

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 337/97

(51) Int.Cl.⁶ : **C07K 14/435**

(22) Anmeldetag: 27. 2.1997

(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.1998

(45) Ausgabetag: 25. 8.1999

(56) Entgegenhaltungen:

DE 4435485C1 EP 0469985A1
C.A. 122(5) 1995 : 49702G C.A. 116(18) 1992 : 181116Z
C.A. 116(26) 1992 : 262341W C.A. 108(9) 1988 : 71158S

(73) Patentinhaber:

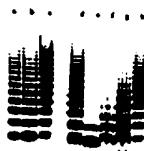
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FISCHER BERNHARD
WIEN (AT).
SCHÖNBERGER ÖYVIND L. DR.
WIEN (AT).
MITTERER ARTUR DR.
MANNSDORF, NIEDERÖSTERREICH (AT).
FIEDLER CHRISTIAN ING.
WIEN (AT).
DORNER FRIEDRICH
WIEN (AT).
ETBL JOHANN DR.
WIEN (AT).

(54) **REINIGUNG VON VON WILLEBRAND-FAKTOR DURCH KATIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE**

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von vWF, bei welchem vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch fraktionierte Elution vWF mit hoher spezifischer Aktivität gewonnen wird, sowie eine Präparation mit gereinigtem vWF, welche durch dieses Verfahren erhältlich ist.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten von Willebrand-Faktor-(vWF) mittels Kationenaustauscherchromatographie.

Im Plasma zirkuliert der vWF in einer Konzentration von 5 - 10 mg/l zum Teil in Form eines nicht-kovalenten Komplexes mit Faktor VIII. Der vWF ist ein Glycoprotein, welches in verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers gebildet und später in die Zirkulation freigesetzt wird. Dabei wird in den Zellen ausgehend von einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 225000 Da (vWF-Monomer) durch Ausbildung von mehreren Schwefelbrücken ein vWF-Dimer (primäres vWF-Dimer) mit einem Molekulargewicht von ca. 450000 Da synthetisiert. Aus den vWF-Dimeren werden wiederum durch Verknüpfung über Schwefelbrücken weitere Polymere des vWF mit immer höheren Molekulargewichten, bis ca. 20000000 Da hergestellt.

Ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung des vWF ist die Multimer-Struktur-Analyse durch Agarose Elektrophorese. Es wird vermutet, daß insbesondere den hochmolekularen vWF-Polymeren essentielle Bedeutung bei der Blutgerinnung zukommt. Die funktionelle Aktivität des vWF wird üblicherweise durch die Ristocetin-Kofaktoraktivität (vWF:RistCoF) bestimmt. Als Merkmal für die Reinheit und spezifische Wirksamkeit des vWF wird das Verhältnis zwischen Aktivität und vWF-Antigenkonzentration (vWF:Ag) ermittelt. Die spezifische Aktivität eines Präparates nimmt mit zunehmendem vWF:RistCoF zu vWF:Ag-Verhältnis zu.

Der vWF erfüllt wichtige Funktionen im Rahmen der Hämostase. Er zirkuliert im Plasma zum Teil als Komplex mit Faktor VIII, der die Blutgerinnung als Cofaktor unterstützt. Faktor VIII wird durch die Komplexbildung mit vWF stabilisiert und vor proteolytischem Abbau geschützt. Eine weitere Aufgabe des vWF ist seine Beteiligung an der Thrombozytenaggregation, die einen wichtigen Beitrag zur primären Hämostase leistet. Dabei bindet der vWF an die Glycoproteine Ib und IIb/IIIa der Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten und vernetzt damit die Thrombozyten zu einem Thrombozyten-Aggregat. Weiterhin bedeutend für die primäre Hämostase ist die Affinität des vWF zu Collagen, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, die in intakten Gefäßen keinen direkten Kontakt mit dem Blut hat, da sie durch einen Monolayer aus Endothelzellen vom Blutstrom abgeschirmt ist. Bei Verletzung von Blutgefäßen kommt es aber am Ort der Läsion durch lokale Ablösung der Endothelzellschicht zu einer direkten Exposition der Bestandteile der extrazellulären Matrix mit dem Blut. Durch seine Affinität zum Collagen ist der vWF in der Lage, das sich bildende Thrombozyten-Aggregat im geschädigten Gefäßbereich am exponierten Subendothel zu fixieren. Dadurch erfolgt ein erster, labiler Wundverschluß, der durch die nachfolgende Blutgerinnung verfestigt wird.

Das von Willebrand-Syndrom ist durch einen Mangel eines funktionellen von Willebrand-Faktors oder durch ein abnormes Spektrum in der Multimerzusammensetzung des von Willebrand Faktors charakterisiert. Bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom kann es, trotz der in der Regel normalen Syntheserate des Faktor VIII durch mangelnde Stabilisierung des Faktor VIII, zu einem Faktor VIII-Mangel kommen, der auf der stark verringerten Plasmahalbwertszeit dieses Gerinnungsfaktors beruht. Daher können Patienten mit von Willebrand-Syndrom ähnliche Symptome wie Hämophilie A-Patienten zeigen (phänotypische Hämophilie). Durch das Fehlen von funktionell aktivem vWF kann es bei Patienten mit von Willebrand-Syndrom auch zu Funktionsstörungen bei der Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion kommen, wodurch Defekte in der primären Hämostase auftreten können. Bedingt durch Störungen dieser vWF-vermittelten Vorgänge zeigen Patienten mit von Willebrand-Syndrom verlängerte Blutungszeiten.

Zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms müssen daher vWF-Präparate verabreicht werden, die den Mangel an funktionell aktivem vWF ausgleichen. Dazu können Präparate eingesetzt werden, die auch zur Therapie der Hämophilie A verwendet werden, wie Kryopräzipitat oder daraus hergestellte Faktor VIII-Konzentrate, die Komplexe aus Faktor VIII und vWF enthalten. Allerdings werden zur Behandlung der Hämophilie A immer besser gereinigte Faktor VIII:C-Konzentrate eingesetzt, die den vWF nicht oder nur noch in Spuren enthalten. Da die Supplementierung von Patienten mit von Willebrand-Syndrom mit Faktor VIII nicht notwendig ist und die Faktor VIII-Applikation die Gefahr einer Induktion von inhibitorischen Faktor VIII-Antikörpern im Patienten birgt, wäre ein vWF-Präparat, das möglichst weitgehend frei von kontaminierendem Faktor VIII ist, zur Behandlung des von Willebrand-Syndroms besonders wünschenswert. Daher besteht ein Bedarf an reinen und virussicheren von Willebrand Faktor-Präparationen mit hoher spezifischer Aktivität.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Reinigung und Gewinnung von vWF beschrieben.

Die EP 0 503 991 beschreibt die Reinigung von vWF aus humanem Kryopräzipitat durch drei aufeinanderfolgende chromatographische Schritte: 1. Anionenaustauscherchromatographie an TSK-DEAE-Fractogel und Elution des vWF durch 0,15 M NaCl; 2. Nochmalige Anionenaustauscherchromatographie an TSK-DEAE-Fractogel und Elution des vWF durch 0,17 M NaCl und 3. Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose zur Abtrennung des kontaminierenden Fibrinogens. Dabei wurden Aminosäure- und Calciumionen-haltige Puffer verwendet.

Die WO 89/12065 beschreibt die Trennung von plasmatischem vWF von Faktor VIII und weiterer Proteine durch Bindung der Proteine an einen Anionenaustauscher und stufenweise Elution durch Erhöhung der Salzkonzentration. Die vWF-haltige Fraktion wurde ein zweites Mal über einen Anionenaustauscher chromatographiert und als Konzentrat gewonnen.

5 Die EP 0 469 985 offenbart die Reinigung von plasmatischem vWF aus Kryopräzipitat, wobei in einem ersten Schritt Faktor VIII selektiv bei einer Salzkonzentration von 250 mM an einen Anionenaustauscher gebunden wird, während vWF im Überstand verbleibt. Nach Erniedrigung der Salzkonzentration des vWF-haltigen Überstandes auf eine Salzkonzentration zwischen 100 mM und 150 mM wird vWF an einen zweiten Anionenaustauscher gebunden und bei pH 6,6 mit 300-350 mM NaCl eluiert. Dabei wird vWF mit einer
10 Aktivität von mindestens 50 U/mg, der einen Anteil von Faktor VIII von < 2% enthält, gewonnen.

Die DE 39 04 354 beschreibt die Gewinnung von plasmatischem vWF aus Kryopräzipitat und die Trennung von vWF vom Faktor VIII durch selektive Adsorption von Faktor VIII an einen Anionenaustauscher, während vWF in Lösung bleibt. Dabei wird eine Lösung enthaltend 160 U/ml vWF gewonnen.

Die US 5,006,642 beschreibt die Gewinnung von vWF aus einer gemäß der US 4,361,509 als
15 Nebenprodukt anfallenden Lösung aus vWF und chaotropem Agens durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer oder ein Entsalzen der Lösung durch einen weiteren chromatographischen Schritt.

Die EP 0 383 234 beschreibt die Herstellung eines vWF-Konzentrates mittels Anionenaustauscherchromatographie, wobei ein in einer Lösung enthaltener Faktor VIII/vWF-Komplex durch Zugabe eines calcium- und aminosäurehaltigen Puffers dissoziiert und ein vWF-Konzentrat gewonnen wird.

20 Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hoch-reinem rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustausch/ Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung von hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinantem vWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Um eine gereinigte vWF-Präparation mit hoher spezifischer Aktivität zu gewinnen, war es bisher
25 notwendig, mehrere chromatographische Schritte zu kombinieren. Insbesondere die Herstellung von Präparaten, die insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthielten, war bisher nur über eine Heparin-Affinitätschromatographie möglich. Heparin ist jedoch ein relativ kostspieliges Chromatographiematerial.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein für die großtechnische Anwendung im industriellen Maßstab geeignetes Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität
30 zur Verfügung zu stellen. Das Verfahren sollte sowohl für die Reinigung von rekombinantem als auch plasmatischem vWF einsetzbar sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Gewinnung von vWF zur Verfügung gestellt wird, bei dem vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch stufenweise, fraktionierte Elution vWF, bestehend insbesondere aus hochmoleku-
35 laren vWF-Multimeren mit hoher spezifischer Aktivität, gewonnen wird. Die Gewinnung und Anreicherung von vWF mit verbesserter Aktivität und Stabilität erfolgt insbesondere dadurch, daß durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration erst Fraktionen enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, inaktive Abbauprodukte und unspezifische Begleitproteine bei einer mittleren Salzkonzentration abgetrennt werden und Fraktionen, enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher spezifischer Aktivität, bei einer
40 höheren Salzkonzentration gewonnen werden.

