



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 734**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97921765 .0**

86 Fecha de presentación : **25.04.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0907724**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.1999**

54 Título: **Multimerasa purificada.**

30 Prioridad: **29.04.1996 AT 769/96**
29.04.1996 AT 770/96

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Baxter Aktiengesellschaft**
Industriestrasse 67
1221 Wien, AT

72 Inventor/es: **Furlan, Miha;**
Lämmle, Bernhard;
Schwarz, Hans-Peter;
Turecek, Peter y
Eibl, Johann

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Multimerasa purificada.

5 La invención se refiere a una preparación que contiene proteasa de factor von Willebrand, a un método para preparar la misma, así como a un método para preparar factor von Willebrand con estructura satélite.

10 El factor von Willebrand (vWF) es una glucoproteína que circula en el plasma en forma de una serie de multímeros cuyo tamaño oscila entre aproximadamente 500 y 20.000 kD. Las formas multiméricas del vWF se componen de subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El vWF actúa como mediador en la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared vascular dañada y sólo los multímeros grandes presentan además una actividad hemostática. Se supone que las células endoteliales segregan formas poliméricas grandes de vWF y que las formas de vWF que tienen un peso molecular bajo (vWF de bajo peso molecular, LMW) resultan de la escisión proteolítica.

15 Los multímeros con masas moleculares grandes se almacenan en los cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales y se liberan con la estimulación.

20 El vWF puede unirse al factor VIII de la coagulación sanguínea formando así el complejo de factor VIII o complejo de factor VIII:C/vWF, que contiene el factor VIII:C en forma de proteína estabilizada. Un déficit de vWF llevará necesariamente también a una reducción de la concentración de factor VIII:C en la sangre, debido a la falta de efecto estabilizador del vWF.

25 La degradación proteolítica del vWF es un proceso fisiológico en individuos sanos, pero en pacientes que padecen la enfermedad de von Willebrand (vWD) de tipo 2A puede estar acelerada y, como consecuencia, estos pacientes carecen de los multímeros de vWF de mayor masa molecular.

30 Una pequeña parte del vWF presente en el plasma normal circula en forma de fragmentos de 189, 176 y 140 kD, resultantes de la degradación proteolítica de vWF *in vivo*, derivándose el fragmento de 140 kD de la región N-terminal y el fragmento de 176 kD de la región C-terminal de la subunidad. Se aislaron formas LMW de vWF de plasma humano normal y se sometieron a SDS-PAGE después de una reducción de disulfuro. La proporción extraordinariamente grande de fragmentos de vWF es compatible con el punto de vista de que las formas LMW del vWF se derivan, parcial o principalmente, de multímeros grandes, por degradación proteolítica.

35 A la infusión de vasopresina 1-desamino-8-D-arginina en sujetos normales le siguió la aparición en el plasma de multímeros de gran masa molecular, los cuales se escindían posteriormente con rapidez por degradación proteolítica. Se observó también una falta de multímeros de vWF grandes y un nivel elevado de fragmentos proteolíticos en una enfermedad de von Willebrand (vWD) adquirida asociada con un síndrome mieloproliferativo, lo que indicaba también una elevada proteólisis *in vivo* bajo estas condiciones. En pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) se hallaron formas extraordinariamente grandes de vWF; estos multímeros de gran tamaño desaparecieron tras una trans-fusión con plasma fresco congelado normal. Es evidente que existen una o varias enzimas proteolíticas implicadas en la regulación fisiológica del tamaño polimérico del vWF en la sangre circulante y que también desempeñan un impor-tante papel en la patogénesis de anomalías del vWF en algunos pacientes con trastornos o hemostasias congénitos(as) o adquiridos(as); sin embargo, aún no se ha identificado la enzima proteolítica responsable de la proteólisis del vWF en plasma humano normal.

50 Se ha demostrado que algunas proteasas son capaces de escindir el vWF, mermando así a su afinidad de enlace con las plaquetas; sin embargo, el tratamiento del vWF con estas proteasas resultó en todos los casos en productos de escisión distintos de los fragmentos derivados de la escisión *in vivo*.

55 Así, por ejemplo, la plasmina puede escindir algunos enlaces peptídicos en el vWF, pero se mantiene una región central de alto peso molecular que conserva aproximadamente el 70% de la actividad de aglutinación plaquetaria (determinada como cofactor de ristocetina). En la fase inicial del tratamiento con plasmina se escindió un péptido de 34 kD de los N-terminos de las subunidades de vWF individuales. Un mapeo de los epítopes de fragmentos inducidos con plasmina mostró claramente que estos fragmentos tenían su origen en regiones de la subunidad de vWF que eran distintas de los fragmentos presentes en el plasma circulante.

60 Se ha comprobado que la elastasa pancreática porcina y diversas serina-proteasas liberadas por los leucocitos humanos degradan el vWF por proteólisis, lo que resulta en una pérdida de multímeros de gran tamaño. Un mapeo de los epítopes de los productos de degradación indicó de nuevo que estos fragmentos también eran distintos a los presentes en el plasma normal y en el vWD de tipo 2A. Además, los patrones de multímeros de vWF en muestras de plasma de pacientes con recuentos de neutrófilos sumamente altos o bajos no diferían notablemente de aquellos de plasma humano normal.

65 Además de las serina-proteasas anteriores, se comprobó que una proteasa semejante a la calpaína liberada por las plaquetas humanas degradaba los multímeros de vWF de gran tamaño.

Además, un análisis de los fragmentos de vWF circulantes indicó que el enlace peptídico entre los residuos de los aminoácidos 842Tyr y 843Met se escindía en la subunidad vWF de pacientes con vWD de tipo 2A; un sitio de escisión que indica una especificidad similar a la de la calpaína. Sin embargo, también se comprobó que las calpaínas de eritrocitos y riñón porcinos no podían generar los fragmentos de vWF producidos *in vivo*.

Es posible producir vWF recombinante (r-vWF) en células CHO, por ejemplo según FEBS Letter 375, 259-262 (1995). El r-vWF así recuperado está disponible en forma de vWF maduro y tiene una estructura de singlete, es decir que es distinto del vWF plasmático, que siempre tiene una estructura satélite característica cuando se examina en geles de SDS-agarosa al 2%.

En el documento WO 96/10584 se explica que el r-vWF comprende multímeros con una gran integridad estructural, que se conserva incluso tras la purificación y un tratamiento de inactivación viral. La estructura intacta del r-vWF es definida mediante un resultado de análisis electroforético consistente en bandas multiméricas con ausencia de bandas satélite.

En Kunicki y col. (Blood 65(2) (1985), 352-356) se describe la escisión de vWF mediante una proteasa neutra activada por calcio plaquetaria y dependiente de sulfhidrilo.

En Dent y col. (PNAS USA 87 (1990), 6306-6310) se describe un enlace sensible a la proteasa entre los residuos Tyr-842 y Met-843 del vWF, un sitio que refleja la especificidad de las proteasas neutras dependientes del calcio (calpaínas).

Así pues, para preparar una preparación de r-vWF con una estructura correspondiente a la del vWF plasmático partiendo de un r-vWF con estructura singlete es necesario un tratamiento con la actividad de una proteasa de vWF fisiológica.

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una actividad enzimática que pueda procesar el vWF por proteólisis de un modo fisiológico, y opcionalmente degradar el mismo y, respectivamente, proporcionar una preparación que presente una actividad enzimática de este tipo.

Dado que los síntomas patológicos debidos a actividades de degradación de vWF anormales o debidos a un nivel elevado de vWF con frecuencia pueden causar trombosis o trastornos tromboembólicos, otro objetivo de la presente invención es reajustar a los niveles normales mediante una preparación farmacéutica que presente una actividad enzimática de escisión de vWF fisiológica.

Según la invención, estos objetivos se logran mediante una proteína que presenta una actividad enzimática purificada según la presente especificación, se denomina "multimerasa" debido a su actividad proteolítica relativa a los multímeros de factor von Willebrand y tiene las siguientes propiedades:

- a) presenta una actividad proteolítica indirecta o directa y convierte el vWF con estructura singlete en vWF con estructura satélite,
- b) es activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa diisopropilfluorofosfato (DFP) o del inhibidor de calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂.

La propiedad a) puede determinarse mediante un sencillo ensayo, en el que un vWF recombinante que presenta estructura singlete se trata con la multimerasa, ensayo que se explica con mayor detalle en los ejemplos, siendo ésta una propiedad completamente nueva de las proteasas y, hasta ahora, única de las multimerasas según la invención. La estructura satélite, por ejemplo una estructura triplete, corresponde a un patrón de multímeros según un análisis electroforético de vWF plasmático caracterizado por bandas centrales y algunas bandas satélite (véanse las Figuras 12 y 13).

Los términos "directa" e "indirecta" indican que la multimerasa según la invención tiene una actividad proteolítica directa mediada sin un activador o que contribuye a una actividad proteolítica mejorada a través de un efecto activador apropiado o de un mediador.

Preferentemente, la multimerasa tiene una actividad proteolítica óptima a un pH que oscila entre 7 y 10, preferentemente a un pH de 7,5 a 8,5. Sin embargo, este rango de pH óptimo depende en gran parte del entorno (iónico) en el que se lleva a cabo la reacción.

La multimerasa se proporciona preferentemente como una fracción obtenida por filtración en gel de la fracción plasmática o sérica correspondiente al peso molecular superior a 200 kD, preferentemente de alrededor de 300 kD.

Preferentemente, tras una purificación según la invención, la multimerasa se proporciona como una forma enriquecida en un factor de como mínimo 1.000, preferentemente de como mínimo 10.000, en relación con el plasma.

