

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 237 854**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.1998 E 98959975 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.09.2015 EP 1037923**

54

Título: **Procedimiento para la preparación mediante filtración de una solución de factor VIII víricamente segura**

30

Prioridad:

15.12.1997 FR 9715888

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
05.10.2015

73

Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des
Tropiques
91940 Les Ulis, FR**

72

Inventor/es:

**CHTOUROU, ABDESSATAR (SAMI);
NOGRE, MICHEL y
PORTE, PIERRE**

74

Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación mediante filtración de una solución de factor VIII víricamente segura.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación mediante filtración de una solución de factor VIII víricamente segura y esencialmente desprovista de factor von Willebrand (vWF) de alto peso molecular, a partir de una solución de factor VIII de alta o muy alta pureza y que contiene unos complejos de factor VIII-vWF de alto peso molecular.
- 10 El factor VIII es un componente proteico de la sangre utilizado desde hace muchos años para el tratamiento de individuos que sufren de hemofilia A, una enfermedad congénita causada por una deficiencia o ausencia de factor VIII en la sangre. Se han utilizado durante mucho tiempo unos concentrados plasmáticos enriquecidos con factor VIII, para el tratamiento de los pacientes.
- 15 Los concentrados utilizados más corrientemente eran el crioprecipitado y los concentrados purificados obtenidos a partir del crioprecipitado. Se denomina habitualmente crioprecipitado a un precipitado obtenido a partir de un plasma humano congelado, mediante una técnica de fraccionamiento plasmático a baja temperatura. El plasma congelado se reblandece a una temperatura de aproximadamente -5°C a -15°C, y después se calienta lentamente bajo agitación a una temperatura que no supera los 3°C. En estas condiciones, el plasma congelado se funde
- 20 parcialmente para dar una fase líquida y una fase sólida, siendo entonces la fase sólida recuperada mediante centrifugación para dar el crioprecipitado, que conviene entonces purificar para obtener preparaciones de factor VIII lo suficientemente puras. Esta fracción crioprecipitada se compone esencialmente de fibrinógeno, fibronectina, factor VIII y factor von Willebrand (vWF).
- 25 En esta fracción crioprecipitada, el factor VIII está generalmente asociado al vWF que estabiliza el factor VIII mediante complejación.
- Durante mucho tiempo, las etapas de purificación pretendían esencialmente separar del factor VIII proteínas indeseables tales como el fibrinógeno y la fibronectina.
- 30 Sin embargo, se sabe ahora que uno de los problemas esenciales relacionado con la preparación del factor VIII a partir del plasma reside en la necesidad de desactivar/eliminar virus originalmente contenidos en la sangre, con rendimientos satisfactorios.
- 35 Aunque es difícil establecer una lista exhaustiva de estos virus, se pueden citar en particular los diferentes virus hepáticos, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis G o también las diferentes formas del virus del SIDA (VIH).
- Así, se han desarrollado numerosas técnicas de desactivación vírica tal como el calentamiento hasta sequedad, la pasteurización, el tratamiento disolvente-detergente. El conjunto de estas técnicas es relativamente eficaz frente a
- 40 virus encapsulados, pero la desactivación o la eliminación de los virus no encapsulados, especialmente de los virus pequeños tales como el parvovirus B19 o el virus de la hepatitis A, sigue siendo uno de los principales problemas.
- Las tecnologías más recientes utilizan las capacidades de retención vírica de membranas de tamaño pequeño de poros. Estas tecnologías presentan efectivamente una eficacia notable frente a virus de pequeño tamaño, tales
- 45 como los parvovirus B19 o el virus de la hepatitis A, y se pueden aplicar a proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, los niveles de corte utilizados, menores que 900 kD, no permiten considerar la filtración de proteínas o de complejos proteicos de alto peso molecular, como el factor VIII, sin grandes pérdidas de rendimiento.
- Así, por ejemplo, la publicación de la patente WO96/00237 describe un método para mejorar el poder filtrante de las
- 50 proteínas en una solución que contiene al menos una macromolécula, que consiste en utilizar una solución en la que el contenido total de sal varía de 0,2 M hasta saturación de la solución con la sal a la que se refiere. En Josic *et al.*, J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., Vol. 662, nº 2, 1994, se describe la utilización de Ca²⁺ para separar el factor VIII del factor vWF. Este contenido elevado de sal tiene por efecto aumentar los rendimientos de la filtración. Preferentemente, la etapa de filtración se utiliza en una fase en la que la actividad específica de la macromolécula de interés ya es muy elevada, de manera que sea posible utilizar un filtro con estructura muy fina y eliminar virus
- 55 muy pequeños.
- Sin embargo, este documento no prevé de ninguna manera la filtración de soluciones que contienen moléculas de muy alto peso molecular, tales como el factor VIII, y especialmente el factor VIII de origen plasmático, el cual está
- 60 generalmente asociado con un vWF, formando así complejos de alto peso molecular. Este documento cita el ejemplo de una forma del factor VIII recombinante suprimida, con un peso molecular medio del orden de 170 kD, y totalmente desprovista de vWF. Todos los ejemplos hacen referencia al factor IX cuyo peso molecular medio es del orden de 55 kD, y este documento subraya que el método descrito es particularmente adecuado para este tamaño de molécula, debiendo ser además el nivel de corte del filtro ligeramente más elevado que el tamaño de la molécula
- 65 a filtrar. Así, para el factor IX, el filtro utilizado tiene un nivel de corte de 70 kD.

