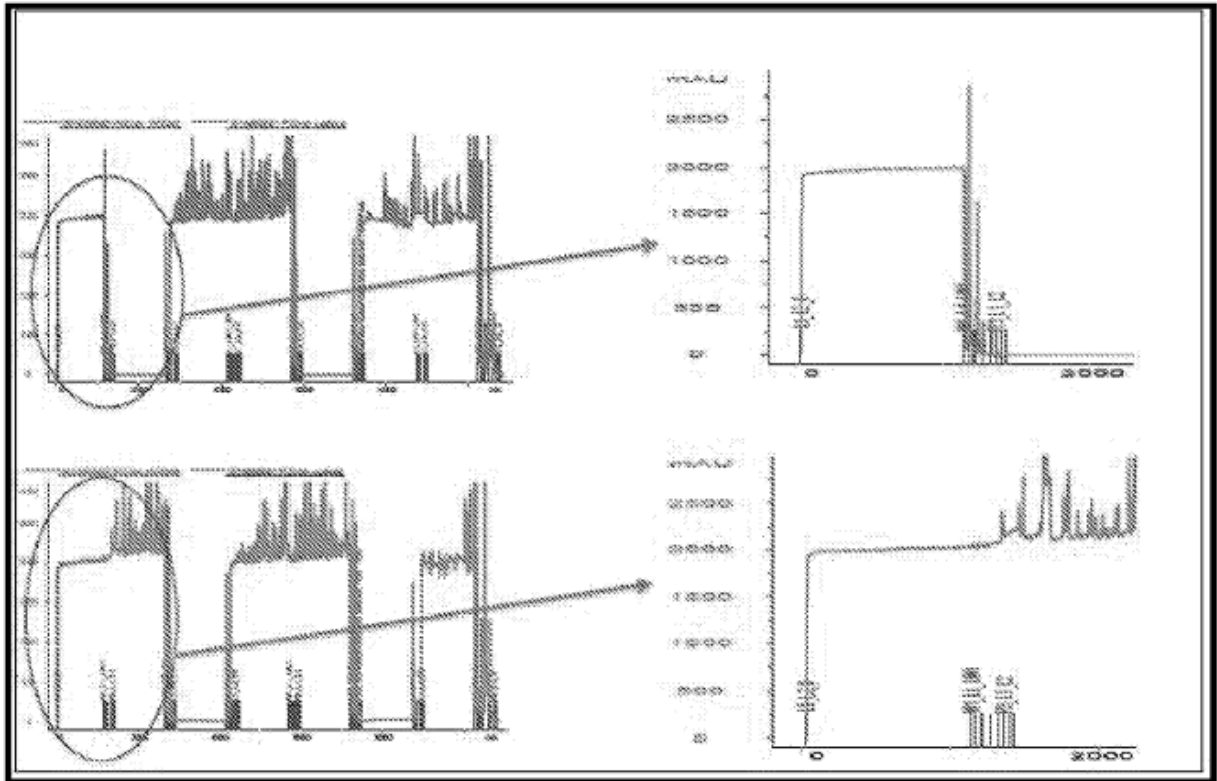


Figura 15

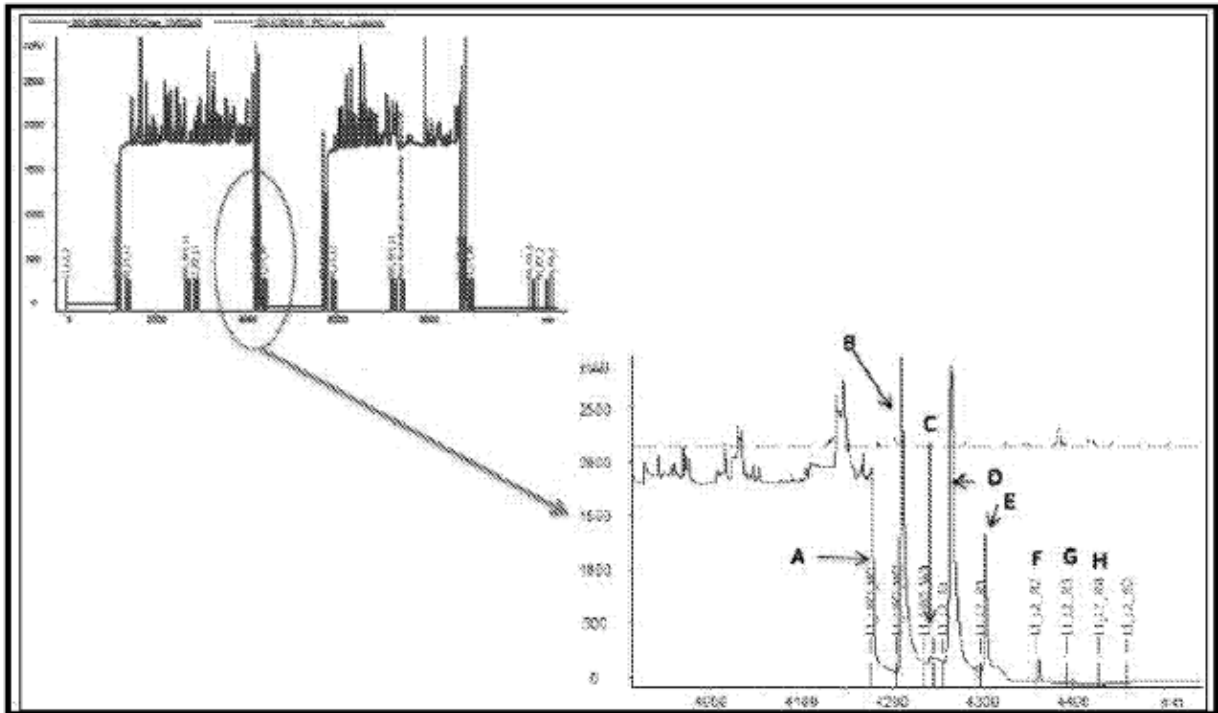


Figura 16