ES 2 285 734 T3

La multimerasa purificada preferentemente tiene una actividad específica de como mínimo 10 U/mg de proteína en presencia de un inhibidor de serina-proteasa. Una unidad se define como la actividad enzimática contenida en un mililitro de plasma normal humano o que puede ser generada a partir del mismo.

5 Se ha comprobado que la multimerasa es particularmente activa en presencia de, o después de una incubación con, iones metálicos bivalentes, por ejemplo de iones alcalinotérreos, en particular de Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , y que su actividad puede aumentar aun más con una fuerza de cizallamiento, con una menor fuerza iónica o con agentes caotrópicos.

10 La actividad de la multimerasa es especialmente generada cuando la fuerza iónica del medio se reduce a un nivel inferior a la fuerza iónica fisiológica, en particular correspondiendo a una concentración menor que Tris 15 mM. Las fuerzas de cizallamiento que pueden actuar en la multimerasa o en su sustrato durante el flujo por un capilar, la agitación en depósitos o por el paso a través de una boquilla, en general a causa de una acción mecánica, contribuyen considerablemente a la actividad elevada de la multimerasa. Se supone que el efecto de las sustancias caotrópicas se debe al cambio parcial o completo de la estructura terciaria de una proteína. Entre estas sustancias se incluyen sales como sulfato de amonio, cloruro cálcico, tiocianatos, pero también urea y cloruro de guanidinio.

Preferentemente, la preparación de multimerasa según la invención tiene una actividad elevada en relación con el vWF modificado, por ejemplo vWF parcialmente desnaturalizado o vWF con un cambio en su conformación.

20 La multimerasa según la invención puede inhibirse no realizando o deteniendo la activación. Así, como inhibidores pueden utilizarse agentes quelantes, por ejemplo EDTA, EGTA y citratos que tengan un efecto inhibidor de la metaloenzima. Sin embargo, la actividad de la multimerasa también puede inhibirse mediante péptidos de vWF correspondientes a la secuencia peptídica Tyr842-Met843 que puedan bloquear el sitio de enlace de la multimerasa. 25 La disminución de la temperatura, por ejemplo congelando la fracción que contiene la multimerasa, también resulta en una reducción de la actividad de la multimerasa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para purificar la multimerasa según la invención a partir de plasma, de suero o a partir de una fracción de plasma o suero, mediante un procedimiento cromatográfico, recuperándose la multimerasa purificada de las fracciones en las que se halla la actividad proteolítica para la inactivación del vWF en presencia de un inhibidor de serina-proteasa, preferentemente aprotinina.

30 La invención también se refiere a una preparación que comprende una multimerasa enriquecida en un factor de 1.000, preferentemente de 10.000, en relación con el plasma.

35 La presente invención se refiere también a un método para producir vWF con estructura satélite incubando un vWF de estructura singlete con una multimerasa según la invención, con lo que se obtiene un vWF con estructura satélite y se recupera el vWF.

40 Preferentemente, el método se lleva a cabo en condiciones casi fisiológicas. Por ejemplo, la conversión del vWF se realiza a un pH que oscila entre 7 y 10, preferentemente entre 7,5 y 8,5, y a una temperatura de entre 20 y 40°C, con preferencia aproximadamente a temperatura ambiente, durante un tiempo suficiente para la formación de bandas satélite, sin que se afecte sustancialmente la actividad de vWF.

45 Para esta preparación del vWF de estructura satélite se utiliza preferentemente una multimerasa que, según se ha explicado más arriba, desarrolla una actividad óptima bajo ciertas condiciones, por ejemplo por preincubación con iones metálicos. La duración de la reacción depende también de la relación enzima/sustrato, que se elige dentro de un rango de 0,01:1 a 100:1, preferentemente dentro de un rango de 0,1:1 a 10:1 y que, en especial, es la relación fisiológica de aproximadamente 1:1 (unidad por unidad). La reacción se para mediante la adición de un inhibidor adecuado, en particular de un agente quelante, o bien disminuyendo la temperatura, por ejemplo congelando la solución de reacción, o bien se para no generando la actividad. El curso de la reacción puede controlarse mediante análisis electroforético, lo que permite determinar el final apropiado.

55 Esta preparación del vWF de estructura satélite puede llevarse a cabo tanto *in vitro*, en un entorno de reacción adecuado, como *in vivo* o *ex vivo*, por ejemplo mediante la expresión de r-vWF en un cultivo celular o de forma extracorpórea.

Preferentemente, la incubación de la multimerasa con el vWF biológicamente activo se lleva a cabo en presencia de un inhibidor de serina-proteasa, ya que mediante la incubación en presencia de un inhibidor de serina-proteasa se evitan procesos proteolíticos no específicos, que no están directamente relacionados con la multimerasa, y que se deben a las serina-proteasas presentes en la sangre o en el plasma. La actividad proteolítica de una posible serina-proteasa contaminante puede evitarse bajo la protección de un inhibidor de este tipo.

65 Así pues, la multimerasa según la invención se obtiene preferentemente en una fracción que está sustancialmente libre de una actividad de serina-proteasa, lo que corresponde a una actividad de plasmina menor que el límite de detección de un ensayo en el que se utiliza un sustrato cromógeno específico, por ejemplo S2251, según el documento EP-0 353 218.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que presenta una actividad de “multimerasa” purificada según la presente invención y que tiene las siguientes propiedades:

- a) presenta una actividad proteolítica indirecta o directa y convierte vWF de estructura singlete en vWF de estructura satélite,
- b) es activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa diisopropilfluorofosfato (DFP) o del inhibidor de la calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂ y
- c) está tratada para la inactivación o eliminación viral.

La inactivación o eliminación viral puede llevarse a cabo mediante cualquier tratamiento reconocido como eficaz. Según formas de realización preferentes de la presente invención, la composición farmacéutica que presenta actividad de multimerasa se trata con agentes tensioactivos y/o calor, por ejemplo mediante un tratamiento térmico en estado sólido, en especial mediante un tratamiento con vapor según los documentos EP-0 159 311, ó EP-0 519 901, ó EP-0 674 531.

Entre otros tratamientos para la inactivación viral se incluye también el tratamiento por medios químicos o químico-físicos, por ejemplo con agentes caotrópicos según los documentos WO94/13329, DE 44 34 538 ó EP-0 131 740 (disolventes), o por fotoinactivación.

La nanofiltración constituye también un método preferente de empobrecimiento viral dentro del alcance de la presente invención.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a la multimerasa según la invención como medicamento, en particular a la utilización de la multimerasa según la invención para la prevención y terapia de trombosis o de trastornos tromboembólicos, preferentemente para la prevención y terapia de un nivel de vWF supranormal o de un nivel elevado de vWF de alto peso molecular, mediante la administración a un paciente de una dosis eficaz de una preparación farmacéutica con contenido en multimerasa.

Dicho nivel supranormal de vWF puede estar causado por una concentración supranormal de antígeno de vWF o por una actividad supranormal del vWF, actividad que se refiere, en particular, a la actividad hemostática primaria, pero también a la actividad de enlace con el subendotelio, con los trombocitos, con proteínas de adhesión plaquetaria tales como GPIb y el complejo GPIIb/IIIa, con el colágeno, con el factor VIII y con la heparina.

La presente invención se refiere preferentemente a la prevención y terapia de la púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura de Henoch-Schönlein, síndrome hemolítico-urémico y preeclampsia o trombocitopenia neonatal.

La púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) fue descrita primeramente por Moschcowitz, 1924, y se caracteriza por una trombocitopenia con un número normal de megacariocitos en la médula ósea, trombosis microvasculares, trombos hialinos, función restringida de los riñones y proliferación de células endoteliales. Los resultados patológicos y clínicos en los pacientes que padecen TTP sugieren un estímulo directo de la agregación plaquetaria en la microcirculación.

Además de la trombocitopenia, el cuadro clínico incluye hemólisis intravascular con eritrocitos fragmentados y síntomas neurológicos. La incidencia en la población normal se estima en 0,1/100.000/año. En individuos infectados con VIH es de aproximadamente 4/100.000. Parece que existen distintos tipos de TTP. Además de una TTP primaria, se encuentran también las TTP secundarias, relacionadas con el embarazo, la quimioterapia, el trasplante de médula ósea y con enfermedades autoinmunes. En las TTP recidivantes crónicas (CRTTP) hay frecuentes episodios a intervalos regulares. Excepcionalmente se encuentran formas multiméricas grandes de vWF liberadas por células endoteliales en el plasma de pacientes que sufren TTP. Bajo “esfuerzo de cizallamiento”, estos multímeros de vW excepcionalmente grandes se enlazan a la glucoproteína Ib y a la glucoproteína IIb/IIIa con mucha más fuerza que el vWF normal y provocan la agregación plaquetaria intravascular.

Los ataques de TTP son difíciles de tratar. En la mayoría de los casos, el objetivo es eliminar los multímeros de vWF de alto peso molecular mediante un cambio de plasma.

La púrpura de Henoch-Schönlein (HSP) es un síndrome clínico caracterizado por púrpura no trombocitopénica, artralgias y glomerulonefritis. Los pacientes que sufren de HSP presentan un cuadro de multímeros de vWF anormal, con multímeros de vW con un peso molecular supranormal. La detección de estos multímeros de vW supranormales en HSP sugiere un trastorno de la función de las células endoteliales. Los multímeros de bajo peso molecular son liberados por las células endoteliales según el llamado mecanismo constitutivo, mientras que los multímeros de alto peso molecular son liberados en los “cuerpos de Weibel/Palade” de las células endoteliales con la estimulación.