Sin embargo, como se indica anteriormente, el factor VIII, según su origen, se puede presentar en forma complejada que le da un tamaño significativo, el cual puede alcanzar 20.000 kD en términos de peso molecular, y varias decenas de nanómetros en término de tamaño de partículas (>106 nm para el eje principal de la molécula, Eppel *et al.*, Langmuir 1993, 9, 2281-88, American Chemical Society). Hoy en día no hay ningún medio disponible para filtrar de manera satisfactoria este tipo de moléculas, y simultáneamente eliminar virus de pequeño tamaño, tales como, por ejemplo, los parvovirus B19, que tienen un tamaño del orden de 18 a 20 nm.

Se ha encontrado ahora, de manera sorprendente, que es posible obtener mediante filtración una solución de factor VIII víricamente segura y esencialmente desprovista de vWF de alto peso molecular, a partir de una solución que contiene un factor VIII de alta o muy alta pureza que contiene complejos de factor VIII-vWF de alto peso molecular.

Es por ello que la invención tiene por objeto un procedimiento para la preparación, mediante filtración, de una solución de factor VIII víricamente segura, según el cual:

- se prepara una solución que contiene un factor VIII de alta o muy alta pureza que contiene complejo de factor VIII-vWF;
- se realiza una etapa a) que permite la disociación de los complejos de factor VIII-vWF de alto peso molecular, mediante un ion caotrópico en cantidad suficiente para permitir la disociación, y la obtención de una solución esencialmente desprovista de factor VIII asociado con vWF de alto peso molecular;
- se realiza una etapa b) de filtración de dicha solución sobre un filtro hidrófilo que tiene una porosidad de 15 nm.

La preparación mediante filtración de una solución de FVIII permite obtener ventajosamente una solución esencialmente desprovista de vWF de alto peso molecular, especialmente de vWF que tiene un grado de polimerización mayor o igual que 15, es decir, en la que el vWF se controla cualitativa y cuantitativamente. El procedimiento según la invención permite igualmente aumentar significativamente los rendimientos de filtración gracias a la disminución de la cantidad de complejos proteicos de alto peso molecular, y permite obtener una solución que tiene un grado de pureza satisfactorio asegurando al mismo tiempo la eliminación vírica de los virus patógenos humanos de tamaño ≥ 15 nm.

La disociación del complejo FVIII-vWF se obtiene por medio de al menos un ión caotrópico, presente en cantidad suficiente para permitir la disociación. Se pueden utilizar cualesquiera iones conocidos que tengan una actividad caotrópica.

Preferentemente, se trata de iones divalentes aportados a la solución de factor VIII en forma de una solución salina de 0,2 M hasta saturación de las sales.

