



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901519768
Data Deposito	07/05/2007
Data Pubblicazione	07/11/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Titolo

PROCESSO CROMATOGRAFICO PER L'OTTENIMENTO DI UN COMPLESSO FVIII/VWF CON DIFFERENTI RAPPORTI TRA LE DUE PROTEINE DA UTILIZZARE NELLA TERAPIA DELLA EMOFILIA A E NELLA MALATTIA DI VON WILLEBRAND.

recettori specifici della superficie dei trombociti (gplb, gpIb/IIIa) ed i componenti dell'endotelio.

Anche le alterazioni nei livelli di vWF possono determinare gravi anomalie dell'emostasi.

La patologia di von Willebrand (vWD) è una malattia ereditaria autosomica del sangue, determinata principalmente dalla carenza o da un'anormale composizione multimerica del vWF. Tale difetto si riflette sulle principali funzioni svolte dal vWF: l'adesione piastrinica all'endotelio danneggiato risulta meno efficiente e quindi si ha un aumento del tempo di emorragia. Inoltre, mancando l'azione protettiva del vWF sul FVIII, si ha riduzione dell'emivita plasmatica di quest'ultimo, con manifestazioni sintomatiche simili o più gravi rispetto a quelle dell'emofilia A. L'incidenza della vWD nella popolazione mondiale è almeno 0,8%, senza tenere conto delle differenze tra razze o di distribuzione geografica.

Nella patologia di von Willebrand lo scopo principale del trattamento è la correzione del tempo di emorragia e della carenza di FVIII. Il farmaco di elezione è la desmopressina (DDAVP), molecola sintetica. Ma ci sono pazienti che non rispondono al trattamento con desmopressina o presentano controindicazioni al suo impiego; in questi casi normalmente si ricorre alla terapia di sostituzione con concentrati di FVIII/vWF.

I concentrati FVIII/vWF sono molto importanti sia per il trattamento dell'emofilia A che per quello della patologia di von Willebrand. Un concentrato di vWF da solo non riesce a riportare nella prima fase del sanguinamento il contenuto di FVIII a livelli normali, ed in alcuni casi può addirittura causare una trombosi. Per poter essere utilizzato anche per la

patologia di von Willebrand un concentrato in FVIII/vWF deve però possedere un vWF con pattern multimerico simile a quello plasmatico. (Haemostasis 1994; 24: 285-288).

Le diverse metodiche di preparazione del complesso FVIII/vWF messe a punto fino ad ora erano finalizzate esclusivamente ad una miglior purificazione del FVIII, ed i concentrati ottenuti hanno quindi sempre un ben determinato e definitivo rapporto tra le due proteine.

Questo è vero per il brevetto US 5252709 che descrive un metodo di separazione del FVIII, vWF e fibrinogeno mediante cromatografia a scambio anionico (Fractogel DEAE TSK 650M) . In questo caso si ottiene un prodotto con una buona resa ma solo con un rapporto FVIII/vWF uguale a 3

Anche nel brevetto US 6228613 dove è descritta una purificazione di un complesso FVIII/vWF stabile il rapporto FVIII/vWF rimane all'incirca 2.

Nel brevetto US 5679776 il complesso FVIII/vWF viene purificato per mezzo di una resina a scambio anionico, ottenendo un prodotto con un rapporto FVIII/vWF uguale a 1.

Per impedire una perdita di attività biologica nel tempo del complesso del FVIII/vWF, come avviene nel passaggio di inattivazione virale, vengono spesso aggiunti stabilizzanti (es. albumina).

L'aggiunta di stabilizzanti si ritrova in molti brevetti: l'EP 0468181 descrive un metodo di purificazione del FVIII dal plasma umano con una cromatografia a scambio ionico eluendo il FVIII con un'alta forza ionica e un pH acido e raccogliendo l'eluato in presenza di uno stabilizzante come eparina, albumina e PEG e lisina o istidina come antiproteasi.

Naturalmente in questo caso l'aggiunta di albumina causa una diminuzione dell'attività specifica da 300 – 1200 U/mg di proteina a 18-24 U/mg di proteina.

Nel brevetto US 4361509 è descritta una purificazione del FVIII mediante anticorpi monoclonali che legano il complesso vWF/FVIII e dissociazione del FVIII dal vWF con CaCl_2 . Il FVIII ottenuto, privo di vWF, però non è stabile se non dopo l'aggiunta di albumina.

Nel brevetto EP 0600480 un complesso FVIII/vWF viene purificato per mezzo di una cromatografia a scambio anionico, ma anche in questo caso è necessaria l'aggiunta di eparina ed albumina per stabilizzare il prodotto.