La preparación farmacéutica según la invención se produce purificando una materia prima con contenido en multimerasa, preferentemente por métodos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y acabándola a continuación por métodos ya conocidos, opcionalmente combinándola con un tampón adecuado, sustancias auxiliares, conservantes y/o estabilizantes o inhibidores de pro-

teasa, e introduciéndola en recipientes de forma adecuada para su administración, y preferentemente envasándola de modo que sea estable al almacenamiento, opcionalmente en estado liofilizado o congelado.

La dosis eficaz de la preparación a la hora de administrarla varía en función del síndrome respectivo y, preferentemente, debería elegirse tras una determinación de la actividad de la proteasa de vWF endógena en el paciente [por ejemplo, por medio del método de determinación según la invención (más abajo)]. La dosis depende también de si la administración parenteral, preferentemente intravenosa, subcutánea o intramuscular, se ha de realizar en forma de bolo y de si se ha de realizar de forma sistémica y/o local en el sitio de la trombosis.

Cuando se administra la preparación según la invención deberían monitorizarse la concentración de vWF en el plasma y la estructura del vWF y la actividad de la proteasa de vWF en el paciente, y debería optimizarse la dosis en base a estos datos.

La preparación según la invención puede producirse mediante purificación a partir de sangre, suero o plasma.

Puede obtenerse también una preparación que comprende una multimerasa mediante la expresión de la multimerasa *in vivo* o *ex vivo*. Para ello son adecuadas sobre todo células procedentes de mamíferos, en particular células humanas, que pueden cultivarse y opcionalmente introducirse en el paciente. Dentro del alcance de una terapia génica, es posible insertar el ácido nucleico que codifica la multimerasa en las células, en particular en células endoteliales arteriales, que son capaces de expresar la multimerasa en vasos o en prótesis vasculares.

Para esta tecnología ya se conoce la obtención de un ácido nucleico que codifique la multimerasa. Un requisito indispensable es una multimerasa purificada que pueda utilizarse como molde para el ácido nucleico. Este ácido nucleico puede insertarse bien a través de un vector o bien directamente en la célula huésped, donde la expresión de la multimerasa se realiza de forma ya conocida.

Los métodos de purificación cromatográfica preferentes son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o filtración en gel, siendo especialmente preferente una combinación de estos métodos y múltiples cromatografías.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un método para ensayar la actividad proteolítica de la multimerasa según la presente invención. Para detectar la actividad de la multimerasa se utiliza un método que comprende los siguientes pasos: incubación de una fracción que contiene la multimerasa con un vWF y determinación de la velocidad de reacción del vWF. La fracción es, por ejemplo, una muestra de plasma o una fracción de plasma o una fracción con la multimerasa enriquecida, dado el caso purificada. Esta última se pone en contacto con un vWF que puede ser un vWF humano nativo, preferentemente con estructura singlete, o con un fragmento de vWF correspondiente que contenga la secuencia peptídica Tyr842-Met843.

La incubación se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones que aseguren una actividad óptima de la multimerasa, según se ha explicado más arriba. Durante la incubación, que preferentemente se realiza bajo condiciones casi fisiológicas, con un pH entre 7 y 10, preferentemente un pH entre 7,5 y 8,5, a una temperatura de entre 20 y 40°C, preferentemente a aproximadamente temperatura ambiente, el vWF reacciona, se degrada o se inactiva, y puede determinarse el resultado de la reacción. Lo que se detectan son, por ejemplo, fragmentos y productos de la degradación del vWF, tales como multímeros de poca masa molecular o bandas satélite, tras un análisis electroforético, o bien el cambio de la actividad del vWF.

En el método según la invención, la incubación de la multimerasa con el vWF biológicamente activo se lleva a cabo preferentemente en presencia de un inhibidor de serina-proteasa y la velocidad de reacción se determina preferentemente por el alcance de la inactivación o por la formación de ciertos fragmentos o bandas satélite del vWF.

La incubación en presencia de un inhibidor de serina-proteasa tal como aprotinina permite evitar procesos proteolíticos no específicos que no puedan atribuirse directamente a la multimerasa y que estén causados por serina-proteasas presentes en la sangre o el plasma.

Sin embargo, la determinación de la actividad proteolítica del multímero según la invención puede realizarse no sólo mediante una conversión directa del vWF, sino también mediante la escisión de un sustrato cromógeno que comprenda una secuencia peptídica homóloga a la secuencia de enlace peptídico de vWF Tyr842-Met843, así como un grupo cromógeno, escindiendo el sustrato bajo la acción de la multimerasa y formando un cromóforo, después de lo cual se determina la formación de color, que puede considerarse como directamente proporcional a la actividad proteolítica de la multimerasa.

Además, la invención se refiere también a preparaciones de vWF que han sido producidas libres de actividad de multimerasa y, en particular, en ausencia de una actividad de multimerasa. Estas preparaciones de vWF contienen preferentemente un vWF nativo que contiene todo el espectro de multímeros y que se caracteriza por un bajo grado de escisión del enlace peptídico Tyr842-Met843. Sin embargo, como alternativa también pueden contener una fracción de vWF, vWF, un derivado de vWF o un fragmento de vWF o un mutante de vWF, con la condición de que contenga la secuencia peptídica Tyr842-Met843. Esta preparación es adecuada sobre todo para la producción de preparaciones

farmacéuticas, dado que, debido a la falta de actividad de multimerasa, éstas permanecen inalteradas incluso después de un almacenamiento prolongado, por ejemplo en estado líquido.

Las preparaciones de vWF según la invención pueden obtenerse mediante una inhibición específica de la multimerasa o mediante la separación o el empobrecimiento de la multimerasa, a través de los métodos de purificación cromatográficos arriba mencionados, en particular mediante cromatografía de inmunoafinidad, utilizando anticuerpos dirigidos contra la multimerasa. Puede conseguirse una inhibición gracias a un contenido en agentes quelantes en la preparación farmacéutica o mediante inhibidores específicos que se enlacen como un “imitador de sustrato” al centro activo de la multimerasa, inhibiendo así la actividad de modo competitivo.

La preparación farmacéutica de vWF que contiene una actividad de multimerasa reducida, en particular menor que el límite de detección, comprende preferentemente, además el factor VIII de la coagulación sanguínea, un derivado de factor VIII o un mutante del factor VIII, estabilizado mediante la formación de un complejo con el vWF. Dado que el patrón de multímeros de la preparación de vWF según la invención permanece sorprendentemente inalterado incluso durante un tiempo prolongado, es decir que es permanente, también el efecto estabilizador para el factor VIII de la preparación farmacéutica según la invención permanece inalterado y se mantiene incluso después de un almacenamiento prolongado en estado líquido.

Así, la preparación farmacéutica según la invención es estable al almacenamiento no sólo en los estados liofilizado o líquido-ultracongelado, sino también en forma de preparación líquida.

Con ayuda de la multimerasa según la invención es posible además definir formas resistentes del vWF. Se incuban ciertas fracciones, derivados o mutantes de vWF con una fracción que contenga una actividad de multimerasa definida y se determina el alcance de la degradación proteolítica. Aparece una forma resistente de vWF cuando la actividad de la multimerasa no influye sustancialmente en la actividad del vWF (por ejemplo, alterando la secuencia peptídica Tyr842-Met843). Esta forma resistente de vWF puede utilizarse para estabilizar el FVIII:C *in vitro* e *in vivo*. De este modo no sólo se prolonga la vida media de la forma de vWF *in vivo*, sino también el tiempo de permanencia del FVIII:C en el plasma.

Por último, la presente invención se refiere también a un método para producir anticuerpos contra la multimerasa según la invención, que se lleva a cabo utilizando una preparación que contiene la multimerasa enriquecida, opcionalmente purificada, según la invención como un inmunógeno y produciendo anticuerpos policlonales o monoclonales contra la multimerasa por métodos ya conocidos *per se*.

Además, la presente invención se refiere también a una preparación de anticuerpos que contiene anticuerpos contra la multimerasa, pudiendo ser la preparación de anticuerpos monoclonal o policlonal.

Los anticuerpos según la invención preferentemente están inmovilizados en una fase sólida y pueden utilizarse así para la detección inmunológica o para la purificación de la multimerasa.

La presente invención se explicará con mayor detalle a través de los siguientes ejemplos y figuras, a los que, sin embargo, no ha de restringirse.

Figura 1: muestra la purificación del vWF;

Figura 2: muestra la degradación del vWF por proteasas contaminantes;

Figura 3: muestra el efecto de una sal y urea en la escisión del vWF;

Figura 4: muestra la degradación del vWF por diversos componentes sanguíneos;

Figura 5: muestra la purificación de proteínas de plasma;

Figura 6: muestra una cromatografía de la proteasa en Sephacryl S-300 HR;

Figura 7: muestra una SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras una cromatografía en Sephacryl S-300 HR;

Figura 8: muestra la influencia de iones metálicos y del pH en la actividad de la proteasa de escisión del vWF;

Figura 9: muestra el efecto de los inhibidores de proteasa en la degradación del vWF;

Figura 10: muestra una SDS-PAGE de los productos de degradación del vWF;

Figura 11: muestra el efecto de la proteasa de vWF sobre el fibrinógeno, BSA (seroalbúmina bovina), colágeno de piel de ternero y plasma normal diluido;

Figura 12: muestra la degradación de vWF por la multimerasa según la invención;

Figura 13: muestra la degradación de vWF de un crioprecipitado con la multimerasa según la invención;

Figura 14: muestra la degradación de multímeros grandes de vWF y r-vWF por medio de la multimerasa según la invención;

Figura 15: muestra la degradación de r-vWF con plasmina;

Figura 16: muestra la degradación de r-vWF con plasmina con y sin inhibidores;

Figura 17: muestra la degradación de vWF de un crioprecipitado con plasmina; y

Figura 18: muestra la incubación de r-vWF en plasma humano con déficit de vWF.