Se puede citar a título de ejemplo no limitativo, CaCl_2 , o también MgCl_2 . Se utilizará preferentemente una solución de CaCl_2 . La concentración de la solución será preferentemente de aproximadamente 0,35 M.

Se ha constatado que, además de las condiciones propias de la filtración, las condiciones utilizadas para la disociación tienen una influencia sobre el rendimiento de la filtración ulterior. Los parámetros que definen el conjunto de estas condiciones son, durante la etapa de disociación, la naturaleza de las sales y sus concentraciones, y, durante la etapa de filtración, la presión y la temperatura.

De manera sorprendente, los rendimientos de la filtración mejoran considerablemente cuando la presión transmembranaria durante la filtración disminuye hasta valores muy bajos, por debajo de los niveles recomendados preconizados por los proveedores de los filtros.

La temperatura ejerce también una influencia no despreciable sobre los rendimientos de la filtración, siendo el efecto de los valores demasiados altos o demasiados bajos de la temperatura el de aumentar el número de las formas multímeras del vWF. Ventajosamente, se elegirá una temperatura del orden de $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

Entre los filtros de virus disponibles en el mercado o en desarrollo, se pueden citar, por ejemplo, la membrana Planova[®] 15N comercializada por la empresa Asahi Chemical Industry. En este caso, el filtro se utiliza preferentemente con una presión inferior a 0,3 bares, ventajosamente inferior a 0,2 bares.

Se pueden utilizar diferentes técnicas de filtración. Las técnicas más corrientes son las técnicas de filtración tangencial o de filtración frontal que se pueden usar con los mismos tipos de filtros.

La solución de factor VIII de partida, previamente purificada, se puede preparar de diferentes maneras, por ejemplo a partir de una fracción plasmática, tal como la fracción crioprecipitada del plasma, o también por vía recombinante. Se pueden utilizar cualesquiera condiciones de preparación conocidas por el experto en la técnica. De manera no limitativa, se pueden citar los métodos de purificación siguientes, que permiten obtener una solución de factor VIII

pre-purificada utilizable para el uso del procedimiento según la invención:

- Cromatografía de intercambio de iones según, por ejemplo, una de las variantes descritas en las patentes nº EP-B-359593, EP nº 0 343 275, US nº 4.743.680, nº WO 97/17370 y EP nº 0 173 242.
- Cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo según una de las variantes descritas en las publicaciones de solicitudes de patentes nº WO 97/39033, EP nº 0 286 323, o en el documento Zimmerman y Fulcher, *Thrombosis Res.*, Suppl. VII, p 58, 1987; Berntorp y Nilson, *Thrombosis Res.*, Suppl. VII, p 60, 1987.
- Cromatografía de filtración sobre gel en medio disociante o no, tal como se describe por P.J. Fay (P.J. Fay *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol 79, p. 7200-7204, 1982).
- Cromatografía de afinidad sobre heparina inmovilizada, tal como se describe en la publicación de solicitud de patente WO 93/22337.

Típicamente, la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de una fracción plasmática, tal como la fracción crioprecipitada del plasma, comprende una etapa de desactivación vírica que permite la desactivación de los virus encapsulados. Se pueden utilizar diferentes sistemas cromatográficos, pudiendo tener entonces las condiciones de adsorción y después de elución de la fracción concentrada de factor VIII una influencia sobre los rendimientos ulteriores del procedimiento. Se puede hacer variar la naturaleza de la matriz y del intercambiador de iones. De este modo, se puede usar un sistema cromatográfico de intercambio iónico débil, tal como, por ejemplo, el gel Toso Haas Toyopearl-DEAE 650 M, o también un sistema cromatográfico de intercambio iónico fuerte, tal como, por ejemplo, el gel Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech). Cuando la solución de partida se prepara mediante purificación por intercambio de iones, ésta tiene una cantidad significativa de factor VIII asociado con un vWF de alto peso molecular, y por lo tanto la etapa a) es indispensable.