vWF wird üblicherweise aufgrund seines sauren isoelektrischen Punktes (IEP = 5,5 bis 6) und seiner daraus resultierenden negativen Netto-Ladung im schwach sauren bis basischen Milieu über positiv geladene Anionenaustauscher aufgereinigt. Es war daher aufgrund von den bisher beschriebenen Verfahren zur Reinigung von vWF mittels positiv geladener Anionenaustauscher nicht zu erwarten, daß vWF bei einem
45 pH-Wert, der oberhalb des IEP des vWF liegt und niedriger Salzkonzentration an eine negativ geladene Gelmatrix eines Kationenaustauschers bindet und von dieser durch Erhöhung der Salzkonzentration selektiv eluierbar ist. Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß durch stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration \geq 300 mM vWF, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhalten wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren
50 ausgehend von einem unreinen biologischen Material gereinigte Fraktionen erhalten werden, die im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren sind. Dadurch werden durch das Verfahren neben den unspezifischen Begleitproteinen auch Nukleinsäuren aus Proteinpräparationen entfernt. Dieser Effekt kann mit herkömmlichen Verfahren mittels Anionenaustauscher nicht gezeigt werden, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung an den Anionenaustauscher binden, sich durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder vom Anionenaustauscher ablösen und ins Eluat gelangen.

Bei der Reinigung des vWF ist insbesondere zu beachten, daß, bedingt durch die Größe des vWF von 500 000 bis mehrere Millionen, nur solche Trägermaterialien gute Reinigungen und Ausbeuten liefern, die das vWF-Molekül in der Diffusion und Verteilung in den verwendeten Trägermaterialien nicht behindern. Bei

der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Reinigung von vWF mit hoher spezifischer Aktivität mittels Kationenaustauscher wird nicht nur eine Gelmatrix verwendet, die eine hohe Beladungskapazität besitzt, robust in der Handhabung ist und ein scharfes Elutionsprofil zeigt, sondern die sich auch im industriellen Maßstab ökonomisch einsetzen läßt. Damit wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Gewinnung von reinem vWF im großtechnischen Ansatz interessant.

Zur Durchführung des Verfahrens kann jeder bekannte Kationenaustauscher eingesetzt werden, wobei Kationenaustauscher mit einem Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierten Träger bevorzugt sind. Als gut geeignet haben sich zum Beispiel SP-Sepharose® Fast Flow und CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP und Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) und Toyopearl™ SP 550 C und Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas) erwiesen.

Als besonders günstig für die Gewinnung von gereinigtem vWF hat sich ein großporiges Gel mit Tentakelstruktur vom Typ Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck) erwiesen.

Die Adsorption des vWF an den Kationenaustauscher erfolgt vorzugsweise bei einer Salzkonzentration im Puffer von ≤ 250 mM. Durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann selektiv vWF bestehend im wesentlichen aus hochmolekularen vWF-Multimeren bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM eluiert werden. Niedermolekulare vWF-Multimere und proteolytische vWF-Abbauprodukte, die in der vWF-haltigen Lösung enthalten sind und die eine geringe spezifische Aktivität in bezug auf die vWF-Aktivität, insbesondere auf die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, die Kollagenbindungsaktivität und die spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen, werden bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM, vorzugsweise bei 300 mM vom Kationenaustauscher eluiert und abgetrennt.

Die Adsorption und Desorption des vWF kann in einem Puffer, enthaltend als Salz ein ein- oder zweiwertiges Metallion, erfolgen, wobei als Salz vorzugsweise NaCl verwendet wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem zur Elution der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine vorzugsweise eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Glycin, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und Salz verwendet. Der eingesetzte Puffer enthält dabei vorzugsweise keine Ca-Ionen.

Der Elutionspuffer kann einen pH-Wert im pH-Bereich zwischen 5,0 bis 8,5, vorzugsweise zwischen 6,0 und 8,0 aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Batch-Verfahren oder als Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Die optimalen Parameter wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind jedoch jeweils abhängig vom verwendeten Kationenaustauschermaterial. Es liegt jedoch im allgemeinen Wissen eines Fachmannes, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens, für den jeweilig eingesetzten Kationenaustauschertyp zu optimieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird insbesondere ein vWF gewonnen und angereichert, der insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren besteht. Niedermolekulare vWF-Multimere und vWF-Fragmente mit geringer spezifischer Plättchenagglutinations-Aktivität werden selektiv abgetrennt, so daß Fraktionen enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere mit hoher Aktivität und Spezifität erhalten werden.

Die gewonnene(n) vWF-Fraktion(en) ist (sind) im wesentlichen frei von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer Aktivität, Faktor VIII-Komplex, Faktor VIII:C, unspezifischen Begleitproteinen und kontaminierenden Nukleinsäuren.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von gereinigtem vWF mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jede vWF-haltige Lösung eingesetzt werden. Ausgangsmaterialien sind insbesondere biologische Materialien wie Plasma, eine Plasmafraktion, Kryopräzipitat, oder ein Überstand oder ein Extrakt einer rekombinanten Zellkultur.

vWF-haltige Lösungen können jedoch auch angereicherte Proteinlösungen sein, die durch einen vorangegangenen Reinigungsschritt, etwa über Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon, vorgereinigt wurden. Durch diese vorgeschalteten Verfahren wird insbesondere erreicht, daß vWF angereichert und unspezifische Begleitproteine, insbesondere Faktor VIII oder Faktor VIII-Komplex, selektiv abgetrennt werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Ausgangslösung eine über einen Anionenaustauscher angereicherte vWF-haltige Fraktion eingesetzt.

Mittels Anionenaustauscherchromatographie kann, abhängig von der Art der Durchführung der Anionenaustauscherchromatographie, vWF entweder als ungebundenes Material den Anionenaustauscher frei passieren oder an diesen adsorbieren. So wird vWF beispielsweise aus einer Plasmafraktion dadurch gewonnen und angereichert, daß sowohl vWF als auch Faktor VIII/vWF-Komplex bei geringer Ionenstärke und

Salzkonzentration im schwach saurem Milieu an einen Anionenaustauscher binden. vWF wird vom Anionenaustauscher dann bei einer mittleren Salzkonzentration von 150 mM bis 250 mM selektiv vom Anionenaustauscher eluiert, während Faktor VIII-Komplex und freier, nicht komplexierter Faktor VIII erst bei einer hohen Salzkonzentration von > 300 mM desorbieren.