Ejemplos

Purificación de vWF

Se purificó vWF mediante filtración en gel de crioprecipitado humano obtenido de 1 l de plasma citratado en una columna de 2,6 x 35 cm de Sepharose CL-2B (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se eluyó con cloruro sódico 0,13 M, citrato 0,01 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4. Se recogieron fracciones de 6 ml a un caudal de 24 ml/h. Se midió el antígeno de vWF mediante ELISA utilizando antisuero de conejo policlonal contra vWF humano (RAHu/FVIII, de Nordic (Tillburg, Holanda), vWF antihumano de conejo marcado con peroxidasa, anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG de conejo (M737) y el kit de inmunotinción (K670) (todos de Dako Glostrup, Dinamarca) según las instrucciones incluidas en el kit.

Los resultados de la purificación del vWF se muestran en la Figura 1: las fracciones 12 a 20 contenían vWF sustancialmente libre de proteínas contaminantes. Estas fracciones se utilizaron como sustrato para la determinación de la actividad de escisión del vWF (más abajo).

El vWF contenido en estas fracciones demostró ser muy estable; incluso después de 24 h de incubación dialítica a 37°C (en ausencia de inhibidores) se obtuvo un patrón de multímeros idéntico al de las fracciones no tratadas, tanto con las 24 h de diálisis contra cloruro sódico 0,13 M, citrato 0,01 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, como con las 24 h de diálisis contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,4. Los geles de SDS-agarosa de estos ensayos se muestran en la Figura 2.

Sin embargo, las fracciones posteriores mostraban una marcada degradación del vWF con bajas concentraciones de sal en presencia de urea.

Efecto de las concentraciones de sal y urea en la escisión del vWF

Partes alícuotas de la fracción nº 29 de la columna de sepharose CL-2B se dializaron contra una solución de Tris-HCl 5 mM (pH 7,4) con diversas concentraciones de sal, en presencia o en ausencia de urea, sin adición de iones calcio. Se realizaron ensayos paralelos con otras partes alícuotas de la fracción 29 que habían sido sometidas a una incubación de 5 minutos con DFP (diisopropilfluorofosfato) 1 mM antes de la diálisis. En la Figura 3 puede verse claramente que los multímeros de vWF de gran tamaño desaparecían tras la diálisis si no había cloruro sódico presente. Además, la urea 1 M permitió aumentar notablemente la degradación del vWF incluso con concentraciones fisiológicas de sal. La combinación de una baja concentración de sal con urea 1 M condujo a una degradación total del vWF. Una preincubación con DFP 1 mM, un fuerte inhibidor de la serina-proteasa, produjo idénticos resultados. Así pues, la diálisis a 37°C contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, se eligió como condición óptima para un ensayo sensible con el fin de determinar la actividad de la proteasa.

Ensayo de la actividad de escisión de vWF

Debido a que, como ya se ha mencionado, la degradación del vWF resultó depender en gran medida de las condiciones tampón utilizadas, la enzima y el sustrato se incubaron en una membrana de diálisis circular (Millipore VSWP; diámetro 25 mm; de Millipore (Bedford, EE.UU.)), incubándose la superficie con 50 ml de tampón de diálisis. El sistema tampón que había sido suficientemente optimizado para el sistema de ensayo instantáneo comprendía una solución de diálisis con urea 1 M en Tris-HCl 5 mM a pH 8. La activación total de la proteasa se logró con 5 minutos de preincubación a 37°C con cloruro de bario 10 mM. En un experimento típico, se colocaron cuidadosamente 50 µl de solución de proteasa activada y 100 µl de solución de sustrato en una membrana flotante y se incubaron en un tubo cerrado durante 24 h en un horno seco a 37°C.

Se utilizaron fracciones de vWF libres de proteasa de la columna de Sepharose CL-2B como solución sustrato, la concentración de vWF en la mezcla de incubación era de aproximadamente 30 µg/ml. A continuación se retiraron las mezclas de reacción de la superficie de los filtros de membrana y se sometieron a una electroforesis en gel de SDS-agarosa para estudiar el patrón multimérico del vWF.

Electroforesis en gel de SDS-agarosa e inmunotransferencia de vWF no reducido

Se realizó una electroforesis en agarosa de capa fina utilizando el sistema tampón discontinuo según lo descrito por Ruggeri y Zimmerman (Blood 57 (1981), 1140). Antes de la electroforesis se incubó cada muestra con un volumen
 5 igual del tampón de muestra con contenido en SDS, durante 15 minutos, a 60°C. La electroforesis horizontal se realizó en HGT(P)-agarosa al 1% (2 mm de espesor, 20 cm de anchura y 8,5 cm de longitud) durante 17 h a 16°C en un equipo multiphor LKB (Pharmacia-LKB) con 80V y 10mA. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (de Schleicher & Schuell (Dassel, Alemania) durante 3 horas con 26V y 1,4A, utilizando una célula Trans-Blot de Bio-Rad con un tampón que contenía SDS al 0,04% y fosfato 0,05 M, pH 7,4. Los multímeros de
 10 vWF se identificaron con anticuerpos preoxidasa-conjugados contra vWF humano (anticuerpo de vWF antihumano de conejo marcado con peroxidasa P226 de Dako (Glostrup, Dinamarca)).

SDS-PAGE

15 Se prepararon geles de SDS-polacrilamida al 5% según Laemmli (Nature 227 (1970), 680). Las proteínas se redujeron con 65 mmoles de DTT durante 15 minutos a 60°C. Las fracciones cromatográficas no reducidas y las reducidas de la columna de Sephacryl S-300 HR se separaron por electroforesis en geles de 3 mm de espesor, durante 18 horas, con 60V, y se tiñeron con azul de Coomassie.

Immunotransferencia de vWF reducido

Se sometieron muestras reducidas de vWF no degradado y escindido por proteólisis a una SDS-PAGE y se electrotransfirieron a nitrocelulosa según se explica más arriba. Para la detección de fragmentos de vWF, se incubó la nitrocelulosa con un antisuero de conejo contra vWF humano (RAHu/FVIII), a lo que siguió una incubación con
 25 anticuerpos de ratón contra IgG de conejo (M737; de Dako (Glostrup, Dinamarca)) y el reactivo APAAP (fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina) (K670 de Dako (Glostrup, Dinamarca)) según Furlan y col. (PNAS 90 (1993), 7503).

Preparación de componentes sanguíneos para ser ensayados en cuanto a la presencia de la proteasa

30 Se extrajo sangre total de individuos normales en un tubo de vidrio sin adición de anticoagulantes. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la muestra de sangre coagulada se centrifugó dos veces durante 15 minutos a 2.500 g. Posteriormente, se añadieron 10 µl de PPACK 10 mM (difenilalanil-prolilarginina-clorometilcetona de Bachem, Bubendorf, (Suiza)) a 10 ml de suero y la muestra se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se congeló a -20°C. Del mismo sujeto se extrajeron 90 ml de sangre en 10 ml de citrato de sodio 0,13 M en una botella
 35 de plástico. Después de centrifugar durante 15 minutos a 300 g, se recuperaron aproximadamente 50 ml de plasma rico en plaquetas (PRP). Se centrifugó una parte alícuota de PRP durante 15 minutos a 2.500 g. El plasma pobre en plaquetas (PPP) resultante se recentrifugó durante 15 minutos a 3.000 g y se congeló a -20°C. El sedimento plaquetario se resuspendió en cloruro sódico al 0,9% en 1/15 del volumen original y se sometió a 3 ciclos de congelación y descongelación. Las plaquetas lisadas se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000 g y el sobrenadante y el sedimento
 40 resultantes se congelaron a -20°C. Una parte alícuota congelada del PPP se descongeló lentamente para producir el crioprecipitado. Después de centrifugar durante 15 minutos a -5°C y 3.000 g, tanto el sobrenadante como el crioprecipitado, absorbidos en 1/15 del volumen original de cloruro sódico al 0,9%, se congelaron a -20°C. Otra parte alícuota de PPP se transfirió a un tubo de vidrio, se mezcló con 1/40 de volumen de una solución de cloruro cálcico 1 M y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Después de eliminar el coágulo de fibrina y centrifugar durante 15 minutos a 3.000
 45 g, se añadió PPACK hasta una concentración final 25 µM y se congeló el plasma desfibrinado a -20°C. Las muestras congeladas se incubaron durante 10 minutos, cada una a 37°C, antes del ensayo para determinar la actividad de la proteasa.

Ensayo de los componentes sanguíneos preparados en cuanto a la actividad de la proteasa

50 Se mezclaron 10 µl de PPACK 10 mM y 10 µl de cloruro cálcico 0,55 M, en cada caso, con 200 µl de suero, PPP, PPP libre de crioprecipitado, PPP desfibrinado, así como crioprecipitado concentrado en un factor de 15 y plaquetas lisadas. Después de incubar durante 10 minutos a 37°C, se mezclaron partes alícuotas de 10 µl con 40 µl de una solución de vWF dializada contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM (pH 7,4) durante una noche a 37°C, y se detectó la
 55 degradación proteolítica del vWF mediante electroforesis en gel de SDS-agarosa.

Se encontró que la actividad de la proteasa era considerablemente mayor en el PPP que en el sobrenadante o en el sedimento de plaquetas lisadas obtenidos de una concentración en un factor de 15 de PRP (véase la Figura 4). La actividad de la proteasa no se veía afectada por la desfibrinación y se recuperaba parcialmente en el crioprecipitado de
 60 PPP; el crioprecipitado correspondiente a un PPP concentrado en un factor de 15 mostró una considerable actividad, pero el crioprecipitado no concentrado contenía mucha menos proteasa que la cantidad equivalente de PPP. No había diferencias significativas en la actividad de la proteasa hallada en PPP citratado y en suero obtenido de sangre no coagulada.