E' molto importante anche la purezza del complesso FVIII/vWF, infatti diminuendo quanto è possibile il contenuto di proteine inquinanti, quali fibrinogeno, fibronectina e IgG, è meno frequente l'insorgenza di reazioni allergiche o anticorpali contro il prodotto stesso. Alcune preparazioni ottenute per cromatografia di affinità (EP 90308104), presentano una bassa attività specifica di FVIII (66 U/mg).

Con la presente invenzione è stato messo a punto un metodo con alta resa ed efficienza, facilmente scalabile a livello industriale, che permette di ottenere un concentrato di FVIII, nel quale è possibile modulare il contenuto di vWF, utilizzando un unico sistema cromatografico e modificando solo la forza ionica e la composizione dei tamponi utilizzati per la cromatografia.

Sommario dell'invenzione

L'oggetto della presente invenzione è quello di fornire un metodo di purificazione del complesso FVIII/vWF il cui contenuto in vWF può essere

facilmente modulato variando opportunamente alcuni parametri del processo cromatografico.

Con questo metodo cromatografico si possono ottenere diversi complessi FVIII/vWF per un utilizzo in differenti patologie.

Ad esempio nell'emofilia A è normalmente necessario un concentrato di FVIII in cui il contenuto di vWF è il minimo indispensabile per rendere stabile la molecola (es. FVIII:vWF =1,25). Aumentando il contenuto di vWF nel sovracitato complesso (es. FVIII:vWF =1) è possibile usare il prodotto sia per l'emofilia A che per la patologia di von Willebrand di tipo 3. Infatti in questo caso un prodotto senza FVIII potrebbe non essere sufficiente a ristabilire i livelli di FVIII iniziali.

Concentrazioni di vWF circa 1.5 volte maggiori rispetto al FVIII potrebbero essere invece ottimali per le varie tipologie della patologia vWD.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione permette di ottenere un concentrato di FVIII, per mezzo di un metodo ad alta resa ed efficienza, facilmente scalabile a livello industriale, nel quale è possibile modulare la concentrazione di vWF, utilizzando un unico sistema cromatografico e modificando solo alcuni dei parametri dei tamponi utilizzati per la cromatografia.

La separazione cromatografica è eseguita su un supporto sintetico, idrofilo a cui sono attaccate lunghe catene di polimeri (struttura tentacolare) alla cui estremità sono presenti gruppi carichi positivamente (TMAE – trimetilammonioetil) adatti per uno scambio anionico forte; un esempio di resina di questo genere è conosciuta come Fractogel EMD TMAE.

L'uso di queste resine permette di legare facilmente ai gruppi carichi disposti all'estremità della lunga catena polimerica, anche proteine ad alto peso molecolare (>300 KDa) o proteine adesive come il vWF diminuendo le interazioni con la matrice che potrebbero determinare un ridotto recupero della proteina e /o un' inattivazione della stessa.

In accordo con la presente invenzione la frazione biologica che contiene il FVIII da purificare per cromatografia può essere ottenuta: da plasma umano, da crioprecipitato o da frazione del plasma ottenuta da un trattamento di pre-purificazione, come ad esempio assorbimento su idrossido di alluminio.

Secondo la presente invenzione una colonna cromatografica contenente una resina del tipo suddetto viene equilibrata con un tampone a scelta tra citrato, fosfato e tris, avente pH compreso tra 6.8 e 7.4, preferibilmente 7.0 e contenente NaCl ad una concentrazione tra lo 0.10 M e 0.15 M, preferibilmente 0.12 M, ed eventualmente comprendente altre sostanze quali glicina, cloruro di calcio.

La colonna, equilibrata con il suddetto tampone, viene caricata con la frazione biologica contenente il FVIII da purificare.

Il FVIII e il vWF si legano preferenzialmente alla resina mentre le proteine contaminanti vengono in gran parte eluite.

Il primo step cromatografico consiste nel lavaggio della resina con il tampone di equilibratura sopra descritto, in modo da eliminare le proteine contaminanti in eccesso che non interagiscono con la resina.

In un secondo step cromatografico, si utilizza il tampone precedente aumentandone però la forza ionica (qui di seguito il tampone di

equilibrata così modificata è indicata come "tampone di lavaggio"), in modo da eluire le proteine contaminanti debolmente legate e parzialmente il vWF.

Infine nel terzo step il complesso FVIII/vWF è eluito utilizzando lo stesso tampone aumentandone ulteriormente la conducibilità (questo tampone è indicato qui di seguito "tampone di eluizione"), per mezzo di NaCl o altro sale alla concentrazione compresa tra 0.4 e 1.0M, preferibilmente 0.45M.

