

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 306 471**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(96) Número de solicitud europea: **98905132 .1**

(96) Fecha de presentación: **27.02.1998**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0971958**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2000**

(54) Título: **Procedimiento para la purificación de un complejo factor VIII/factor von Willebrans(vWF) por cromatografía de intercambio catiónico**

(30) Prioridad:
27.02.1997 AT 33897

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.11.2008**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **07.06.2012**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **07.06.2012**

(73) Titular/es:
Baxter Innovations GmbH
Industriestrasse 67
1220 Wien, AT

(72) Inventor/es:
MITTERER, Artur;
FISCHER, Bernhard;
SCHÖNBERGER, Öyvind, L.;
THOMAS-URBAN, Kathrin;
DORNER, Friedrich y
EIBL, Johann

(74) Agente/Representante:
Aznárez Urbieto, Pablo

ES 2 306 471 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de un complejo factor VIII/ factor von willebrand (vWF) por cromatografía de intercambio catiónico

5 La invención se refiere a un procedimiento para la purificación de un complejo factor VIII/vWF a partir de un material de partida biológico por cromatografía de intercambio catiónico (donde el intercambiador de cationes no es heparina) y elución gradual, así como a un complejo factor VIII/vWF purificado que, en particular, contiene multímeros de vWF de alto peso molecular.

10 En plasma, el factor von Willebrand circula en una concentración de 5 a 10 mg/l y, en su mayor parte, en forma de complejo con el factor VIII no ligado de modo covalente. En crioprecipitado, el complejo factor VIII/vWF está fuertemente enriquecido y puede aislarse del mismo o desde el plasma o desde fracciones de plasma mediante procedimientos de fraccionamiento conocidos.

15 En el caso de la hemofilia, la coagulación sanguínea se ve afectada por la falta de determinados factores plasmáticos de coagulación sanguínea. En el caso de la hemofilia A, la tendencia a la hemorragia se debe a una falta de factor VIII o de vWF (hemofilia fenotípica). El tratamiento de la hemofilia A se realiza en primer lugar sustituyendo el factor de coagulación deficiente por concentrados de factores, por ejemplo mediante infusión de factor VIII o de complejo factor VIII/vWF.

20 Para la terapia de pacientes con hemofilia A, pero también del síndrome de von Willebrand, es deseable utilizar un factor VIII purificado formando un complejo con vWF (Berntorp, 1994, Haemostasis 24: 289-297). En particular, siempre se destaca que en aquellos preparados sin o con un pequeño contenido en vWF se puede observar un mayor tiempo de hemorragia y un corto período de semidesintegración del factor VIII:C *in vivo*. La normalización del vWF *in vivo* es importante para mantener la concentración de factor VIII plasmática, tanto por reducción del porcentaje de eliminación de factor VIII como también por el refuerzo de la liberación de factor VIII endógeno (Lethagen y col., 1992, Ann. Hematol. 65: 253-259).

25 La DE 3 504 385 describe la realización de una cromatografía de intercambio iónico para la purificación del complejo factor VIII/vWF en la que se liga el complejo de factor VIII sobre grupos sulfato y se eluye con un tampón citrato, cloruro cálcico y un gradiente de NaCl. Aquí se eluye del vehículo el complejo factor VIII/vWF a una concentración 0,5M de NaCl.

30 La EP 0 416 983 describe la obtención del complejo factor VIII/vWF a partir de plasma humano mediante la combinación de un precipitado de cloruro de bario o de hidróxido de aluminio y una cromatografía de intercambio aniónico en fractogel DEAE.

Harrison y col. (Thrombosis Res., 1988, 50, 295-304) describe la purificación del complejo factor VIII/vWF mediante cromatografía en sefaroza-sulfato-dextrano.

35 La EP 0 600 480 describe un procedimiento para la purificación de complejo factor VIII/vWF a partir de plasma total por medio de una cromatografía combinada de intercambio aniónico/intercambio catiónico. Entonces se lleva a cabo la elución del complejo FVIII/vWF adsorbido en el intercambiador de cationes se realiza utilizando una sustancia tampón que contiene Ca con 0,3M NaCl, en un rango de pH entre 6,6 y 7,0.

40 La WO 96/10584 describe un procedimiento para la obtención de vWF recombinante altamente purificado por medio de una cromatografía de afinidad combinada de intercambio aniónico/heparina y la EP 0 705 846 describe la separación en fracciones tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular de vWF recombinante mediante cromatografía de afinidad/heparina.

45 Aunque los preparados de factor VIII descritos en el estado de la técnica actual contienen en su mayor parte todo el patrón multimérico de vWF, éste varía, sin embargo, entre la parte de vWF de alto peso molecular (HMW-vWF) y vWF de bajo peso molecular (LMW-vWF) y los preparados tienen las estructuras denominadas de triplete, que indican una descomposición proteolítica, en particular de HMW-vWF. Por ello, con frecuencia se ve limitada la estabilidad de estos preparados.