5 Eine angereicherte vWF-Fraktion kann auch dadurch erhalten werden, daß eine vWF-haltige Lösung bei einer mittleren Salzkonzentration zwischen 100 mM und 200 mM mit einem Anionenaustauscher behandelt wird, wobei Faktor VIII-Komplex an den Anionenaustauscher bindet, während vWF in Lösung bleibt. Gebundener Faktor VIII-Komplex kann anschließend vom Anionenaustauscher durch Erhöhung der Salzkonzentration gewonnen werden.

10 Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird der in einer angereicherten Lösung mit einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM vorliegende vWF direkt aus dem Durchfluß oder Eluat bzw. als Überstand (beim Batch-Verfahren) gewonnen und gegebenenfalls, ohne Änderung der Ionenstärke oder Salzkonzentration an den Kationenaustauscher gebunden. Die Salzkonzentration kann jedoch, falls erforderlich, auch durch Verdünnung erniedrigt werden.

15 Diese Ausführungsform hat den besonderen Vorteil, daß eine einfache Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie möglich ist, ohne aufwendige Umpufferung, Dialyse o.ä. der angereicherten Proteine.

Damit kann durch einen ersten Chromatographieschritt eine angereicherte vWF-haltige Fraktion erhalten werden und durch anschließende Kationenaustauscherchromatographie eine Reinigung und Trennung von hochmolekularen und niedermolekularen vWF-Fraktionen erreicht werden. Es sind jedoch auch andere Kombinationen, wie etwa Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie, Anionenaustauscher-/Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie möglich, um eine weitere Anreicherung und selektive Gewinnung von vWF mit hoher spezifischer Aktivität zu erreichen.

25 Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird vWF mit hoher spezifischer Aktivität aus einem unreinen vWF-haltigen Material mindestens 80fach angereichert.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines virussicheren Präparates die gewonnene vWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt. Dazu können alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wie chemisch/physikalische Methoden, Inaktivierung durch Kombination einer photoaktiven Substanz und Licht oder Abreicherung durch Filtration eingesetzt werden. Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verläßlich inaktivieren kann. Die Virusabreicherung erfolgt vorzugsweise durch eine Filtration über Nanofilter.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Präparation, enthaltend gereinigten vWF mit hoher spezifischer Aktivität, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhältlich aus einer vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie, zur Verfügung. vWF mit hoher spezifischer Aktivität wird ausgehend von einem Ausgangsmaterial, enthaltend u.a. vWF mit geringer Reinheit und niedriger spezifischer Aktivität, angereichert und Begleitproteine, insbesondere Faktor VIII bzw. Faktor VIII-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, selektiv abgetrennt. Dadurch wird insbesondere eine Präparation, enthaltend gereinigten vWF, der insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren besteht und im wesentlichen keine niedermolekularen vWF-Multimere und vWF-Abbauprodukte enthält, gewonnen.

Die erfindungsgemäße Präparation weist insbesondere eine spezifische Plättchenagglutinations-Aktivität von vWF von mindestens 65 U/mg Protein und eine spezifische Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein auf. Ebenso zeichnet sich die Präparation dadurch aus, daß sie im wesentlichen frei ist von Faktor VIII und einen Faktor VIII-Gehalt von < 0,1% in bezug auf das Verhältnis von Aktivität vWF zu Faktor VIII aufweist.

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit und geringe Infektiosität eines Produktes ist auch die Abwesenheit von kontaminierenden Nukleinsäuren. Die erfindungsgemäße Präparation ist daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren. "Im wesentlichen" bedeutet hier, daß der Gehalt an Nukleinsäure $\leq 0,7$ bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm ist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch gemäß einem Verfahren, wie es beispielsweise in der EP 0 714 987 und der EP 0 714 988 beschrieben wird, quantifiziert werden.

Bei Gewinnung und Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation mit plasmatischem vWF, aber auch mit rekombinantem vWF als Ausgangsmaterial wird, wie oben beschrieben, zur Entfernung von infektiösen Partikeln gegebenenfalls ein Virusabreicherungs/oder Inaktivierungsverfahren durchgeführt, wobei eine Virusinaktivierung und/oder Virusabreicherung prinzipiell vor oder nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom Ausgangsmaterial bis zur hergestellten pharmazeutischen Zubereitung erfolgen kann. Damit ist die erfindungsgemäße Präparation in jedem Fall virussicher.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform liegt die erfindungsgemäße Präparation in einer lagerstabilen Form vor. Die Präparation, enthaltend gereinigten vWF mit hoher spezifischer Aktivität, kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bereitgestellt werden. Aufgrund ihrer Reinheit ist die Präparation besonders stabil. So hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation bei -20 °C für mindestens 6 Monate, bei 4 °C in Lösung für mindestens 4 Wochen und als Lyophilisat für mindestens 1 Jahr stabil ist. Es zeigte sich, daß innerhalb des jeweiligen Zeitraumes die vWF-Aktivität um maximal 10% reduziert wird und auch das Multimermuster der vWF-Multimere keine wesentliche Änderung zeigt.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen. Der gereinigte vWF, enthalten in der erfindungsgemäßen Präparation, wird mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, Trisnatrium-citratdihydrat und/oder CaCl₂, und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert.