La disociación de la etapa a) se puede efectuar al mismo tiempo que la elución o, según otro aspecto, posteriormente a la elución. Una elución efectuada en presencia de una sal caotrópica tiene por efecto aumentar el rendimiento de la elución con relación a una elución efectuada en presencia de una sal tal como NaCl, mientras que al mismo tiempo asegura la disociación, indispensable para realizar la etapa de filtración posterior en las condiciones requeridas.

Según un modo de realización preferido, la solución concentrada de factor VIII, obtenida al final de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, se eluye entonces en las condiciones disociantes de la etapa a), es decir, en presencia de un ion caotrópico.

La purificación previa de la solución de factor VIII de partida se puede obtener igualmente mediante una técnica de precipitación con heparina. En este caso, por ejemplo, se adsorbe una fracción crioprecipitada del plasma sobre un gel de hidróxido de aluminio, en presencia de heparina, con un enfriamiento a temperatura de aproximadamente 14°C hasta aproximadamente 19°C, y con centrifugación. Ventajosamente, se puede efectuar una primera etapa de desactivación vírica, realizada sobre el sobrenadante de la precipitación, mediante un tratamiento disolvente-detergente tal como se describe en la publicación europea de patente EP-A-0 343 275. Entonces, se ajusta el pH y la osmolalidad del sobrenadante de la precipitación antes de la etapa de cromatografía por intercambio de iones.

Finalmente, se puede igualmente considerar el hecho de partir de una solución de factor VIII recombinante, que puede necesitar una etapa suplementaria de desactivación vírica. No será necesario usar la etapa a).

Preferentemente, la solución de factor VIII de partida tendrá una actividad específica por lo menos igual a 50 UI/mg, preferentemente al menos igual a 100 UI/mg, aumentando el poder filtrante de la solución con la actividad específica del factor VIII.

Se entiende por actividad específica, tal como se indica anteriormente, aquélla antes de la adición eventual de albúmina con vistas a estabilizar el factor VIII.

Más particularmente, se utilizará una solución de partida en la que la concentración en factor VIII: C es de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 UI/ml, preferentemente de aproximadamente 10 hasta 50 UI/ml.

El contenido de proteínas de la solución de factor VIII de partida será ventajosamente de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,5 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mg/ml.

El contenido de proteínas se determina mediante la técnica de dosificación de las proteínas de Bradford (equipo de dosificación comercializado por la empresa Pierce).

Una vez se ha efectuado la filtración, los factores VIII y von Willebrand que han sido filtrados se reasocian en forma de complejos, después de la eliminación de los agentes disociantes, por ejemplo mediante diálisis, y se recupera, eventualmente después de una etapa de liofilización, la solución del factor VIII formulada para un uso comercial.

La invención tiene igualmente por objeto una solución de factor VIII víricamente segura y esencialmente desprovista de vWF de alto peso molecular, susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según la invención.

- 5 Finalmente, la invención se refiere a las soluciones obtenidas según la invención a título de medicamento, más particularmente para tratar la hemofilia A.

La invención se describirá más detalladamente con la ayuda de los ejemplos siguientes, que ilustran la invención sin por tanto limitarla. Los ejemplos se acompañan de la Figura 1 que representa:

Figura 1: curva que demuestra la variación del poder filtrante del factor VIII sobre membrana Planova® 15 N en función de la presión aplicada al sistema. En abscisas figura la presión expresada en bares, y en ordenadas figura el rendimiento de filtración expresado en porcentaje (relación entre la actividad FVIII:C, expresada en UI/ml del filtrado, sobre la del producto de partida).

Ejemplo 1

Preparación de una solución de factor VIII mediante filtración a partir de una fracción crioprecipitada del plasma.

La preparación de la solución de factor VIII de partida se efectúa conforme a lo indicado en la patente FR 2 632 309, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia.