Continuamente se destaca que los preparados de factor VIII/vWF que contienen esencialmente HMW-vWF posiblemente favorecen positivamente la duración de la hemorragia, ya que realizan la función primaria del vWF, la aglutinación de plaquetas, y tienen una mayor afinidad con los receptores plaquetarios de glicoproteína IB y IIb/IIIa que los multímeros vWF de bajo peso molecular.

50 Existe la necesidad de un complejo de factor VIII con una actividad específica suficiente de factor VIII:C- y de vWF. El problema que surge durante la obtención de un complejo tal consiste particularmente en la separación de aquellas moléculas que contienen multímeros de vWF de bajo peso molecular y en el enriquecimiento de complejos con una alta actividad específica de vWF.

Por tanto, el objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un complejo factor VIII/vWF con una actividad específica y una estabilidad mejoradas.

Otro objetivo consiste en proporcionar un procedimiento para la obtención de tal complejo factor VIII/vWF. El procedimiento debería poder utilizarse para la purificación de complejos de factor VIII/vWF tanto recombinantes como también plasmáticos.

Según la invención este objetivo se alcanza en base a que se proporciona un procedimiento para la obtención de un complejo factor VIII/vWF en el que se liga el complejo factor VIII/vWF procedente de una solución proteica en un intercambiador de cationes - donde el intercambiador de cationes no es heparina -, y, mediante una elución gradual fraccionada, se obtiene un complejo factor VIII/vWF con una mejor actividad específica de vWF. En particular, la obtención y el enriquecimiento del factor VIII/vWF con una mejor actividad y estabilidad se lleva a cabo debido a que se liga el complejo factor VIII/vWF con una concentración baja de sal, mediante un aumento gradual de la concentración de sal se separan, con una mayor concentración de sal, fracciones que contienen el complejo factor VIII/vWF con multímeros de vWF de bajo peso molecular, con una concentración media de sal productos inactivos de la descomposición del vWF y proteínas accidentales no específicas y se obtienen fracciones que contienen el complejo factor VIII/vWF conteniendo especialmente multímeros de vWF de alto peso molecular con una concentración de sal alta.

Normalmente, el complejo factor VIII/vWF se purifica gracias a su punto isoelectrico ácido (IEP = 5,5 a 6) y a la carga neta negativa resultante en un medio desde ligeramente ácido hasta básico sobre el intercambiador aniónico cargado positivamente. Por tanto, no podía esperarse, debido a los procedimientos hasta ahora descritos para la purificación del complejo factor VIII/vWF por el intercambiador aniónico de carga positiva, que el complejo factor VIII/vWF también se uniera a una matriz de gel cargada negativamente de un intercambiador catiónico a un pH por encima del IEP del complejo y con una concentración de sal baja y que pudiera efectuarse una elución selectiva de la misma mediante el aumento de la concentración de sal. Tampoco podía esperarse que por elución gradual con una concentración de sal de entre ≥ 250 mM y ≤ 300 mM, proteínas accidentales no específicas se pudieran eluir productos inactivos de descomposición de vWF, componentes del complejo con una reducida actividad específica, multímeros de vWF de bajo peso molecular que contienen el complejo factor VIII/vWF, factor VIII sin formar complejo de bajo peso molecular o factor VIII débilmente ligado y factor VIII libre y que a una concentración de sal ≥ 350 mM se obtuviera, especialmente, un complejo factor VIII/vWF con multímeros de vWF de alto peso molecular.

Dentro del marco de la presente invención, se observa que con el procedimiento según la invención, partiendo de un material biológico impuro se obtienen fracciones purificadas esencialmente libres de ácidos nucleicos contaminantes. Así, mediante este procedimiento se eliminan ácidos nucleicos de los preparados proteicos. Este efecto no es posible con los procedimientos tradicionales de intercambio aniónico, debido a que los ácidos nucleicos se ligan al intercambiador de aniones por su carga negativa, se desprenden de nuevo del intercambiador aniónico debido al aumento de la concentración de la sal y entran en el producto de elución.

Durante la purificación del complejo factor VIII/vWF hay que tener en cuenta, particularmente, que, debido al tamaño del vWF, de 500.000 hasta varios millones, sólo tales sustancias vehículo permiten una buena purificación y un rendimiento, no impidiendo la difusión y distribución del complejo factor VIII/vWF en los vehículos utilizados. Durante la realización del procedimiento según la invención para la purificación del complejo factor VIII/vWF con una alta actividad específica por medio de intercambiadores de aniones, no sólo se utiliza una matriz de gel con una gran capacidad de carga, robusta en la manipulación y que muestra un claro perfil de elución, sino que también se puede utilizar de modo económico a escala industrial. Por tanto, el procedimiento según la invención resulta interesante a escala industrial, en especial para la obtención de un complejo purificado factor VIII/vWF.

Para la realización del procedimiento puede utilizarse cualquier intercambiador catiónico conocido, a excepción de heparina, dándose preferencia a los intercambiadores catiónicos con un vehículo conjugado con grupos sulfopropilo o carboximetilo. Resultan muy apropiados, por ejemplo, SP-Sepharose® Fast Flow y CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 y Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP y Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) y Toyopearl™ SP 550 C y Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas).

Especialmente ventajoso para la obtención de vWF purificado resulta un gel de gran tamaño de poro con una estructura tentacular del tipo Fractogel® EMD-SO3 y Fractogel® EMD COOH (Merck).