Purificación de proteasa de plasma

Se eliminó el fibrinógeno del plasma antes de realizar los procedimientos cromatográficos, porque estos procedimientos de purificación pueden inducir a la activación de la cascada de coagulación. Los experimentos indicaban

también que la actividad de la proteasa que degrada el vWF no se veía afectada - o al menos no sustancialmente - por la desfibrinación del plasma o de la fracción plasmática, DFP o PPACK.

Se recogió sangre (450 ml) de individuos sanos en soluciones de 63 ml de citrato/fosfato/dextrosa/adenina (CPD-A₁) en una balanza vibratoria. Después de centrifugar 2 veces durante 15 minutos a 20°C y 2.500 g, se añadió cloruro cálcico 1 M hasta una concentración final 25 mM y se agitó el PPP recalcificado durante 30 minutos a 37°C. Después de eliminar el coágulo de fibrina mediante centrifugación, se añadieron PPACK y DFP al suero resultante hasta alcanzar concentraciones finales 5 µM y 2 µM, respectivamente, y se incubó durante 15 minutos a 37°C para inhibir las enzimas de coagulación activadas. Además, el suero se dializó contra un tampón de equilibrio con cloruro sódico 1 M y Tris-HCl 0,05 M a un pH de 7,4. Se guardaron partes alícuotas de 50 ml a -20°C hasta la purificación.

La proteasa pudo purificarse en primer lugar del plasma normal desfibrinado como materia prima en Sepharose quelante cargada con Cu²⁺ (1,6 x 22 cm; Pharmacia LKB), utilizando una elución incremental con tampón de equilibrio que contenía concentraciones crecientes de glicina. Se reunieron fracciones con contenido en proteasa (véase línea horizontal en la Figura 5A) en una reserva (conteniendo esta reserva el 14,7% de la proteína original), se dializaron contra (NH₄)₂SO₄ 0,6 M/Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4, y se aplicaron a una columna llena de butil-sepharose (1,6 x 27 cm; Pharmacia LKB), eliminándose la mayoría de las proteínas contaminantes mediante la elución incremental con una concentración menor de (NH₄)₂SO₄. Se reunieron en una reserva fracciones activas desde un punto de vista proteolítico (véase línea transversal en la Figura 5b) de dos columnas de butil-sepharose (conteniendo esta reserva casi toda la actividad de proteasa, pero sólo el 0,75% de la proteína original), se dializaron contra EDTA 1 mM, se liofilizaron, se absorbieron en 5 ml de agua destilada y se aplicaron a una columna de Sephacryl S-300 HR (2,6 x 90 cm; Pharmacia, LKB) que había sido equilibrada con NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4 (véase la Figura 5C; las fracciones bajo la sección transversal contenían la totalidad de la actividad de proteasa, pero sólo el 0,08% de la proteína total original).

Para mejorar la resolución de la filtración en gel, se simuló una columna larga cerrando el primer ciclo de elución, reintroduciendo las proteínas eluidas en la misma columna y recogiendo en un segundo ciclo. De nuevo se reunieron las fracciones activas, se dializaron contra EDTA 1 mM, se liofilizaron, se redisolviéron en 3 ml de agua destilada y se sometieron a otra filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300 HR.

En esta filtración en gel se cerraron los primeros dos ciclos y las fracciones se recogieron en el tercer ciclo. En todos estos procedimientos cromatográficos descritos se recogieron fracciones de 6 ml con un caudal de 60 ml/h. Las fracciones que contenían la proteasa se guardaron a -20°C.

Los resultados se muestran en la Figura 6, en la que puede verse la elución del material UV-absorbente (Figura 6A) y la actividad de la proteasa (Figura 6B). El pico de la actividad de la proteasa (fracciones 9 a 17) contenía solamente un 0,009% de la proteína sérica original. Así pues, se había alcanzado un factor de purificación de aproximadamente 10.000. Sin embargo, la preparación de proteasa obtenida aún contenía cantidades considerables de proteínas contaminantes (véase la Figura 7). El pico de la actividad de la proteasa (fracciones 11 a 15) se obtenía junto con una banda de proteína en el gel no reducido con un peso molecular de aproximadamente 300 kD, que aparecía con algunas proteínas con un peso molecular entre 130 y 450 kD (bandas principales con M_r de 450, 200, 180 y 130 kD).

Composición de aminoácidos y análisis de secuencia

Para el análisis de la composición de aminoácidos y de la secuencia de aminoácidos, la fracción pico no reducida de la proteasa y los fragmentos de vWF reducidos se dializaron contra EDTA 1 mM, se liofilizaron y se redisolviéron en 1/50 del volumen original antes de la SDS-PAGE. Las bandas de proteína HMW se electrotransfirieron del gel a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (BioRad) durante 6 horas con 26V y 0,4A, utilizando SDS al 0,05%, metanol al 10%, ácido bórico 0,05 M, pH 9,0, como tampón de transferencia. Después de la transferencia, la membrana se tiñó con azul de Coomassie en metanol al 40%, se destintó en metanol al 40% y ácido acético al 10% y se secó al aire. Las bandas suprimidas se transfirieron al cartucho de transferencia de un Applied Biosystems Model 477A Sequenator, que estaba equipado con cromatografía líquida de alta resolución en línea para el análisis de derivados de feniltiohidantoína. Para el análisis de la composición de aminoácidos, las bandas de proteína se hidrolizaron en fase gaseosa sobre HCl 6N durante 22 horas a 110°C. Los aminoácidos se extrajeron de la membrana de PVDF con un 70% de HCl 0,1N/30% de metanol y se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución como derivados de feniltiocarbamilo. En la Tabla 1 se muestra la composición de aminoácidos de la banda de proteína no reducida coeluida de la columna de Sephacryl S-300 HR junto con la actividad de proteasa.

TABLA 1

	Aminoácido	Residuos por 1.000 residuos
5	Asp + Asn	99,4
	Thr	59,4
10	Ser	63,3
	Glu + Gln	150,2
	Pro	65,5
15	Gly	75,9
	Ala	86,5
	Val	70,7
20	Ile	32,9
	Leu	101,7
	Tyr	30,6
25	Phe	41,7
	His	22,4
	Lys	41,6
30	Arg	49,3

Influencia de los iones metálicos y del pH en la actividad de la proteasa de escisión del vWF

Partes alícuotas (95 μ l) de la proteasa purificada se preincubaron durante 15 minutos a 37°C con 5 μ l de soluciones 0,2 M de las sales siguientes: ZnCl₂, CuSO₄, Cd(CH₃COO)₂, CoSO₄, NiCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, SrCl₂ y BaCl₂. A continuación se añadieron a cada parte alícuota 50 μ l del vWF purificado y se transfirieron las mezclas de incubación a filtros de membrana flotantes. Después de 24 horas de incubación a 37°C contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, se retiraron las muestras de los filtros y se sometieron a una electroforesis en gel de SDS-agarosa.

La proteasa no mostró activación alguna por Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ o Mn²⁺. Sólo se halló una ligera activación por Mg²⁺; se obtuvo una activación sustancial por Ca²⁺, Sr²⁺ y, en particular, por Ba²⁺ (véase la Figura 8A).

Una preincubación prolongada con calcio, estroncio y bario estaba asociada a una pérdida de actividad de la proteasa incluso con concentraciones fisiológicas de sal y en ausencia de urea, probablemente debido a la autodigestión de la proteasa. En ausencia de estos iones, la proteasa era completamente estable en solución y, por tanto, era posible purificar la enzima mediante procedimientos cromatográficos que duraron varios días, a temperatura ambiente.

Los pH óptimos de la proteasa tras la activación por calcio y bario se determinaron preincubando la proteasa con cloruro cálcico 10 mM o con cloruro de bario 10 mM e incubando con vWF durante la diálisis en tampón de urea-Tris-HCl, utilizándose varios tampones con un pH que oscilaba entre 6 y 11. El patrón de multímeros de vWF en las muestras dializadas se analizó mediante electroforesis en SDS-agarosa.

El pH óptimo para la degradación del vWF por la proteasa activada con calcio resultó estar entre 9 y 10, mientras que la mayor actividad de la proteasa activada con bario se hallaba aproximadamente a un pH 8 (véase la Figura 8B).

Así, los experimentos para determinar la actividad de la proteasa de degradación del vWF se realizaron siempre a pH 8 después de una incubación con cloruro de bario 10 mM.

Efecto de los inhibidores de proteasa en la degradación del vWF

Se reactivó proteasa purificada con cloruro de bario 10 mM durante 5 minutos a 37°C y a continuación se incubó durante 15 minutos a 37°C con los siguientes inhibidores de proteasa: EDTA (concentración final 10 mM), EGTA (10 mM), Na₃-citrato (10 mM), yodoacetamida (IAA, 10 mM), N-etilmaleimida (NEM; 10 mM), DFP (1 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 1 mM), N- α -p-tosil-L-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK; 1 mM), leupeptina (0,01 mM) y aprotinina (0,01 mM).

ES 2 285 734 T3

Además, se ensayaron los siguientes inhibidores de carbobenciloxi-(Z)-peptidil-diazometilcetona (todos con una concentración final 0,1 mM durante la preincubación con proteasa de activación de bario): Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, Z-Val-Val-Tyr-CHN₂, Z-Phe-Ala-CHN₂, Z-Phe(I)-Ala-CHN₂, Z-Tyr-Ala-CHN₂ y Z-Phe-Phe-CHN₂.

Tras la preincubación, se añadieron partes alícuotas de 100 μ l de las mezclas de inhibidor de enzima a 50 μ l de solución de vWF purificada y se dializaron las mezclas contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, a un pH de 7,4, durante 24 horas a 37°C. La degradación del vWF se ensayó mediante electroforesis en SDS-agarosa e inmunotransferencia (véase la Figura 9A).