Se resolubilizan 835 g de crioprecipitado, que representan 113,5 litros de plasma, mediante agitación en una solución de agua heparinizada (3 UI/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aclaran 4217 ml de solución, enriquecida en factor VIII y en proteínas, mediante adsorción sobre 90 g de gel de hidróxido de aluminio y mediante precipitación ácida (pH 6,50), y reducción de la temperatura entre 15 y 19°C. Se separa un precipitado, enriquecido en fibrinógeno y fibronectina, mediante centrifugación, lo que permite obtener una solución clara de factor VIII de pureza intermedia, que se desactiva de los virus encapsulados mediante adición de Polisorbato 80 y de fosfato de tri-n-butilo (respectivamente en solución c.s. 1% y 0,3%) durante al menos 6 horas con un pH de 7,1.

Se adsorben 5172 ml de solución de factor VIII víricamente desactivada, con respecto a los virus encapsulados, sobre 560 ml de gel de cromatografía de intercambio aniónico débil (TosoHaas Toyopearl-DEAE 650M) que se ha equilibrado previamente en solución salina tamponada. Después de 2 horas de adsorción, el gel se lava mediante una solución salina de osmolalidad 390 mOsm/Kg, y se tampona hasta pH 7,00. La fracción no adsorbida sobre el gel es rica en fibrinógeno. Después, el gel se eluye de una fracción enriquecida en factor von Willebrand mediante el aumento de la osmolalidad hasta 452 mOsm/Kg. Después, la fracción concentrada de muy alta pureza en factor VIII se eluye mediante modificación del pH a 6,0, y mediante aumento de la fuerza iónica. Después, la fracción eluida se ajusta en CaCl₂ hasta una concentración de 0,35M y una osmolalidad de 1300±100 mOsm/Kg. Esta fracción está constituida por una mezcla de factor VIII y de factor von Willebrand en forma disociada gracias a la acción del elevado contenido de calcio.

Se recalientan 1260 ml de solución, que es estable a +4°C, extemporáneamente hasta +35°C para sufrir una etapa de eliminación de virus mediante filtración con la ayuda de un filtro BMM Planova® 15N que tiene un nivel de porosidad de 15 nanómetros y que tiene una superficie de 0,12 m². El caudal se mantiene durante la filtración a fin de que la presión transmembranaria sea siempre inferior a 0,2 bares. Después de la filtración del factor VIII, se filtran sobre la membrana 210 ml de solución salina tamponada, de osmolalidad 1300 mOsm/Kg, a fin de recuperar 1470 ml de solución de factor VIII libre de virus patógenos. La solución tampón permite equilibrar los filtros en osmolalidad y en pH, y sirve para enjuagar los filtros después de la filtración del factor VIII. La solución de factor VIII obtenida está empobrecida en factor von Willebrand de muy alto grado de polimerización (≥15), pero contiene suficiente factor von Willebrand de grado de polimerización ≥5 y ≥10 para recomplejar el factor VIII después de la diálisis.

Resultados:

La Tabla 1 indica, en las diferentes etapas del procedimiento según la invención, las cantidades de factor VIII obtenidas así como la actividad específica (AS), el contenido de proteínas y el rendimiento de la etapa en cuestión.

TABLA 1

	Volumen (ml)	FVIII:C (UI/ml)	Proteínas mg/ml	FVIII total (UI)	AS (UI/mg)	Rendimiento (%)
Solución eluida de la cromatografía	1260	22	0,32	27720	69	100
Solución de factor VIII filtrada a 15 nm	1470	12	0,14	17640	86	64
Solución dializada y concentrada	149	108	1,13	16092	95	58,1

Ejemplo 2

Las condiciones son idénticas a las del ejemplo 1 excepto que se utilizan 10.000 g de crioprecipitado que representan 1.330 litros de plasma. Se filtran 13.700 ml de solución de factor VIII, víricamente desactivada con relación a los virus encapsulados. Después de la filtración del factor VIII, se filtran 2 litros de solución tampón, de osmolalidad 1300 mOsm/Kg, a fin de recuperar 15.700 ml de solución de factor VIII libre de virus patógenos. La membrana de filtración utilizada es una membrana BMM Planova® 15N con una superficie de 1,0 m².

La Tabla 2 siguiente indica, para una filtración equivalente a 1.330 litros de plasma, sobre membrana BMM Planova® 15N con una superficie de 1,0 m², las cantidades de factor VIII obtenidas en las diferentes etapas del procedimiento de filtración, así como la actividad específica y el rendimiento de la etapa en cuestión.