Preferentemente, la adsorción del complejo del factor VIII/vWF en los intercambiadores de cationes se produce con una concentración de sal en la sustancia tampón ≤ 250 mM. Por ello, las sustancias tampón de adsorción preferentes tienen una concentración de sal de 50 a 250 mM, en particular en el rango de 150 a 250 mM (por ejemplo 150 mM). Mediante el aumento gradual de la concentración de sal en la sustancia tampón se puede someter a elución selectiva el complejo factor VIII/vWF que contiene, especialmente, multímeros de vWF de alto peso molecular, con una concentración de sal de ≥ 350 mM. El complejo factor VIII/vWF que contiene multímeros de vWF de bajo peso molecular y productos proteolíticos de descomposición de vWF contenidos en la solución proteica y que tienen una actividad específica reducida con relación a la actividad de vWF, en especial en referencia a la actividad del cofactor de ristocetina, la actividad ligante de colágeno y la actividad específica de aglutinación plaquetaria, y factor VIII:C libre, son eluidos y, si es el caso, se obtienen en el intercambiador de cationes con una concentración de sal entre ≥ 250 mM y ≤ 300 mM,

preferentemente de 300 mM. Esta fracción puede utilizarse para una mayor purificación de, por ejemplo, el factor VIII:C libre, especialmente de la actividad de vWF como aglutinante plaquetario.

La adsorción y desorción del factor VIII/vWF puede realizarse en una sustancia tampón que contiene como sal un ión metálico mono- o bivalente, utilizándose como sal preferentemente NaCl.

- 5 En el procedimiento según la invención como sistema tampón para la elución de las proteínas ligadas en el intercambiador de cationes se emplea una solución tampón que se compone de sustancias tampón, especialmente de glicina, un tampón fosfato o citrato y una sal.

El tampón de elución puede tener un pH en el rango entre 4,5 y 8,5, preferentemente $\geq 7,1$ y $\leq 8,5$.

- 10 El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo como un procedimiento por lotes o como una cromatografía en columna.

Parámetros óptimos para la realización del procedimiento según la invención, tales como la concentración de sal, el pH y la temperatura, sin embargo, dependen en cada caso del material utilizado para el intercambiador de cationes. Así, el técnico especialista posee los conocimientos generales para optimizar las condiciones descritas en el marco de la presente invención, con el fin de llevar a cabo el procedimiento con el tipo de intercambiador de cationes más adecuado en cada momento.

15

En particular, con el procedimiento según la invención se obtiene y se enriquece un complejo factor VIII/vWF que contiene especialmente multímeros de vWF de alto peso molecular.

La fracción de complejo factor VIII/vWF obtenida está esencialmente libre de multímeros de vWF de bajo peso molecular, de fragmentos de vWF con una actividad específica reducida y de ácidos nucleicos contaminantes.

- 20 Como material de partida para la obtención del complejo purificado factor VIII/vWF con el procedimiento según la invención se puede utilizar cualquier solución que contenga el complejo del factor VIII. En particular, los materiales de partida son sustancias biológicas tales como plasma, fracciones plasmáticas, crioprecipitados o sobrenadantes o extractos de un cultivo celular recombinante.

- 25 Sin embargo, las soluciones que contienen el complejo factor VIII/vWF pueden ser también soluciones proteicas enriquecidas previamente purificadas o enriquecidas en una etapa anterior, por ejemplo mediante filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad o combinaciones de tales métodos.

Según un tipo de realización especial del procedimiento de la invención, como solución de partida se utiliza una fracción que contiene un complejo factor VIII/vWF enriquecida mediante intercambio aniónico. Entonces, en la subsiguiente cromatografía de intercambio catiónico se produce la purificación y separación del complejo factor VIII/vWF que contiene multímeros de vWF de alto peso molecular o de bajo peso molecular. Sin embargo, también son posibles otras combinaciones, por ejemplo cromatografía de afinidad / intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico / de afinidad / de intercambio catiónico, para conseguir el enriquecimiento y obtener selectivamente un factor VIII/vWF con una mayor actividad específica y estabilidad.

30

Con el procedimiento según la invención arriba descrito se enriquece múltiples veces el factor VIII/vWF con una mejor actividad específica a partir de una sustancia que contiene un factor VIII/vWF impuro.

35

Debido a que, en principio, todas las sustancias biológicas pueden estar contaminadas con gérmenes infecciosos, para la producción de un preparado seguro en cuanto a virus, la fracción obtenida que contiene el factor VIII/vWF se trata para desactivar o empobrecer en virus. Para este fin se pueden aplicar todos los procedimientos conocidos de la técnica actual, como son métodos químicos / físicos, desactivación por combinación con una sustancia fotoactiva y luz o empobrecimiento por filtración. Para la desactivación viral es especialmente adecuado el tratamiento térmico en solución o en estado sólido, que puede desactivar de modo fiable los virus con o sin envoltura lipídica. Preferentemente, el empobrecimiento viral se realiza por filtración a través de nanofiltros.