Die Präparation kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit phänotypischer Hämophilie und vWD verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Es zeigen:

Figur 1: Multimer-Analyse von rvWF vor und nach Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie

Figur 2: Multimer-Analyse von vWF aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF an den Anionenaustauscher bindet (Beispiel 2 A)

Figur 3: Multimer-Analyse von vWF aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF nicht an den Anionenaustauscher bindet (Beispiel 2 B)

Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von rvWF aus Kulturüberständen rekombinanter Zellen mittels Kationenaustauscherchromatographie; Beispiel 2 beschreibt die Reinigung von plasmatischem vWF mittels Kationenaustauscherchromatographie und vorgeschaltener Anionenaustauscherchromatographie; Beispiel 3 beschreibt die Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher-/Immunaффinitäts- und Kationenaustauscher-Chromatographie.

Beispiel 1:

Reinigung von vWF aus Kulturüberständen rekombinanter Zellen mittels Kationenaustauscherchromatographie

vWF wurde in rekombinanten CHO-Zellen in einem üblichen Kulturmedium produziert. Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und Zellen und Zellbruchstücke durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung zur Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen, wie Membranbruchstücke, durch Filter mit Porengröße von 0,4 µm geklärt.

Eine Chromatographiesäule (50 ml) wurde mit einem Kationenaustauscher (Fractogel® EMD-SO3) gefüllt und mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer) gespült. Anschließend wurde die Kationenaustauschersäule mit dem zellfreien Kulturüberstand beladen, wobei solche Proteine, die nicht an den Austauscher binden, im Durchfluß erhalten wurden (Fraktion 1). Gebundene unspezifische Begleitproteine wurden durch Spülen der Säule mit Puffer, enthaltend 0,3 M NaCl, entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde gebundener vWF vom Austauscher mit Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, desorbiert und im Eluat erhalten (Fraktion 3).

Alle Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt, vWF-Antigengehalt (vWF:Ag), vWF-Aktivität (Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, vWF:RistCoF), untersucht und einer vWF-Multimer-Analyse unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode (M. Bradford (1976), Anal. Biochem., 72: 248-254) bestimmt. Der Gehalt an vWF wurde mittels eines handelsüblichen ELISA-Systems (ASSERACHROM®vWF, Boehringer Mannheim) bestimmt. Die Ristocetin-CoFaktor-Aktivität wurde mittels eines üblichen Testsystems (v-Willebrand-Reagenz®, Behringwerke) ermittelt. Die Ergebnisse der Kationenaustauscherchromatographie sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Fig. 1 zeigt die vWF-Multimer-Analyse vor und nach Reinigung über den Kationenaustauscher.

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß der gesamte im Ausgangsmaterial vorhandene vWF mit Ristocetin-CoFaktor-Aktivität durch den Kationenaustauscher gebunden wird. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit einem Puffer, enthaltend 0,3 M NaCl (Fraktion 2), wird vWF ohne meßbare Aktivität entfernt. Durch Elution mit 0,5 M NaCl (Fraktion 3) wird vWF mit nahezu aller Ristocetin-CoFaktor-Aktivität erhalten. Außerdem wird eine hohe Abreicherung von DNA des Kulturüberstandes erhalten: das Absorptionsverhältnis 260 nm / 280 nm fällt von 1,2 auf 0,7. Mit diesem einen chromatographischen Schritt ergibt

sich ein Reinigungsfaktor von 10.

Figur 1 zeigt die Multimer-Analyse von vWF vor und nach Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie. In Fig. 1, Spur A, ist ungereinigter rvWF, in Spur B vWF-Multimere der Fraktion 1 im Durchlauf; in Spur C vWF-Multimere der Fraktion 2 (0,3 M NaCl-Eluat) und in Spur D die der Fraktion 3 (0,5 M NaCl-Eluat) gezeigt. Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß durch die Kationenaustauscherchromatographie und selektive Elution ein vWF, enthaltend insbesondere hochmolekulare Multimerstrukturen erhalten wird. Niedermolekulare vWF-Multimere bzw. vWF-Abbauprodukte werden entweder nicht an den Kationenaustauscher gebunden (Fraktion 1) oder durch Elution mit 0,3 M NaCl selektiv abgetrennt (Fraktion 2).

10

Tabelle 1 Reinigung von rekombinantem vWF (rvWF) mittels Kationenaustauscherchromatographie

15

20

25

30

Probe	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (µg/ml)	UV-Absorptions- verhältnis 260 nm / 280 nm
Ungereinigter vWF	0,338	120,36	1,2
Fraktion 1 (nicht gebunden)	0	2,8	1,5
Fraktion 2 (Eluat 0,3 M NaCl)	0	10,7	0,7
Fraktion 3 (Eluat 0,5 M NaCl)	0,450	48,9	0,7

35

Beispiel 2 :

Reinigung von plasmatischem vWF über Kationenaustauscher mit vorgeschaltener Reinigung über Anionenaustauscher

40

A. Anionenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF an den Anionenaustauscher bindet und selektive Elution von vWF

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde $Al(OH)_3$ eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Anionenaustauschersäule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurde durch Spülen der Säule mit einem 160 mM NaCl-haltigen Puffer entfernt. Durch Elution mit 250 mM NaCl im Puffer wurde vorrangig vWF vom Austauscher eluiert (Fraktion 1) Durch Elution mit 400 mM NaCl wurde anschließend FVIII-Komplex eluiert (Fraktion 2). Ausgehend vom Kryopräzipitat enthielt die Fraktion 1 68% der gesamten vWF-Aktivität, jedoch nur 10 % der gesamten FVIII-Aktivität. Restliche vWF-Aktivität und 80 % der FVIII-Aktivität sind in der Fraktion 2 enthalten.