Modulando opportunamente le proprietà chimico-fisiche del tampone di lavaggio nel secondo step cromatografico è possibile ottenere recuperi diversi di vWF nel complesso FVIII/vWF eluito nel terzo step.

La modulazione delle proprietà chimico-fisiche del tampone di lavaggio sopra indicato coinvolge essenzialmente tre fattori:

- la variazione della concentrazione molare di NaCl (o altro sale) nel tampone (da 0.2 a 0.27M);
- l'eventuale aggiunta nel tampone di lavaggio di CaCl_2 a varie concentrazioni (tra 5 a 10 mM)
- le quantità di tampone utilizzate per il lavaggio della resina (comprese normalmente fra 5 – 15 CV);

In particolare la molarità di NaCl durante il lavaggio suddetto è compresa tra 0.2 e 0.25 per ottenere, dopo eluizione successiva, un prodotto finale con rapporto FVIII/vWF compreso tra circa 0.68 a 2.47 (vedi tabella 1) .

Aumentando la forza ionica si favorisce l'eluizione di vWF durante il lavaggio e quindi si avrà una minore concentrazione di vWF del prodotto finito con un aumento del rapporto FVIII/vWF (R) come riportato in TABELLA 1.

Inoltre la presenza di ioni calcio in concentrazione opportuna nel tampone di lavaggio permette di ottenere un concentrato di FVIII/vWF con un R assai alto; l'utilizzo di CaCl_2 8mM nel tampone 0.25 M in NaCl permette di ottenere un rapporto FVIII : vWF circa 1 : 0.5, senza comportare una diminuzione significativa della resa di FVIII nel prodotto finito che rimane dell'ordine del 85-90%. (TABELLA 2).

Infine il recupero di FVIII è influenzato anche dal numero di letti di lavaggio della colonna (CV= column volume) col tampone di lavaggio.

Questo è particolarmente evidente nel caso in cui si utilizzi un tampone 0.25 M : il passaggio da 5 a 10 CV comporta un recupero percentuale di vWF nel prodotto finito dal 27.2% al 20.3% arrivando a un 16.9% con 15 CV (vedi TABELLA 3), portando il rapporto FVIII/vWF da un valore di 0.88 a 1.2 fino a 1.52.

Il metodo di purificazione della presente invenzione, oltre a permettere di modulare il contenuto di vWF, risulta altamente efficiente, riproducibile, scalabile a livello industriale e fornisce un complesso tra FVIII e vWF con alte rese. Il prodotto ottenuto ha un'alta attività specifica in FVIII, con basse concentrazioni dei principali contaminanti, quali fibrinogeno, fibronectina, IgG, IgM e il vWF presenta un pattern multimerico con buone percentuali di multimeri ad alto peso molecolare.

In particolare il presente processo cromatografico determina un arricchimento dei multimeri ad alto peso molecolare nel prodotto finito, diminuendo la concentrazione dei multimeri a basso peso molecolare nello step precedente all'eluizione del complesso FVIII/vWF. Per meglio chiarire l'invenzione vengono qui di seguito riportato alcuni esempi di

purificazione del complesso FVIII/vWF secondo il processo della presente invenzione.

ESEMPIO 1

PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO FVIII/vWF CON RAPPORTO CIRCA 0.7 PER MEZZO DI UNA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO

Dopo dissoluzione di 65 g di crioprecipitato in 10 volumi di H₂O alla soluzione è stato aggiunto idrossido di alluminio a pH 6.5 alla temperatura di 15°C. Dopo centrifugazione il surnatante (S1), è stato sottoposto ad uno step di inattivazione virale con l'aggiunta di solvente e detergente (Tween/TNBP) e successivamente è stato caricato sulla resina Fractogel EMD TMAE equilibrata con tampone citrato 10 mM a pH 7.0 e con una concentrazione di NaCl di 0.12 M.

Le proteine contaminanti sono state eliminate lavando con lo stesso tampone e successivamente trattando la resina con una tampone citrato 10 mM a pH 7.0 con 0.20 M di NaCl; infine il complesso FVIII /vWF è stato eluito con lo stesso tampone contenente una concentrazione di NaCl 0.45 M

L'attività del FVIII:C e vWF:Ag sono riassunti qui di seguito nella Tabella A.