40

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un complejo purificado factor VIII/vWF que especialmente contiene multímeros de vWF de alto peso molecular, obtenido a partir de una solución que contiene factor VIII/vWF mediante una cromatografía de intercambio catiónico según la invención. El factor VIII/vWF con una mayor actividad de vWF específica, de como mínimo 66 U/mg de proteína, y una mayor actividad específica del factor VIII de como mínimo 500 U/mg de proteína se enriquece a partir de una sustancia inicial que contiene, entre otros, un factor VIII/vWF de baja pureza y baja actividad específica, y se separan selectivamente las proteínas accidentales, en particular las no ligadas o ligadas débilmente y, por tanto, el factor VIII libre o el complejo de factor VIII con una actividad vWF reducida. Con ello se obtiene un complejo factor VIII/vWF que contiene multímeros de vWF de alto peso molecular y está esencialmente libre de complejo de factor VIII con multímeros de vWF de bajo peso molecular, de productos de descomposición de vWF, de factor VIII que no forma complejo y, posiblemente, de factor VIIIa. El complejo factor VIII/vWF según la invención tiene, debido al enriquecimiento selectivo de multímeros vWF de alto peso molecular, una mayor actividad de aglutinación plaquetaria y una mayor estabilidad.

45

50

Según otro aspecto, se proporciona un preparado purificado que contiene el complejo factor VIII/vWF conteniendo en particular multímeros de vWF de alto peso molecular, o el factor VIII:C esencialmente libre de actividad vWF aglutinante plaquetario, que se obtienen mediante el procedimiento según la invención.

- 5 Durante la obtención y producción del preparado según la invención con un material inicial de origen plasmático o recombinante, según se ha descrito anteriormente, eventualmente se lleva a cabo un empobrecimiento/o un procedimiento de desactivación viral para la eliminación de partículas infecciosas, pudiendo realizarse la desactivación viral y/o el empobrecimiento viral, en principio, antes o después de cada paso de purificación, partiendo del material inicial hasta el preparado farmacéutico obtenido. Por tanto, el preparado según la invención en cualquier caso es seguro contra virus y está libre de sustancias infecciosas.
- 10 Otro criterio para deducir la pureza y la menor capacidad de infección de un producto es también la ausencia de ácidos nucleicos contaminantes. El preparado según la invención, por tanto, está esencialmente libre de ácidos nucleicos. "Esencialmente" significa aquí que el contenido de ácidos nucleicos es $\leq 0,7$ referido a la relación 260/280 nm. Sin embargo, el ácido nucleico también puede cuantificarse de acuerdo con un procedimiento tal como el descrito, por ejemplo, en las EP 0 714 987 y EP 0 714 988.
- 15 Según otro aspecto, el preparado según la invención se encuentra en una forma estable frente al almacenamiento. El preparado que contiene el factor VII/vWF purificado con una mayor actividad de vWF específica puede proporcionarse como solución final, como liofilizado o en estado congelado. El preparado es especialmente estable gracias a su pureza. Se ha observado que el preparado según la invención es estable a -20°C durante como mínimo 6 meses, a 4°C en solución durante como mínimo 4 semanas y como liofilizado durante como mínimo 1 año. Se ha demostrado que, dentro
- 20 del correspondiente período, la actividad del factor VIII/vWF se reduce como máximo en un 10% y que el patrón multímero de los multímeros de vWF no presenta ninguna alteración esencial.

- La formulación del preparado según la invención puede realizarse del modo ya conocido y usual. El factor VIII/vWF purificado incluido en el preparado según la invención se mezcla con una sustancia tampón que contiene sales tales como NaCl, dihidrato de citrato de trisodio y/o CaCl_2 , y aminoácidos como glicina y lisina, a un pH en el rango de 6 a 8 y se formula como preparado farmacéutico.
- 25

El preparado puede utilizarse para la producción de un medicamento para el tratamiento de pacientes con hemofilia, hemofilia fenotípica y vWD.

- Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un preparado del complejo factor VIII/vWF a partir de plasma o de una fracción plasmática caracterizado porque se pone en contacto el plasma o una fracción plasmática con un intercambiador de cationes, produciéndose la adsorción del complejo factor VIII/vWF, eventualmente se lava el intercambiador catiónico cargado con el complejo factor VIII/vWF, a continuación se eluye el complejo factor VIII/vWF, obteniéndose un producto de elución con una pureza como mínimo 300 veces mayor en comparación con el complejo factor VIII/vWF y con un rendimiento mínimo para el complejo factor VIII/vWF del 50% frente al plasma, y porque finalmente se convierte el producto de elución obtenido en un preparado de complejo factor VIII/vWF.
- 30
- 35

Sorprendentemente se ha descubierto dentro del marco de la presente invención que el complejo factor VIII/vWF se puede proporcionar con una gran pureza y al mismo tiempo con un alto rendimiento mediante una cromatografía de intercambio de cationes partiendo de plasma o de fracciones plasmáticas.