55

Tabelle 2

Anreicherung von vWF mittels Anionenaustauscherchromatographie		
Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	13,5	13,6
Fraktion 1 (Eluat 250 mM NaCl)	5,4	2,8
Fraktion 2 (Eluat 400 mM NaCl)	4,5	11,8

Die vWF-haltige Fraktion 1 wurde anschließend auf eine Kationenaustauschersäule Fractogel® EMD-SO3 aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 100 mM NaCl entfernt. Anschließend wurde stufenweise mit 200 mM NaCl (Fraktion 1), 300 mM NaCl (Fraktion 2) und 400 mM NaCl (Fraktion 3) eluiert. Über 70 % der gesamten vWF-Aktivität wurde in der 400 mM NaCl-Fraktion gefunden. Es wurde keine FVIII:C-Aktivität gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Stufenweise Elution von vWF-Fraktionen vom Kationenaustauscher	
Probe	vWF:Risto-CoF-Aktivität (U/ml)
vWF Fraktion 1 (Tab.2)	5,4
Fraktion 1 (Eluat 200 mM NaCl)	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0,2
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	3,75

Während die spezifische Aktivität des vWF im Kryopräzipitat 0,6 U/mg Protein betrug, beträgt diese im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie 65 U/ml. Die spezifische Collagen-Bindungsaktivität stieg von 0,7 U/mg Protein im Kryopräzipitat auf 65 U/mg Protein im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie. Ausgehend von Kryopräzipitat wurde die Reinheit des vWF 100-fach erhöht.

Figur 2 zeigt die vWF-Multimer-Analyse während der kombinierten Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie. Die Spuren A bis E zeigen dabei die Reinigung über Anionenaustauscher und die Spuren F bis K die über Kationenaustauscher. Es zeigen Fig. 2, Spur A das vWF-Multimermuster von vWF im Kryopräzipitat, Spur B nach Filtration, Spur C im Durchlauf, Spur D das 250 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 2), Spur E das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 2), Spur F das 250 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 2) vor der Kationenaustauscherchromatographie, Spur G den Durchlauf, Spur H das 200 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 3), Spur I das 300 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 3) und Spur K das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 3, Tabelle 3). Aus Spur H und I ist erkennbar, daß durch Elution mit 200 mM NaCl bzw. 300 mM NaCl nur niedermolekulare vWF-Multimere vom Kationenaustauscher abgelöst werden. Elution des Kationenaustauschers mit 400 mM NaCl, Spur K, ergab vWF enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere.

B. Anionenaustauscherchromatographie unter Bedingungen, unter denen vWF nicht an den Anionenaustauscher bindet und in Lösung verbleibt

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin, 120 mM NaCl bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde Al(OH)₃ eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Säule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit Lösungspuffer erhalten (Fraktion 1). Diese Fraktion 1 enthielt 60 % der vWF-Aktivität und nur 10 % der FVIII-Aktivität. Durch Elution der Säule mit 400 mM NaCl (Fraktion 2) wurde anschließend FVIII-Komplex erhalten.

Tabelle 4

Anreicherung von vWF mittels Anionenaustauscherchromatographie		
Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	12,5	12,2
Fraktion 1 (vWF nicht gebunden)	3,5	0,7
Fraktion 2 Eluat 400 mM NaCl	2,5	14,5

Die vWF-haltige Fraktion 1 wurde anschließend auf eine Kationenaustauschersäule (Fractogel® EMD-SO3) aufgetragen. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 100 mM NaCl entfernt. Anschließend wurde stufenweise mit 200 mM NaCl (Fraktion 1), 300 mM NaCl (Fraktion 2) und 400 mM NaCl (Fraktion 3) eluiert. Über 70 % der vWF-Aktivität wurden in der 400 mM NaCl-Fraktion gefunden. Es wurde kein Faktor VIII-Antigen und FVIII:C-Aktivität gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Stufenweise Elution von vWF-Fraktionen vom Kationenaustauscher	
Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)
vWF (Fraktion 1, Tab. 4)	3,5
Fraktion 1 (Eluat 200 mM NaCl)	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0,2
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	3,75

Während die spezifische Aktivität des vWF im Kryopräzipitat 0,6 U/mg Protein betrug, beträgt diese im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie 47 U/mg. Die spezifische Collagen-Bindungsaktivität stieg von 0,7 U/mg Protein im Kryopräzipitat auf 51 U/mg Protein im 400 mM NaCl-Eluat nach Kationenaustauscherchromatographie. Ausgehend von Kryopräzipitat wurde die Reinheit des vWF 80-fach erhöht.

Figur 3 zeigt die vWF-Multimer-Analyse während der kombinierten Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie. Die Spuren a bis c zeigen dabei Reinigung über Anionenaustauscher und die Spuren d bis h die über Kationenaustauscher. Es zeigen Fig. 3, Spur a das vWF-Multimermuster von vWF im Kryopräzipitat, Spur b im Durchlauf, Spur c das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 4), Spur d den Durchlauf (Fraktion 1, Tabelle 4) vor der Kationenaustauscherchromatographie, Spur e den Durchlauf über Kationenaustauscher, Spur f das 200 mM NaCl-Eluat (Fraktion 1, Tabelle 5), Spur g das 300 mM NaCl-Eluat (Fraktion 2, Tabelle 5) und Spur h das 400 mM NaCl-Eluat (Fraktion 3, Tabelle 5). Die vWF-Multimerstruktur des vWF in den Fraktionen, die mit 200 mM NaCl (Spur f) bzw. 300 mM NaCl (Spur g), sowie 400 mM NaCl (Spur h) nach Kationenaustauscherchromatographie erhalten wurden, ist entsprechend dargestellt. Das 400 mM NaCl-Eluat (Spur h) zeigt ein hochmolekulares vWF-Multimermuster und enthält mehr als 70% der vWF-Aktivität.