TABLA 2

	Volumen (ml)	FVIII:C (UI/ml)	Proteínas mg/ml	FVIII total (UI)	AS (UI/mg)	Rendimiento (%)
Solución eluida de cromatografía	13700	15,0	0,09	205500	167	100
Solución de factor VIII filtrada a 15 nm	15700	7,9	0,045	124030	176	60,3
Solución dializada y concentrada	956	119	0,72	113764	165	55,5

Ejemplo 3

Preparación de una solución de factor VIII, mediante filtración, a partir de una fracción que proviene de un crioprecipitado del plasma y purificada previamente mediante precipitación con heparina.

La preparación de la solución de factor VIII de partida se efectúa conforme a la enseñanza de la patente US 4.743.680, cuyo contenido se incorpora como referencia.

Se resolubilizan 678 g de crioprecipitado, que representan 92,2 litros de plasma, mediante agitación, en una solución de agua heparinizada (3 UI/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aclaran, como en el Ejemplo 1, 3424 ml de solución rica en factor VIII y en proteínas.

Se adsorben 4200 ml de solución de factor VIII, víricamente desactivada con relación a los virus encapsulados, en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1, después de acidificar hasta pH 6,50, sobre 300 ml de gel de cromatografía de intercambio aniónico fuerte (Pharmacia Biotech Q-Sepharose Fast Flow) equilibrado anteriormente en solución salina tamponada. Después de 2 horas y 30 minutos de adsorción, el gel se lava mediante una solución salina de osmolalidad 450 mOsm/Kg, y se tampona hasta pH 6,50. La fracción no adsorbida sobre gel es rica en fibrinógeno. Después, el gel se eluye de una fracción enriquecida en factor von Willebrand mediante aumento de la osmolalidad hasta 581 mOsm/Kg. Después, la fracción concentrada de muy alta pureza en factor VIII se eluye mediante modificación del pH hasta 6,0, y mediante aumento de la fuerza iónica. La fracción eluida se ajusta en CaCl₂ hasta una concentración de 0,35 M y una osmolalidad de 1300 ± 100 mOsm/Kg. Esta fracción está constituida por una mezcla de factor VIII y de factor von Willebrand en forma disociada gracias a la acción del elevado contenido en calcio.

Se recalientan 1280 ml de solución, que es estable a +4°C, extemporáneamente a +35°C para sufrir una etapa de eliminación de virus mediante filtración, de la misma manera que en el Ejemplo 1, sobre una membrana Planova 15N con un nivel de porosidad de 15 nanómetros y que tiene una superficie de 0,12 m². Después, se filtra un volumen de 180 ml de solución tampón, de osmolalidad 1300 mOsm/Kg, con el fin de recuperar 1460 ml de solución de factor VIII libre de virus patógenos. Esta solución de factor VIII está empobrecida en factor von Willebrand de muy alto grado de polimerización (≥15) pero contiene suficiente factor von Willebrand de grado de polimerización ≥5 y ≥10 para recomplejar el factor VIII después de la diálisis.

Resultados:

La tabla 3 siguiente, indica en las diferentes etapas del procedimiento de filtración, las cantidades de factor VIII obtenidas, la cantidad total de proteínas, así como la actividad específica (AS) y el rendimiento de la etapa en cuestión.

TABLA 3

	Volumen (ml)	FVIII:C (UI/ml)	FVIII total (UI)	Proteínas mg/ml	AS (UI/mg)	Rendimiento (%)
Solución eluida de cromatografía	1200	19	24320	0,20	95	100
Solución de factor VIII filtrada a 15 nm	1460	13	18980	0,12	108	78
Solución dializada y concentrada	164	92	15088	0,95	97	62

Ejemplo 4

Variación del poder filtrante de una solución de factor VIII sobre una membrana Planova® 15 N en función de la naturaleza y de la concentración de las sales utilizadas para la disociación.

Resultados:

La Tabla 4 siguiente demuestra las variaciones del rendimiento de la filtración en función de estos diferentes parámetros, permaneciendo las otras condiciones de realización del procedimiento como se definen en el ejemplo 1.