- Como fracción plasmática se utiliza, por ejemplo, un crioprecipitado, eventualmente, después de pretratamiento de adsorción para eliminar el complejo de protrombina o fracciones Cohn.
- 40

- El procedimiento es especialmente apropiado para la purificación del complejo de factor VIII a partir de una fracción plasmática a escala industrial, puesto que, debido a la purificación efectiva, ya no es necesario un sinnúmero de otros pasos de purificación, por ejemplo cromatográfica. Sorprendentemente, se ha observado que se puede obtener el complejo de factor VIII por simple cromatografía de intercambio catiónico con una pureza como mínimo 300 veces mayor frente al plasma, preferentemente con una pureza como mínimo 400 veces mayor, al mismo tiempo que con un alto rendimiento de al menos un 50%, preferentemente de al menos un 60% referido al plasma. Por tanto, es preferente configurar el procedimiento de purificación de modo que sólo se realice una única purificación cromatográfica, es decir la realizada en el intercambiador catiónico. Normalmente esta purificación cromatográfica se realiza como paso terminal de purificación antes de formular el complejo de factor VIII en un preparado farmacéutico.
- 45

- Habitualmente se aplica el material inicial sobre el intercambiador de cationes en una sustancia tampón que contiene calcio. Directamente antes de la aplicación, también conviene una medida de desactivación de posibles virus presentes, tales como virus patógenos humanos, que se pueden transmitir a través de la sangre. En este caso es preferente un tratamiento con un detergente antiviral o un detergente y/o disolvente orgánico. El tratamiento con Tritón o Tween en presencia de TMBP (tri(n-butil)-fosfato) se lleva a cabo, por ejemplo, según la EP 0 131 740. Mediante subsiguiente cromatografía de intercambio de cationes, se elimina efectivamente la sustancia antiviral. En el caso de que el complejo adsorbido sea lavado, preferentemente este lavado se realiza con un tampón de lavado cuya fuerza iónica sea superior a la de la sustancia tampón de adsorción, por ejemplo del 10 al 30% mayor. Preferentemente, para la elución del complejo de factor VIII/vWF se aumenta todavía más la fuerza iónica. La elución del complejo de factor VIII/vWF se
- 50
- 55

consigue por el aumento de la fuerza iónica, que preferentemente se incrementa en como mínimo un 50%, en especial en al menos 100% frente a la fuerza iónica de la solución inicial. Para la formulación de un preparado farmacéutico de complejo factor VIII/vWF, normalmente se diafiltra y esteriliza-filtra y, en caso dado, se liofiliza.

- 5 La actividad de factor VIII o vWF prácticamente no se ve afectada por la cromatografía de intercambio catiónico. Se ha demostrado un rendimiento garantizado de complejo de factor VIII de más del 90% referido a la actividad antes de la cromatografía. Por esta razón, incluso durante la purificación cromatográfica se puede renunciar a los estabilizadores de factor VIII usuales, por ejemplo antitrombina III y/o heparina.

- 10 Al contrario de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica actual, en los que la cromatografía de intercambio de cationes siempre se ha tenido en cuenta solamente para preparados ya purificados de complejo factor VIII/vWF (véase EP 0 600 480 A2), según la invención se demuestra que la cromatografía de intercambio catiónico es especialmente adecuada para la purificación directa del complejo factor VIII/vWF a partir de plasma o de una fracción (no refinada) de plasma. Con un procedimiento de este tipo ni siquiera es necesario prever otros procedimientos cromatográficos para la producción de un preparado de complejo factor VIII/vWF, puesto que la pureza conseguida con la cromatografía de intercambio catiónico partiendo de plasma o de fracciones plasmáticas ya cumple las exigencias impuestas para los preparados de complejo factor VIII/vWF comerciales.

Con ayuda de los siguientes ejemplos y las figuras se explica más en detalle la invención, no quedando, sin embargo, limitada a estos ejemplos de realización.

En las figuras:

- 20 Figura 1: Análisis multímero de vWF del complejo factor VIII/vWF de un crioprecipitado antes y después de purificación con el intercambiador de cationes.
- Figura 2: Análisis multímero de vWF del complejo factor VIII/vWF de un crioprecipitado antes y después de purificación mediante una cromatografía combinada aniónica/catiónica.

- 25 El Ejemplo 1 describe la purificación de un complejo plasmático de factor VIII/vWF mediante cromatografía de intercambio catiónico y elución gradual; el Ejemplo 2 describe la purificación del complejo factor VIII/vWF mediante la combinación de una cromatografía de intercambio aniónico y catiónico y elución gradual del intercambiador de cationes; el Ejemplo 3 describe la purificación del complejo rVWF/rfactor VIII por medio de un intercambiador de cationes; el Ejemplo 4 describe el aislamiento del complejo factor VIII/vWF a través de un intercambio de cationes.

Ejemplo 1: Purificación de un complejo plasmático de FVIII mediante cromatografía de intercambio catiónico

- 30 En un tampón sodio-acetato, pH 7, se disolvió un crioprecipitado de plasma humano y se añadieron 20 unidades de heparina por ml de solución. Por cada gramo de crioprecipitado se añadieron 0,25 ml de una suspensión de $\text{Al}(\text{OH})_3$ al 2% y se incubó durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm para obtener un crioprecipitado sin turbiedad.