Beispiel 3:

Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher-/Immunaффinitäts- und Kationenaustauscherchromatographie

vWF wurde durch rekombinante CHO-Zellen in einem üblichen Kulturmedium produziert. Nach der Fermentation der transformierten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, Zellen und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung zur Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen, wie Membranbruchstücke, durch Filter mit Porengröße von 0,4 µm filtriert.

Anionenaustauscher-Chromatographie

1000 ml zellfreier Kulturüberstand wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 cm/min über eine Säule (7,1 cm² x 8 cm, gefüllt mit 57 ml Anionenaustauscher Fractogel® EMD-TMAE 650 M (Merck)) filtriert. Das Gel wurde zuvor mit 20 mM Tris-HCl- Puffer (pH 7,0) äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0), der 0,1 M NaCl enthielt, gewaschen. Begleitstoffe und vWF mit geringer RistCoF-Aktivität wurden durch Waschen der Säule mit 200 mM NaCl enthaltendem Puffer entfernt. Der rvWF wurde dann mit 280 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) vom Träger eluiert.

Immunaффinitätschromatographie

Das 280 mM NaCl-Eluat des Anionenaustauscherschrittes wurde auf ein immobilisiertes Antikörperharz (Säulendimension: 19,6 cm² x 5,6 cm; Gelbettvolumen: 110 ml; Harzmatrix: Sepharose CL2B; Antikörper: Fab-Fragmente des murinen monoklonalen Antikörpers AvW8/2), das mit 20 mM Na-Acetat, 300 mM NaCl, (pH 7,0) äquilibriert worden war, mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,255 cm/min geladen. Anschließend wurde mit 20 mM Na-Acetat, 300 mM NaCl (pH 7,0), dem 0,5% Tween 80 zugesetzt waren, gespült. r-vWF wurde mit 20 mM Glycin-Puffer, dem 10% Saccharose zugesetzt worden war, bei pH 8,0 eluiert. Nach 80% des Säulenvolumens wurde die Fließgeschwindigkeit um das rund 20-fache reduziert.

Kationenaustauscher-Chromatographie

Eine Chromatographiesäule (7,1 cm² x 8 cm, gefüllt mit 57 ml Fractogel® EMD-SO3) wurde mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer; pH 5,0) gespült. Anschließend wurde das Eluat der Immunaффinitätschromatographie durch die Kationenaustauschersäule filtriert. Nach erneutem Waschen der Säule mit 30 mM Glycin-NaCl-Puffer wurden an den Kationenaustauscher gebundene Begleitstoffe und vWF mit geringer spezifischer Aktivität durch Spülen der Säule mit gepufferter 0,3 M NaCl-Lösung entfernt. Anschließend wurde vWF von der Austauschersäule durch Elution mit Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, in der Fraktion 3 erhalten.

Nach den einzelnen Chromatographie-Schritten wurde die Proteinkonzentration, der Gehalt an rvWF-Antigen (vWF:Ag) und die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität (vWF:RistCoF) ermittelt.

Es wurde gefunden, daß rvWF durch die Anionenaustauscherchromatographie um den Faktor 2,3 angereichert wird. In der darauffolgenden Immunaффinitätschromatographie erfolgte eine weitere Anreicherung um den Faktor 3,6. Durch die daran anschließende Kationenaustauscherchromatographie konnte der vWF nochmals um einen Faktor 5,2 angereichert werden. Außerdem konnten durch diesen Schritt die im Eluat der Immunaффinitätssäule vorhandenen Spuren an murinem Antikörper praktisch vollständig entfernt werden (<0,02 mg/1000 U vWF RistCoF-Aktivität). Durch anschließende Kationenaustauscherchromatographie erfolgte eine Abtrennung der niedermolekularen vWF-Multimere und Anreicherung von vWF mit hochmolekularen Multimerstrukturen, wodurch das Verhältnis von vWF:RistCoF- zu vWF:Ag-Aktivität um den Faktor 4 gesteigert werden.

Die Ergebnisse der Reinigung des rvWF in den unterschiedlichen Stufen dieses sequenziellen Reinigungsverfahrens sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 Reinigung von rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher-
/Immunaффinitäts- und Kationenaustauscher-Chromatographie

Probe	Protein (mg/ml)	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (mg/ml)	vWF:RistCoF/Protein (U/mg)
Ungereinigter vWF	0,626	1,013	0,116	1,62
Eluat Anionenaustauscher	0,684	2,588	0,322	3,78
Eluat Immunaффinität	0,198	2,700	0,348	13,64
Eluat Kationenaustauscher	0,046	2,250	0,074	59,20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem vWF mit hoher spezifischer Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß vWF bei einer niedrigen Salzkonzentration an einen Kationenaustauscher gebunden wird

und durch fraktionierte Elution freigesetzt wird.

2. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß vWF bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an den Kationenaustauscher gebunden wird und vWF-Fractionen, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM eluiert werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß vWF-haltige Fractionen, enthaltend hochmolekulare vWF-Multimere, in einem Puffer mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 5,0 bis 8,5, vorzugsweise zwischen 6,0 und 8,0, eluiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß niedermolekulare vWF-Multimere, proteolytische vWF-Abbauprodukte mit geringer spezifischer Aktivität und unspezifische Begleitproteine bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM, entfernt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierter Träger ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß vWF-haltige Fraction(en), enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, mit einer spezifischen Plättchenagglutinations-Aktivität von mindestens 65 U/mg Protein und einer spezifischen Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein gewonnen werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die gewonnene(n) vWF-haltige Fraction(en) frei ist (sind) von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer vWF-Aktivität und kontaminierenden Nukleinsäuren, bzw einen Gehalt an Nukleinsäure von $\leq 0,7$, bezogen, auf das Verhältnis 260/280 nm, aufweist (aufweisen).
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß vWF mit hoher spezifischer Aktivität aus Plasma, einer Plasmafraction, Kryopräzipitat, dem Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinlösung gewonnen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die angereicherte Proteinlösung durch einen vorangegangenen Reinigungsschritt erhalten wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die angereicherte Proteinlösung durch ein chromatographisches Verfahren, wie Anionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon erhalten wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die gewonnene(n) vWF-haltige(n) Fraction(en) zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt wird (werden).
12. Präparation enthaltend gereinigten vWF, bestehend insbesondere aus hochmolekularen vWF-Multimeren, erhältlich aus einer vWF-haltigen Proteinlösung durch Kationenaustauscherchromatographie. nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Präparation nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie keine niedermolekularen vWF-Multimere, inaktive vWF-Abbauprodukte und kontaminierende Nukleinsäuren enthält, bzw einen Gehalt an Nukleinsäure von $\leq 0,7$, bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm, aufweist.
14. Präparation nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie vWF mit einer spezifischen Plättchenagglutinationsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein und einer spezifischen Collagen-Bindungsaktivität von mindestens 65 U/mg Protein enthält.
15. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie frei ist von Faktor VIII und daher einen Faktor VIII-Gehalt von $< 0,1\%$ in bezug auf das Verhältnis von Aktivität vWF zu Faktor VIII:C aufweist.

AT 405 403 B

16. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie virussicher ist.
17. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.
- 5 18. Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.
- 10 19. Verwendung einer vWF-haltigen Präparation nach einem der Ansprüche 12 bis 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit phänotypischer Hämophilie und vWD.

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

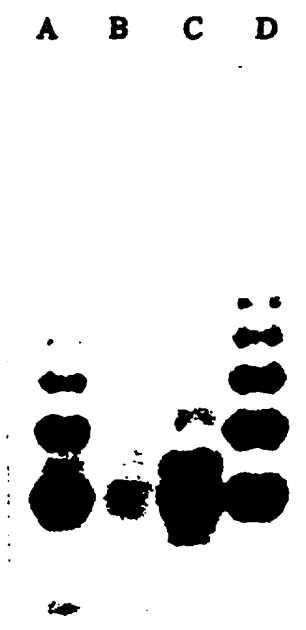


FIG. 1

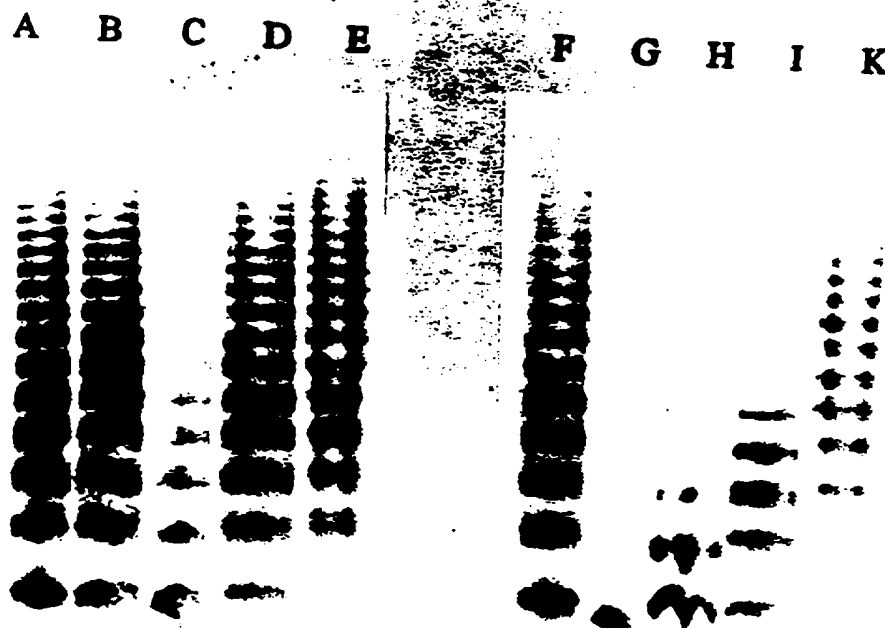


FIG. 2

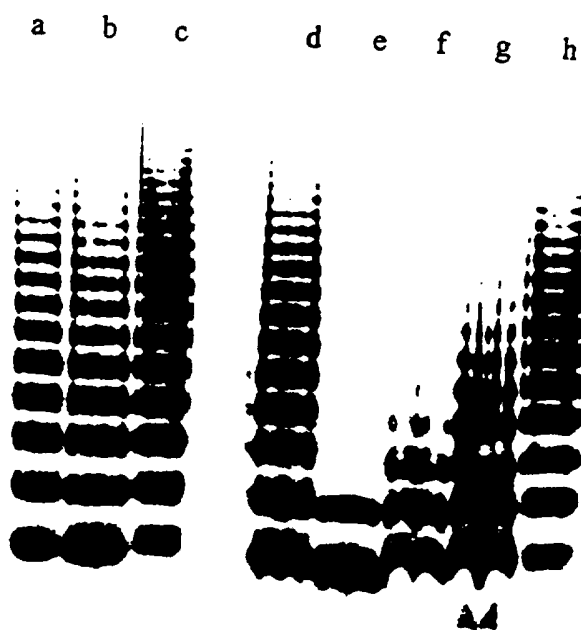


FIG. 3