Tabella A

Attività del FVIII:C ed vWF:Ag				
nelle diverse frazioni del processo cromatografico				
Campione	volume	FVIII:C	vWF:Ag	FVIII/vWF
	(ml)	(U/ml)	(U/ml)	
Surnatante	300	8.30	35.92	0.23

0.20 M	294	--	23.17	
0.45 M	90	27.64	40.65	0.68

ESEMPIO 2

PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO FVIII/vWF CON RAPPORTO 1.2 PER MEZZO DI UNA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO

Lo stesso surnatante (S1) come ottenuto nell'esempio 1 è stato caricato sulla resina Fractogel EMD TMAE equilibrata con un tampone citrato 10 mM a pH 7.0 contenente NaCl ad una concentrazione di 0.12 M.

Le proteine contaminanti sono state eliminate lavando la resina con lo stesso tampone e poi trattando la resina con circa 10 CV di tampone citrato 10 mM a pH 7.0 con 0.25 M di NaCl, mentre il complesso FVIII/vWF è stato eluito con lo stesso tampone, ma con una concentrazione di NaCl di 0.45 M

L'attività del FVIII:C e VWF:Ag sono riassunti nella seguente Tabella B.

Tabella B

Attività del FVIII:C ed vWF:Ag nelle diverse frazioni del processo cromatografico				
Campione	volume (ml)	FVIII:C (U/ml)	vWF:Ag (U/ml)	FVIII/vWF
Surnatante	290	7.36	38.74	0.19
0.25 M	288	0.69	33.17	0.02
0.45 M	90	20.88	17.40	1.20

ESEMPIO 3

PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO FVIII/vWF CON RAPPORTO DI CIRCA 1.5 PER MEZZO DI UNA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO

Il surnatante (S1) ottenuto come nell'esempio 1 è stato caricato sulla resina Fractogel EMD TMAE, equilibrata e lavata con un tampone citrato 10 mM a pH 7.0 con una concentrazione di NaCl 0.12 M.

Le proteine contaminanti sono state eliminate trattando la resina con circa 10 CV dello stesso tampone contenente 0.26 M NaCl, mentre il complesso FVIII /vWF è stato eluito per mezzo di una concentrazione di 0.45 M di NaCl

L'attività del FVIII:C e VWF:Ag sono riassunti nella seguente Tabella C.

Tabella C

Attività del FVIII:C ed vWF:Ag nelle diverse frazioni del processo cromatografico				
Campione	volume (ml)	FVIII:C (U/ml)	vWF:Ag (U/ml)	FVIII/vWF
Surnatante	286	8.19	34.16	0.24
0.26 M	210	2.28	40.64	0.06
0.45 M	96	19.29	12.86	1.50

ESEMPIO 4

PURIFICAZIONE DEL COMPLESSO FVIII/VWF CON RAPPORTO > 2.0 PER MEZZO DI UNA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO

Il surnatante (S1) ottenuto come nell'esempio 1 è stato caricato sulla resina Fractogel EMD TMAE, equilibrata e lavata con un tampone citrato 10 mM a pH 7.0 con una concentrazione di NaCl 0.12 M.

Le proteine contaminanti e la maggior parte del vWF sono state eliminate trattando la resina con circa 10 CV dello stesso tampone contenente 0.25

M NaCl + 8 mM CaCl₂, mentre il complesso FVIII /vWF è stato eluito per mezzo di una concentrazione di 0.45 M di NaCl

L'attività del FVIII:C e VWF:Ag sono riassunti nella tabella D.

Tabella D

Attività del FVIII:C ed vWF:Ag nelle diverse frazioni del processo cromatografico				
Campione	volume (ml)	FVIII:C (U/ml)	vWF:Ag (U/ml)	FVIII/vWF
Surnatante	288	7.21	36.05	0.2
0.25 M + 8 mM CaCl ₂	200	3.28	47.75	0.07
0.45 M	95	14.86	6.19	2.4

Tabella 1

Molarità di NaCl nel secondo step cromat.	Resa in FVIII (%)	Rapporto FVIII/vWF (R)
0.20	100	0.68
0.22	87.0	0.85
0.235	82.9	0.90
0.25	91.3	1.20
0.26	80.0	1.50
0.27	69.8	2.47

Tabella 2

0.25 M NaCl	FVIII:C : vWF:Ag	Yield (%)
1 mM CaCl ₂	1.25	91.0
5 mM CaCl ₂	1.43	89.5
8 mM CaCl ₂	2.00	83.6
10 mM CaCl ₂	2.08	71.0