- 35 Se llenó una columna cromatográfica con Fractogel® EMD-SO3 y se lavó con una sustancia tampón (30 mM tampón glicina-NaCl). A continuación se filtró el crioprecipitado disuelto a través de la columna de intercambio catiónico y, durante el paso de la corriente, se obtuvieron las proteínas que no se unen al intercambiador (fracción 1). Las proteínas ligadas de modo no específico se eliminaron mediante el lavado de la columna con NaCl 0,3 M de NaCl en el tampón (fracción 2). A continuación, se eluyó el complejo FVIII/vWF en la columna de intercambio mediante elución con NaCl 0,4M ó 0,5M (fracción 3 o fracción 4).

- 40 En la Tabla 1 se puede observar que tanto el vWF como también el FVIII son ligados por el intercambiador catiónico. Mediante el lavado de la columna de intercambio catiónico con NaCl 0,3M (fracción 2) no se obtuvo ningún vWF y solamente un 10 % de la actividad de FVIII. Con este paso de elución se separó el FVIII que no estaba acomplejado en vWF funcionalmente activo. Por desorción subsiguiente con NaCl 0,4M (fracción 4) se obtuvo un complejo FVIII/vWF que contenía aproximadamente un 20% de vWF funcionalmente activo y aproximadamente un 30% de la cantidad total de FVIII. El complejo de FVIII restante se eluyó a continuación con NaCl 500mM en el intercambiador de cationes (fracción 4). La fracción 4 contenía el complejo factor VIII/vWF con un 80% de actividad de vWF y un 50% de actividad de FVIII partiendo del crioprecipitado. Mediante la cromatografía de intercambio catiónico se consiguió una purificación de FVIII (actividad específica: 12 IU FVIII:C/mg proteína) veinte veces mayor que la del crioprecipitado o una purificación de FVIII igual a 350 veces la del plasma (fracción 4). De la fracción 3 se pudo obtener FVIII.

- 50 La Figura 1 muestra el análisis multímero de vWF del complejo factor VIII/vWF antes y después de la purificación en el intercambiador de cationes, representando la marca A el patrón multímero vWF del crioprecipitado, la marca B el producto de elución de NaCl 300mM (fracción 2, Tabla 1), la marca C el producto de elución de NaCl 400mM (fracción 3, Tabla 1) y la marca D el producto de elución de 500 mM (fracción 4, Tabla 1). En la Figura 1 se puede observar que, mediante la cromatografía de intercambio catiónico, se obtiene un complejo factor VIII/vWF con una estructura multímera de vWF de alto peso molecular. El complejo factor VIII/vWF que contiene multímeros de vWF de bajo peso

molecular no queda ligado al intercambiador catiónico (fracción 1) o se separa durante la elución con NaCl 0,3M (fracción 2).

Tabla 1

Purificación del complejo FVIII/vWF a partir de un crioprecipitado por cromatografía de intercambio catiónico

Muestra	Actividad vWF: Risto-CoF (U/ml)	Actividad FVIII:C (U/ml)
crioprecipitado	2,2	2,4
fracción 1 (sin ligar)	0	0
fracción 2 (eluato NaCl 300mM)	0	0,1
fracción 3 (eluato NaCl 400mM)	1,8	3,6
fracción 4 (eluato NaCl 500mM)	1,8	1,5

5

Ejemplo 2: Purificación de un complejo plasmático FVIII/vWF mediante la combinación de una cromatografía de intercambio de aniones / de intercambio de cationes

En un tampón Tris 7mM, Na-acetato 100 mM, lisina 100 mM, NaCl 120mM, pH 6,7, se disolvió un crioprecipitado de plasma humano. Para el pretratamiento se añadió agitando $\text{Al}(\text{OH})_3$. A continuación se separó el precipitado mediante centrifugado.

10

El crioprecipitado así pretratado se aplicó sobre una columna de Fractogel® EMD-TMAE. Las proteínas no ligadas se obtuvieron por lavado de la columna con una solución tampón (fracción 1). Esta fracción 1 tenía un 50% de la actividad de vWF, pero solamente un 10% de la actividad de FVIII. Mediante la elución de la columna con NaCl 400mM (fracción 2), a continuación se obtuvo el complejo FVIII/vWF. La fracción 2 tenía la actividad vWF restante y un 70% de la actividad FVIII partiendo del crioprecipitado.

15

Tabla 2 Purificación de un complejo FVIII-vWF por combinación de cromatografía de intercambio de aniones y de cationes

Muestra	actividad vWF: RistoCoF (U/ml)	Actividad FVIII:C (U/ml)
crioprecipitado	12,5	12,2
fracción 1 (sin ligar)	3,5	0,7
fracción 2 (eluato NaCl 400 mM)	2,5	14,5

El complejo FVIII/vWF de la fracción 2 se diluyó cuatro veces con 20 mM glicina/tampón NaCl y a continuación se aplicó Fractogel® EMD-SO3 sobre una columna de intercambio de cationes. Las proteínas no ligadas se obtuvieron en la fracción 1. Las proteínas débilmente ligadas se eliminaron por lavado de la columna con NaCl 200 mM (fracción 2). A continuación, se realizó la elución con NaCl 400mM (fracción 2) y NaCl 500mM (fracción 4). En las fracciones 3 y 4 se encontró un 45% de la actividad vWF y un 55% ó 40% de las actividades de FVIII respectivamente.