Los agentes quelantes EDTA y EGTA inhibían por completo la proteasa preincubada con bario, mientras que con citrato sólo fue posible lograr una inhibición parcial. Una preincubación de 15 minutos con los inhibidores de enzima sulfhidrilo IAA y NEM no resultó en una inhibición de la proteasa. Tampoco hubo inhibición de la proteasa según la invención con los inhibidores de serina-proteasa DFP, PMSF y aprotinina, ni con los inhibidores de serina/sulfhidrilo proteasa TLCK, TPCK y leupeptina.

En otros experimentos en los que los mismos inhibidores se incorporaron también a la solución de diálisis se obtuvieron los mismos resultados, con una excepción: con NEM fue posible lograr una inhibición parcial de la proteasa.

Así, parece que la proteasa es inhibida muy lentamente por NEM, aunque no por IAA.

Entre los inhibidores de peptidil-diazometilcetona ensayados, sólo Z-Phe-Phe-CHN₂ y Z-Val-Val-Tyr-CHN₂ afectaron a la degradación proteolítica del vWF (véase la Figura 9B).

Subunidades polipeptídicas de vWF degradado y de otras proteínas

Se mezcló vWF purificado (50 μ l) con diversas diluciones de la proteasa (100 μ l), que se había preincubado con cloruro de bario 10 mM durante 5 minutos a 37°C, y las mezclas se dializaron contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, durante 24 horas a 37°C. Los productos de digestión resultantes se sometieron a SDS-PAGE después de haber sido reducidos con DTT. Se realizó una inmunodetección de los fragmentos de vWF reducidos utilizando el kit APAAP.

La degradación de la subunidad de vWF intacta iba acompañada de la aparición de cantidades cada vez mayores de dos fragmentos con un peso molecular de 170 y 140 kD respectivamente, según mostraban las inmunotransferencias de SDS-PAGE reducida (véase la Figura 10).

En experimentos paralelos se incubaron otras tres proteínas con la proteasa purificada; es decir, se incubaron soluciones de 50 μ l en cada caso de fibrinógeno humano (0,4 mg/ml), BSA (0,2 mg/ml) o colágeno de piel de ternero (0,4 mg/ml), incubada cada una con 100 μ l de la proteasa no diluida que se había preincubado con iones bario, y las mezclas de incubación se dializaron contra urea 1 M, Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, durante 24 horas a 37°C. Además se dializó plasma humano normal citratado (dilución 1:100) junto con la preparación de proteasa según la invención. En experimentos de control se substituyó la proteasa por cloruro sódico 0,15 M/Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4. Tras la diálisis, las proteínas se redujeron con DTT y se aplicaron a una SDS-PAGE. Para la detección de las cadenas polipeptídicas se utilizó una tinción con azul de Coomassie.

Se comprobó que, en condiciones en las que el vWF se degradaba, no se observaba degradación alguna del fibrinógeno humano, la BSA o el colágeno de piel de ternero con la preparación de proteasa según la invención (véase la Figura 11). La SDS-PAGE reducida mostraba cadenas de subunidad inalteradas de estas proteínas que se habían utilizado como sustratos potenciales, lo que indicaba que la proteasa de la invención tenía una gran especificidad con respecto al vWF.

Análisis de aminoácidos y secuencia de aminoácidos del vWF y sus productos de degradación

Las tres bandas electroforéticas mostradas en la Figura 10, es decir las bandas de 250, 170 y 140 kD, se transfirieron a una membrana de PVDF y se sometieron a un análisis de composición y secuencia de aminoácidos. Los resultados están recogidos en la Tabla 2 y demuestran una buena concordancia entre la composición de aminoácidos de estas tres bandas polipeptídicas y los valores teóricos calculados para la subunidad de vWF intacta, el fragmento C-terminal 843-2050 y el fragmento N-terminal 1-842, respectivamente; véase el documento EP-0 197 592 al respecto. La secuencia de aminoácidos N-terminal de las bandas de 250 y 140 kD era Ser-Leu-Ser-X-Arg; esta secuencia concuerda con la secuencia N-terminal de la subunidad de vWF intacta. El análisis del producto de degradación de tamaño mayor, con una masa molecular de 170 kD, dió como resultado una secuencia N-terminal Met-Val-Thr-Gly-Asn correspondiente a los residuos de los aminoácidos 843-847 de la subunidad de vWF intacta. Estos datos indican que la proteasa purificada escinde el enlace peptídico 842Tyr-843Met.

TABLA 2

	Aminoácido	M_r ≈ 250 kD	vWF 1- 2050	M_r ≈ 170 kD	vWF 843- 2050	M_r ≈ 140 kD	vWF 1- 842
5	Asp + Asn	173	187	102	108	77	79
10	Thr	118	116	70	78	39	38
	Ser	131	141	78	80	55	61
	Glu + Gln	249	237	152	139	104	98
15	Pro	139	136	85	86	54	50
	Gly	152	137	117	86	76	51
	Ala	110	104	67	60	50	44
20	Val	171	184	87	103	66	81
	Ile	75	78	41	44	30	34
	Leu	163	156	86	83	73	73
25	Tyr	48	49	18	22	21	27
	Phe	58	56	33	32	25	24
	His	53	52	28	31	19	21
30	Lys	87	88	45	47	39	41
	Arg	95	101	49	58	38	43

35 Fragmentación proteolítica de vWF recombinante

Se incubó factor vWF recombinante (r-vWF), producido según FEBS-Letters 375, 259-262 (1995) con una concentración de 104 U(Ag)/ml en tampón TBS 20 mM, pH 8,3, con la preparación de proteasa de vWF según la invención de acuerdo con lo arriba explicado. Después de 3 h ya había una pérdida de los multímeros mayores con una formación de bandas satélite similares a las del vWF plasmático. Después de 20 horas, ya no podían detectarse oligómeros ni multímeros (véase la Figura 12A).

Después de una cromatografía de afinidad de quelato de cobre, la preparación preparada según la invención con la proteasa específica para el vWF aún mostraba una actividad de plasmina claramente mensurable (0,2 U/ml; determinada precalentando 50 µl de muestra o estándar (plasmina humana de Chromogenics, con 19,3 U/ml en tampón TBS 20 mM, pH 8,3) durante un minuto a 37°C y mezclándolos con 200 µl de sustrato cromógeno PL1 de Immuno AG (D-ciclohexilglicil-L-alanil-L-arginina-p-nitroanilida, 1 mM tampón TBS, pH 8,3), y midiendo a continuación la cinética de liberación de *p*-nitroanilina mediante fotometría a 405 nm y 37°C). Así, era necesario excluir la posibilidad de que la preparación de proteasa pudiera producir una degradación de los multímeros del factor von Willebrand debido a plasmina presente en la preparación y no como resultado de la proteasa específica para el vWF.

En las Figuras 12B y 12C puede verse que el vWF recombinante se degrada de forma idéntica cuando se incubaba con la proteasa según la invención en presencia de un inhibidor de plasmina (aprotinina) y un inhibidor de proteasa con menos especificidad para la plasmina, por ejemplo PPACK. La concentración de aprotinina y PPACK se eligió de modo que no pudiera detectarse actividad de proteasa con un sustrato cromógeno de plasmina.

Cuando se incubó un crioprecipitado con proteasa de vWF (Figura 13A) pudo observarse una pérdida de multímeros con el paso del tiempo, como en el caso del vWF recombinante. Las bandas satélite mostraban un aumento ya después de una corta incubación. La degradación no pudo impedirse mediante la adición de inhibidores de proteasa (aprotinina, Figura 13B, y PPACK, Figura 13C); sin embargo, pudo ralentizarse. Si se utilizaba una preparación de los multímeros de vWF con el mayor peso molecular (véase Figura 14A), producida con este fin, en lugar del crioprecipitado [preparación de laboratorio 10 U(Ag)/ml en tampón TBS 20 mM, pH 8,3], se detectaba un claro desplazamiento hacia los multímeros de menor peso molecular con un aumento en las bandas satélite con la proteasa de vWF según la invención. Una digestión durante la noche con plasmina degradó por completo tanto el vWF plasmático como el vWF recombinante (véanse las Figuras 14B y 14D). En este experimento, los productos de degradación del vWF recombinante con la proteasa según la invención eran las bandas satélite desarrolladas y las bandas centrales. En realidad, todas las bandas eran muy similares a las del vWF plasmático (Figura 14C).

La incubación de r-vWF con plasmina (véase la Figura 15; la plasmina se diluyó hasta 0,2 U/ml en tampón TBS 20 mM, pH 8,3, y se mezcló 1:1 con la preparación de r-vWF respectiva y se incubó a 37°C) con una concentración baja, basada en el presente sustrato, mostró una degradación sucesiva de los multímeros durante 29 h (véase la Figura 15A) en el estudio cinético. Una preparación de control sin proteasa demuestra la estabilidad del r-vWF en solución ya hallada en otras circunstancias (véase la Figura 15C). Al reducir la concentración de plasmina a 1:10, el r-vWF se degradaba más lentamente (Figura 15B); esto pudo impedirse mediante la adición de aprotinina (véase la Figura 16B) y PPACK (véase la Figura 16C). Los multímeros no mostraron cambios con el paso del tiempo (aproximadamente 20 horas), a diferencia de la situación después de un tratamiento sin inhibidor (véase la Figura 16A).

El experimento control con crioprecipitado (Figura 17) con más de 8 horas de incubación muestra de nuevo una reducción de los multímeros grandes, que fue posible impedir mediante la adición de aprotinina o PPACK.