TABLA 4

Agente disociante (M)	Rendimiento de la filtración (%)
CaCl ₂ 0,35 M	45
NaCl 0,35 M	10
NaCl 1,0 M	26

El uso de agentes disociantes permite aumentar de manera significativa el poder filtrante del factor VIII. La eliminación de estos agentes mediante diálisis después la filtración induce una reasociación de los complejos factor VIII - factor von Willebrand. El análisis de los productos obtenidos demuestra una buena capacidad del factor von Willebrand para fijar el factor VIII.

Ejemplo 5

Variación del poder filtrante de una solución de factor VIII sobre una membrana Planova® 15 N en función de los parámetros de temperatura y de presión.

La Tabla 5 siguiente indica el rendimiento de la filtración obtenido haciendo variar la presión y la temperatura, permaneciendo inalterada la sal utilizada para la disociación y su concentración. Cuando se disminuye la temperatura, para una presión dada, se observa una disminución significativa del rendimiento de la filtración.

Además, la Figura 1 demuestra claramente que la disminución de la presión transmembranaria a valores muy bajos permite una mejora considerable del rendimiento.

TABLA 5

Agente disociante	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Rendimiento de la filtración (%)
CaCl ₂ 0,35 M	≤ 0,10	35 ± 2	70
CaCl ₂ 0,35 M	≤ 0,20	35 ± 2	58
CaCl ₂ 0,35 M	0,50	35 ± 2	45
CaCl ₂ 0,35 M	≤ 0,20	20 ± 2	42

Ejemplo 6

Estudio de la capacidad de retención vírica del sistema de filtración en las condiciones de filtración del Ejemplo 1.

Se utiliza como modelo vírico el fago Ø 174 cuyo tamaño se puede evaluar a 25 a 30 nm. La membrana y las condiciones de realización son las descritas en los Ejemplos 1 y 2.

Resultados:

Los resultados contenidos en la Tabla 6 siguiente demuestran una capacidad de retención vírica muy satisfactoria.

TABLA 6

	Superficie de filtración (m ²)	FVIII:C (UI/ml)	Volumen filtrado (l/m ²)	Carga vírica (log)	Retención vírica (log)
Ejemplo 1	0,01	15	14	8,3	>6,8
Ejemplo 2	0,01	19	15	7,5	>7,0

Ejemplo 7**Efecto del procedimiento según la invención sobre el contenido de vWF en la solución de factor VIII.**

- 5 Se ha comparado el contenido de vWF, así como el perfil de los multímeros de vWF, sobre una solución de factor VIII tal como se describe en el Ejemplo 1, antes y después del uso del procedimiento según la invención. Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 7 siguiente.

TABLA 7

10

	Antes de la filtración	Después de la filtración
FVIII (UI/ml)	17	7,9
vWF (UI/ml)	5,6	0,39
vWF / FVIII	0,33	0,05
multímeros de vWF ≥ 15	12 %	-
multímeros de vWF ≥ 10	32,4 %	3,3 %
multímeros de vWF ≥ 5	71,5 %	35,6 %

Así, el uso del procedimiento según la invención permite obtener una solución de factor VIII esencialmente desprovista de vWF con alto peso molecular, en especial esencialmente desprovista de las fórmulas multiméricas con un grado de polimerización ≥ 15 .