20

Tabla 3 Purificación de un complejo FVIII/vWF por combinación de una cromatografía de intercambio de aniones y cationes

25

Muestra	actividad vWF:Risto CoF (U/ml)	actividad FVIII:C (U/ml)
Inicio	0,63	3,6
fracción 1 (no ligada)	0	0
fracción 2 (eluato NaCl 200mM)	0	0

fracción 3 (eluato NaCl 400mM)	0,3	2,26
fracción 4 (eluato NaCl 500mM)	0,25	1,43

En la Tabla 3 se puede observar que tanto el vWF como también el FVIII quedan ligados por el intercambiador de cationes. Al lavado de la columna de intercambio catiónico con NaCl 0,2M (fracción 2) no se encontró ningún vWF ni ningún FVIII activo. A continuación se realizó la elución del complejo FVIII/vWF obteniéndose las fracciones 3 y 4.

- 5 Mientras que la actividad específica del FVIII:C en el crioprecipitado era de 0,59 U/mg de proteína, la actividad específica del FVIII:C en las fracciones 3 y 4 era de 500 U/mg de proteína ó 477 U/mg de proteína. La actividad específica de vWF aumentó, partiendo del crioprecipitado, de 0,6 U/mg de proteína a 66 U/mg de proteína y 83 U/mg de proteína en las fracciones 3 y 4.

- 10 La Figura 2 muestra el análisis multímero de vWF del complejo factor VIII/vWF antes y después de la purificación con cromatografía combinada de intercambio de aniones y cationes, mostrando las marcas a - c la cromatografía en el intercambiador aniónico y las marcas d - g en el intercambiador catiónico. En la Figura 2, la marca a muestra el patrón multímero de vWF del crioprecipitado, la marca b el paso (fracción 1, Tabla 2), la marca c el producto de elución de NaCl 400mM (fracción 2, Tabla 2), la marca d el producto de elución de NaCl 400mM (fracción 2, Tabla 2) antes del intercambio de cationes, la marca e el producto de elución de NaCl 200mM (fracción 2, Tabla 3), la marca f el producto de elución de NaCl 400mM (fracción 3, Tabla 3) y la marca g el producto de elución de NaCl 500mM (fracción 4, Tabla 3).

Ejemplo 3: Purificación de un complejo r-vWF/r-FVIII por medio de cromatografía de intercambio de cationes (actualmente, según la opinión del depositante, la mejor forma para la realización de la invención)

- 20 Sobre una columna se aplicaron 1.000 ml de un sobrenadante de un cultivo celular con contenido en complejo de rFVIII/rvWF recombinante, columna llena con 20 ml de Fractogel® TSK-SO3. Después de lavar la columna con una solución tampón, pH 7,4, con NaCl 250mM, se llevó a cabo la elución del complejo ligado rFVIII/rvWF con una solución tampón, pH 7,4, NaCl 600mM. En la Tabla 4 se presentan los resultados de este paso por la columna.

25 **Tabla 4 Purificación de un complejo recombinante de rFVIII/rvWF mediante cromatografía de intercambio de cationes**

Muestra	actividad de FVIII:C (U/ml)	actividad de vWF: RistoCoF (U/ml)
Inicial	2,3	0,1
Paso de corriente	0,1	0
Eluato NaCl 250mM	0,2	0
Eluato NaCl 600mM	85	4,4

El ejemplo muestra que un complejo que se compone de FVIII recombinante y vWF recombinante (que se produce normalmente durante la fermentación de FVIII recombinante) liga en un intercambiador de cationes y se puede eluir selectivamente separado de proteínas accidentales mediante el aumento de la concentración de sal.

- 30 En el ejemplo se obtuvo un complejo de rFVIII/rvWF con una actividad específica de FVIII de 130 U/mg de proteína con un rendimiento del 75%. Esto corresponde a un factor de purificación de 28 para este paso. La actividad específica de r-vWF depende en gran medida de la calidad del r-vWF expresado. En este caso era de 7 U/mg en el eluato, lo que corresponde a un factor de purificación de 35.

- 35 Mediante la variación de la relación rFVIII/rvWF al inicio, o por otro paso consecutivo de cromatografía, se puede mejorar todavía más la actividad específica de FVIII:C.

Ejemplo 4: Aislamiento del complejo FVIII/vWF a través de intercambio de cationes

Ejemplo 4A:

- 40 Se disolvieron 210 g de crioprecipitado en 950 ml de un tampón CaCl₂ -citratato con contenido en heparina y se ajustaron a pH 6,0. Se separaron las partes insolubles, principalmente fibrógeno. Para la desactivación de virus patógenos eventualmente presentes se trató la solución transparente con TritonX100 1% y TNBP ((tri(n-butil)fosfato) 0,3%. Para la adsorción de FVIII desactivado de virus, que se equilibró previamente a pH 6,0 en una solución de NaCl amortiguada

con acetato con una conductividad de 10 mS/cm, se utilizaron 100 ml de Fractogel EMD-SO₃⁻ - 650 (M) de la firma Merck, Darmstadt (DE). El FVIII se separó del gel por elución mediante el aumento de la fuerza iónica a 500 mM NaCl; previamente se realizó un lavado con 500 ml de una disolución de NaCl 150mM.