Se realizaron ensayos adicionales para estudiar si durante la incubación con plasma humano (véase la Figura 18) se producía una degradación proteolítica del r-vWF. Para ello, se mezcló la preparación de r-vWF con volúmenes iguales de un plasma con déficit de vWF (véase la Figura 18A) y se incubó durante 48 horas, tomándose muestras en distintos momentos. No pudo detectarse cambio alguno del r-vWF con el paso del tiempo. Una preparación control que se dejó reposar el mismo tiempo a 37°C en medios tampón tampoco mostró cambios en su estructura (véase la Figura 18B).

El análisis del r-vWF y sus productos de degradación proteolítica se realizó en geles de agarosa al 1% y al 2%, también según el método de Ruggeri y col. (Blood 57 (1981), 1140-1143).

Los multímeros de vWF se hicieron visibles mediante una tinción inmunoenzimática según Aihara y col. (Thromb. Haemostas. 55 (1986), 263-267). Como anticuerpo primario se utilizó un antisuero anti-factor von Willebrand de conejo (de Dakopatts, Glostrup, Dinamarca) y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo H+L de cabra anti-IgG de conejo purificado por afinidad y conjugado con fosfatasa alcalina (de Axell Accurate Chemical and Scientific Corp, Westburg, N.Y.). La tinción de las bandas de proteína se realizó por medio del sistema sustrato nitroazul de tetrazolio/bromocloro-indolil-fosfato.

REIVINDICACIONES

1. Multimerasa purificada que escinde el enlace peptídico 842Tyr-843Met del vWF y que es activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa DFP o del inhibidor de calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, obtenible de plasma, suero, de una fracción plasmática o de una fracción sérica, por un método cromatográfico, comprendiendo dicho método la recuperación de dicha multimerasa de las fracciones en las que se halla la actividad proteolítica para la inactivación del vWF en presencia de un inhibidor de serina-proteasa.

2. Preparación que comprende una multimerasa según la reivindicación 1, estando dicha multimerasa presente en una forma enriquecida como mínimo en un factor de 1.000 en relación con el plasma.

3. Método para purificar una multimerasa según la reivindicación 1 de plasma, suero, o de una fracción plasmática o de una fracción sérica por un método cromatográfico, comprendiendo dicho método la recuperación de dicha multimerasa de las fracciones en las que se halla la actividad proteolítica para la escisión del vWF en presencia de un inhibidor de serina proteasa.

4. Método para producir una multimerasa según la reivindicación 1 mediante la purificación de sangre, suero o plasma.

5. Multimerasa obtenida por un método según la reivindicación 4.

6. Multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, susceptible de ser detectada en una fracción obtenida tras filtración en gel de una fracción plasmática o sérica correspondiente a un peso molecular aparente de más de 200 kD.

7. Multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que presenta una actividad específica de como mínimo 10 U/mg de proteína en presencia de un inhibidor de serina-proteasa.

8. Multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que tiene un pH óptimo entre 7 y 10.

9. Multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que es activa en presencia de iones metálicos bivalentes.

10. Multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que presenta una actividad incrementada con relación al vWF modificado.

11. Método para escindir vWF en el enlace peptídico Tyr842-Met843 con una multimerasa purificada según la reivindicación 1 o la reivindicación 5.

12. Composición farmacéutica que comprende una multimerasa que escinde el enlace peptídico 842Tyr-843Met del vWF y que es activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa DFP o del inhibidor de calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, que ha sido tratada para una inactivación o eliminación viral.

13. Composición según la reivindicación 12, **caracterizada** porque dicha multimerasa tiene una actividad específica de como mínimo 10 U/mg de proteína en presencia de un inhibidor de serina-proteasa.

14. Multimerasa según las reivindicaciones 1 y 5 para su utilización como medicamento.

15. Utilización de una multimerasa según se define en o purificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, tratada para una inactivación o eliminación viral, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trombosis y trastornos tromboembólicos.

16. Utilización de una multimerasa según se define en o purificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura de Henoch-Schönlein, preeclampsia, trombocitopenia neonatal o síndrome hemolítico-urémico.

17. Método para producir una preparación farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende

- provisión de una materia prima con contenido en multimerasa
- purificación de dicha materia prima
- formulación subsiguiente de dicha materia prima con contenido en multimerasa purificada para obtener una preparación farmacéutica por métodos ya conocidos, siendo dicha multimerasa capaz de escindir el enlace peptídico 842Tyr-843Met del vWF y activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa DFP o del inhibidor de calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂ y seleccionándose la materia prima del grupo formado por sangre, suero y plasma.

ES 2 285 734 T3

18. Método según la reivindicación 17, **caracterizado** porque dicha purificación se realiza utilizando métodos cromatográficos tales como una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía hidrofóbica o una cromatografía de afinidad.

5 19. Método según la reivindicación 18, **caracterizado** porque dicha materia prima se selecciona del grupo formado por sangre, suero y plasma.

20. Método para determinar la actividad proteolítica de la multimerasa que escinde el enlace peptídico 842Tyr-843Met del vWF y es activa en presencia del inhibidor de serina-proteasa DFP o del inhibidor de calpaína-proteasa Z-Leu-Leu-Tyr-CHN₂, comprendiendo dicho método

- incubación de una fracción que contiene dicha multimerasa con un sustrato cromógeno que es homólogo a la secuencia del vWF que contiene el enlace peptídico Tyr842-Met843 e incluye un grupo cromógeno,
- 15 - de este modo, escisión de dicho sustrato mediante actividad proteolítica para formar un cromóforo, y
- determinación de la aparición de color.

21. Método para preparar anticuerpos contra una multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, que comprende la utilización de dicha multimerasa en forma purificada como inmunógeno.

22. Preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos dirigidos contra una multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5.

23. Preparación de anticuerpos según la reivindicación 22, **caracterizada** porque comprende además una fase sólida, estando dichos anticuerpos inmovilizados en dicha fase sólida.

24. Método para detectar o purificar una multimerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicha multimerasa ha sido tratada para una inactivación o empobrecimiento viral, comprendiendo dicho método el enlace de dicha multimerasa a anticuerpos capaces de enlazarse con la multimerasa y subsiguiente separación de tal multimerasa de dichos anticuerpos.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

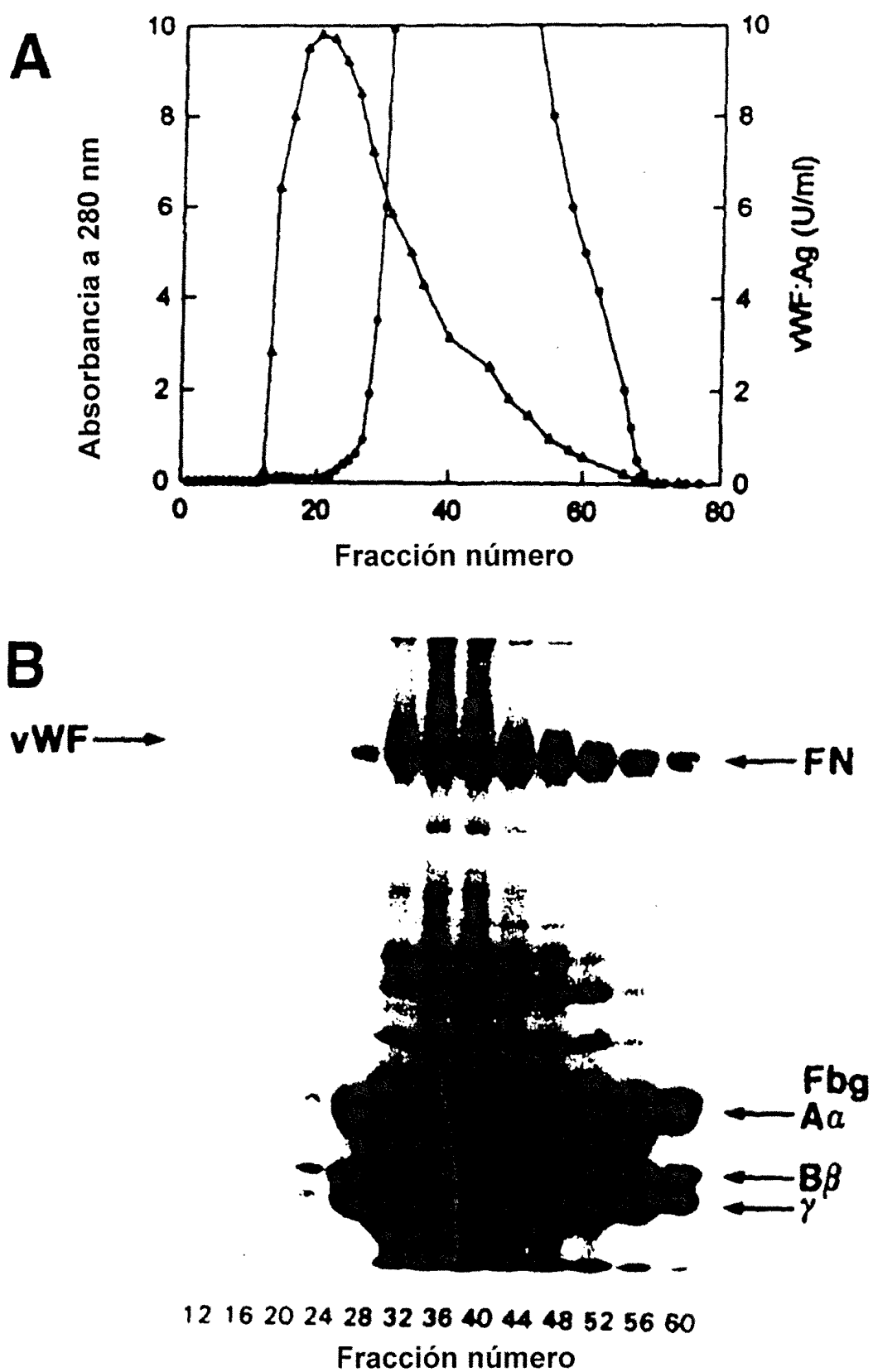
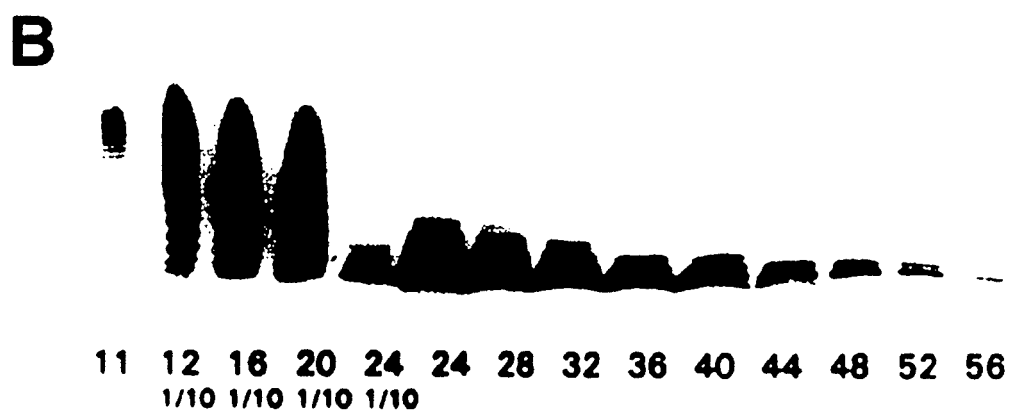