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación mediante filtración de una solución de factor VIII víricamente segura y esencialmente desprovista de vWF de alto peso molecular, según el cual:
 - se prepara una solución de alta o muy alta pureza que comprende complejo proteico de factor VIII-vWF;
 - se realiza una etapa que permite la disociación de los complejos de factor VIII-vWF de alto peso molecular, por medio de un ión caotrópico en cantidad suficiente para permitir la disociación, y la obtención de una solución esencialmente desprovista de factor VIII asociado a vWF de alto peso molecular,
 - se realiza una etapa de filtración de dicha solución sobre un filtro hidrófilo que tiene una porosidad de 15 nm.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho ión caotrópico es un ión divalente.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho ión divalente es el ión Ca^{2+} .
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho ión divalente se añade en forma de una solución salina de 0,2 M hasta saturación de las sales.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha solución es una solución de CaCl_2 .
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado porque dicho ión Ca^{2+} se añade en forma de una solución de CaCl_2 , 0,35 M hasta saturación.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho filtro es una membrana Planova® 15 N utilizada con una presión inferior a 0,3 bares, preferentemente inferior a 0,2 bares.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la etapa de filtración se efectúa a una temperatura del orden de 35 ± 5 °C.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la solución de partida se obtiene mediante purificación de una fracción plasmática, especialmente de la fracción crioprecipitada del plasma, mediante cromatografía de intercambio iónico.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la fracción concentrada de factor VIII, obtenida al final de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico se eluye en las condiciones disociantes de la etapa de disociación.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la solución de factor VIII de partida se obtiene mediante purificación previa de una fracción plasmática, especialmente de la fracción crioprecipitada del plasma, mediante precipitación con heparina.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la solución de factor VIII de partida está parcialmente desactivada víricamente mediante tratamiento con disolvente-detergente.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la solución de factor VIII de partida comprende un factor VIII inmunopurificado.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la solución de factor VIII de partida comprende factor VIII recombinante.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la solución de partida es de origen plasmático.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque el factor VIII en la solución de partida tiene una actividad específica por lo menos igual a 50 UI/mg, preferentemente por lo menos igual a 100 UI/mg.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque la concentración en factor VIII C de la solución de factor VIII de partida está comprendida entre 2 y 100 U/ml, preferentemente entre 10 y 50 U/ml.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque el contenido de proteínas de la solución de factor de partida está comprendida entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,5 mg/ml, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 mg/ml.

19. Solución de factor VIII víricamente segura susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

5 20. Solución según la reivindicación 19, como medicamento.

21. Solución según la reivindicación 20, como medicamento para el tratamiento de la hemofilia A.

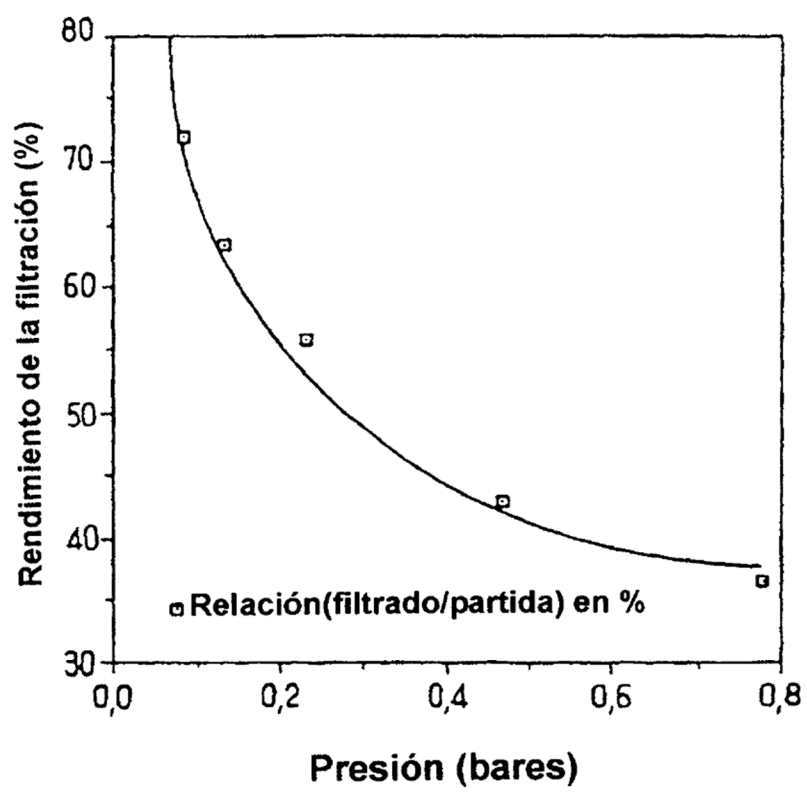


FIG.1