Ejemplo 4B:

- 5 En lugar de Fractogel EMD-SO₃ se utilizó en este ejemplo Toyopearl Sp-550C.

Resultados:

	rendimiento/plasma		grado de pureza frente al plasma
	FVIIIc	FvWF	
Ejemplo 4A	62%	68%	450 X
Ejemplo 4B	56%	62%	370 X

FVIIIc y FvWF se obtuvieron en la misma fracción.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un complejo factor VIII/vWF caracterizado porque se obtiene el complejo factor VIII/vWF a partir de una solución proteica ligado a un intercambiador de cationes y, por el aumento gradual de la concentración de sal, un complejo de factor VIII/vWF que contiene en particular multímeros vWF de alto peso molecular, no siendo el intercambiador de cationes heparina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el complejo factor VIII/vWF queda ligado en un intercambiador de cationes con una concentración de sal desde 50mM a 250mM, y se eluye y obtiene el complejo factor VIII/vWF con multímeros vWF de bajo peso molecular y factor VIII:C libre de actividad vWF de aglutinante plaquetario con una concentración de sal entre ≥ 250 mM y ≤ 300 mM.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el complejo factor VIII/vWF, que contiene en particular multímeros de vWF de alto peso molecular, se obtiene por fraccionamiento gradual con una concentración de sal de ≥ 350 mM.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se obtiene una fracción que contiene un complejo factor VIII/vWF, fracción que está especialmente libre de multímeros de vWF de bajo peso molecular, de productos de descomposición de vWF, de factor VIII sin formar complejo o débilmente ligado con vWF y de ácidos nucleicos contaminantes.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la elución de los polipéptidos del intercambiador de cationes se realiza en un sistema tampón a un pH en el rango entre 4,5 y 8,5, preferentemente $\geq 7,1$ y $\leq 8,5$.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el intercambiador de cationes es un vehículo conjugado con grupos sulfopropilo o carboximetilo.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se obtiene un complejo factor VIII/vWF que contiene, en particular, multímeros de vWF de alto peso molecular.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque el complejo factor VIII/vWF se obtiene a partir de plasma, de una fracción de plasma, de un crioprecipitado, de un sobrenadante libre de células o del extracto de un cultivo celular recombinante o de una fracción proteica enriquecida.
9. Complejo factor VIII/vWF que contiene especialmente multímeros de vWF de alto peso molecular que se obtiene a partir de una solución que contiene factor VIII/vWF mediante cromatografía de intercambio catiónico de acuerdo con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, teniendo el complejo una actividad específica de vWF mínima de 66 U/mg de proteína y una actividad específica de factor VIII mínima de 500 U/mg de proteína.
10. Complejo factor VIII/vWF según la reivindicación 9, caracterizado porque está especialmente libre de multímeros de vWF de bajo peso molecular, de productos inactivos de descomposición de vWF, de factor VIII sin formar complejo y de actividad de factor VIIIa.
11. Preparado que contiene el complejo factor VIII/vWF según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque está garantizado contra virus y está libre de sustancias infecciosas.
12. Preparado según la reivindicación 11, caracterizado porque se presenta en una forma estable al almacenamiento.
13. Preparado según una de las reivindicaciones 11 ó 12, caracterizado porque se formula como un preparado farmacéutico.
14. Utilización de un preparado según una de las reivindicaciones 11 a 13 para la producción de un medicamento para el tratamiento de pacientes con hemofilia A, hemofilia fenotípica y vWD.



FIG. 1

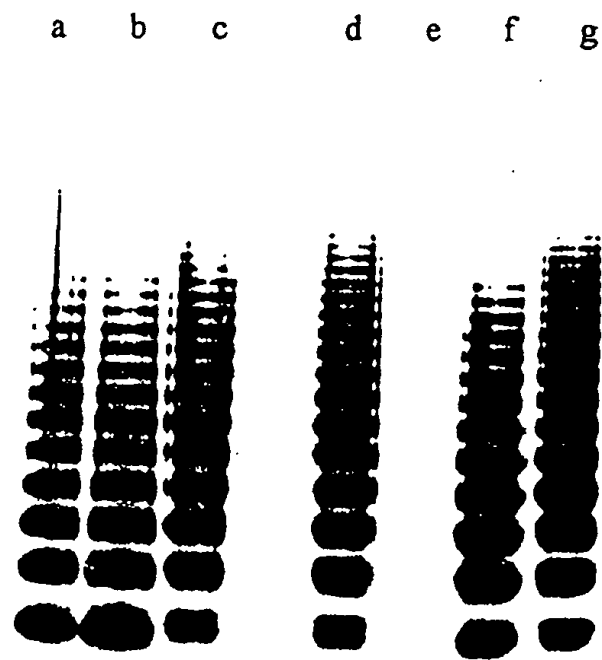


FIG. 2