TABELLA 3

Tampone 0,25

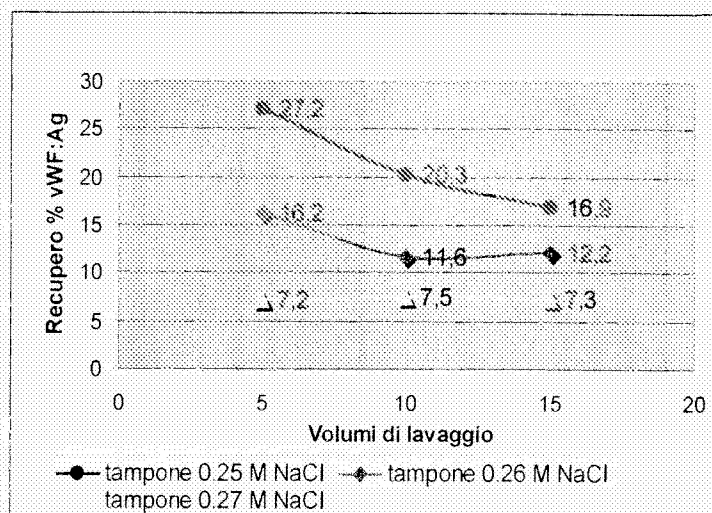
volumi di lavaggio	resa FVIII	recupero vWF	FVIII/vWF
5 letti	91,2	27,2	0,88
10 letti	91,3	20,3	1,20
15 letti	82,5	16,9	1,52

Tampone 0,26

volumi di lavaggio	resa FVIII	recupero vWF	FVIII/vWF
5 letti	78,4	16,2	1,30
10 letti	80	11,6	1,50
15 letti	78,3	12,2	1,50

Tampone 0,27

volumi di lavaggio	resa FVIII	recupero vWF	FVIII/vWF
5 letti	75	7,2	2,50
10 letti	69,8	7,5	2,47
15 letti	64	7,3	2,50



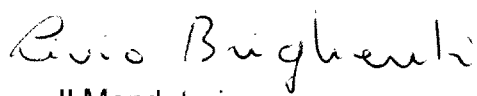
Rivendicazioni

1. Processo per preparare concentrati di FVIII/vWF a rapporto variabile da una frazione biologica per mezzo di una purificazione cromatografica in cui si utilizza una resina scambiatrice anionica a struttura tentacolare.
2. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui detta frazione biologica che contiene il FVIII e vWF da purificare è ottenuta: da plasma umano, da crioprecipitato o da frazione del plasma ottenuta da un trattamento di pre-purificazione.
3. Processo secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui detta resina è equilibrata con un tampone avente pH compreso tra 6.8 e 7.4, contenente NaCl ad una concentrazione tra lo 0.10 M e 0.15 M ed eventualmente comprendente glicina o cloruro di calcio e quindi caricata con la frazione biologica contenente il FVIII da purificare.
4. Processo secondo la rivendicazione 3 in cui la resina caricata con la frazione biologica contenente il FVIII da purificare è lavata con un tampone di lavaggio in cui la concentrazione molare di NaCl è compresa fra 0.2 a 0.27 M ed in cui è eventualmente presente CaCl_2 in concentrazioni compresa tra 5 a 10 mM.
5. Processo secondo le rivendicazioni 3 e 4 in cui si utilizzano fra 5 – 15 letti di lavaggio.
6. Processo secondo la rivendicazione 6 in cui il rapporto FVIII/vWF del prodotto finale è compreso tra 0.7 e 2.5 circa.
7. Processo secondo la rivendicazione 4 in cui il tampone contiene CaCl_2 8mM e 0.25 M in NaCl.

8. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il tampone di lavaggio ha pH 7.0 e NaCl 0.27 M ed il rapporto FVIII/vWF ottenuto è 2.47.
9. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il tampone di lavaggio ha pH 7.0 e NaCl 0.26 M ed il rapporto FVIII/vWF ottenuto è 1.50.
10. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il tampone di lavaggio ha pH 7.0 e NaCl 0.25 M ed il rapporto FVIII/vWF ottenuto è 1.20.
11. Processo secondo la rivendicazione 4 in cui il tampone di lavaggio ha pH 7.0, NaCl 0.25 M e si utilizzano 5 letti di lavaggio ed in cui il rapporto FVIII/vWF ottenuto è 0.88.
12. Processo secondo la rivendicazione 4 in cui il tampone di lavaggio ha pH 7.0 e NaCl 0.25 M e CaCl_2 8 mM ed il rapporto FVIII/vWF ottenuto è 2.40.

Firenze 7 Maggio 2007

p. KEDRION S.p.A.


Il Mandatario

Dr. Livio Brighenti della NOTARBARTOLO&GERVASI SpA