FIG. 2



Fracción número



Fracción número

FIG. 3



FIG. 4

Plaquetas lisadas (x 15): sedimento

Plaquetas lisadas (x 15): sobrenadante

PPP

PPP libre de crioprecipitado

Crioprecipitado (x 15)

PPP desfibrinado

Suero



FIG. 5

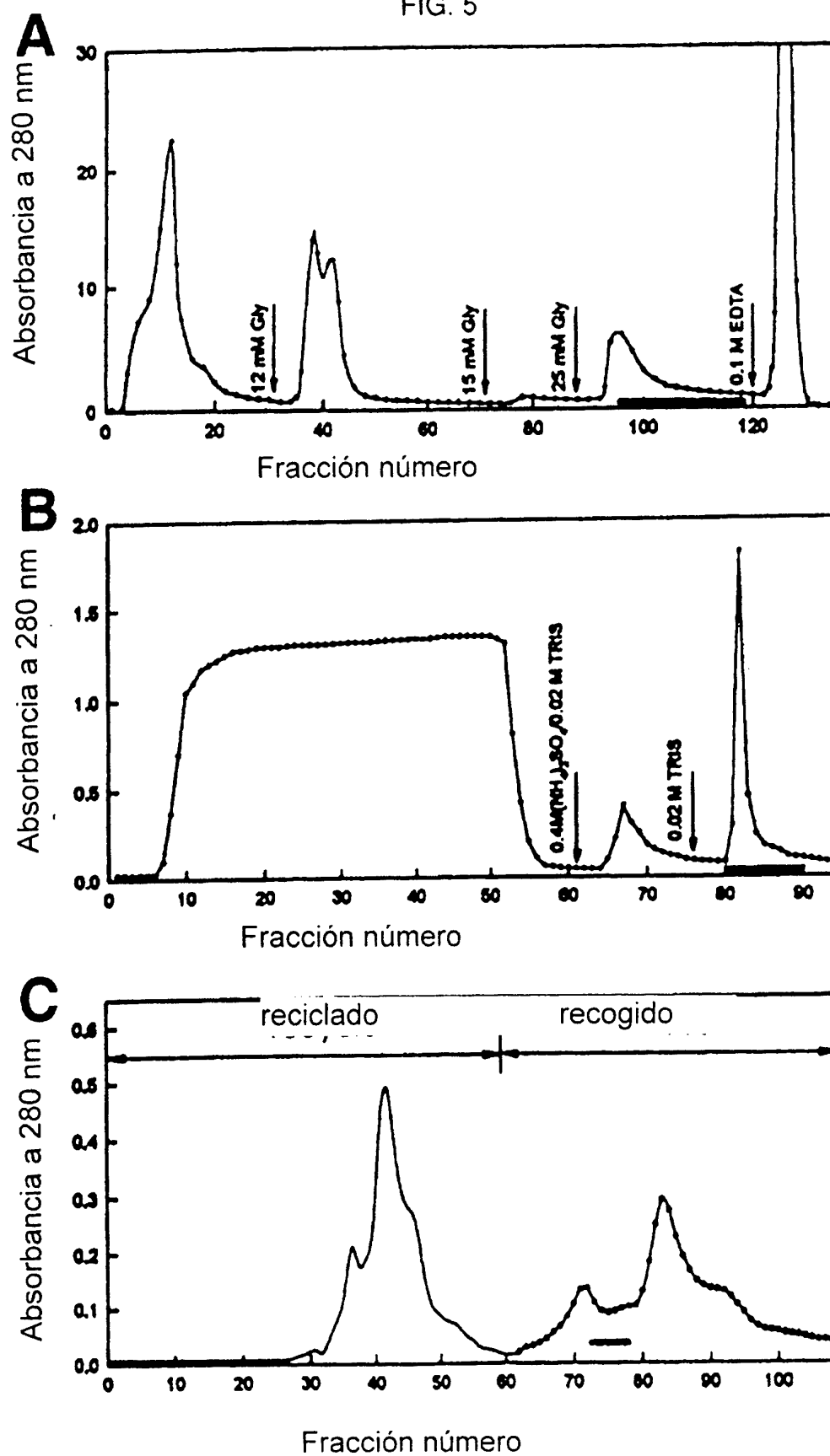


FIG. 6

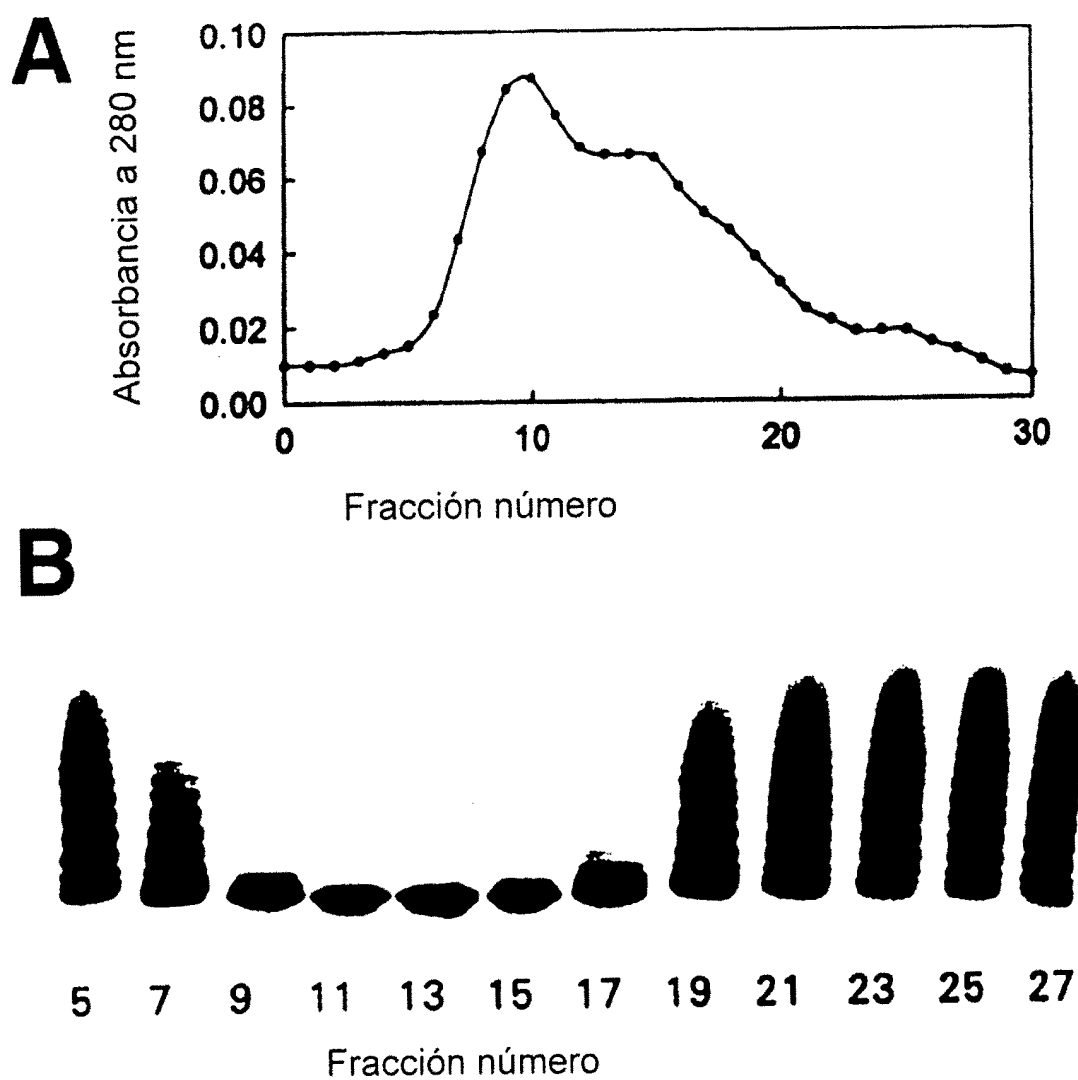


FIG. 7

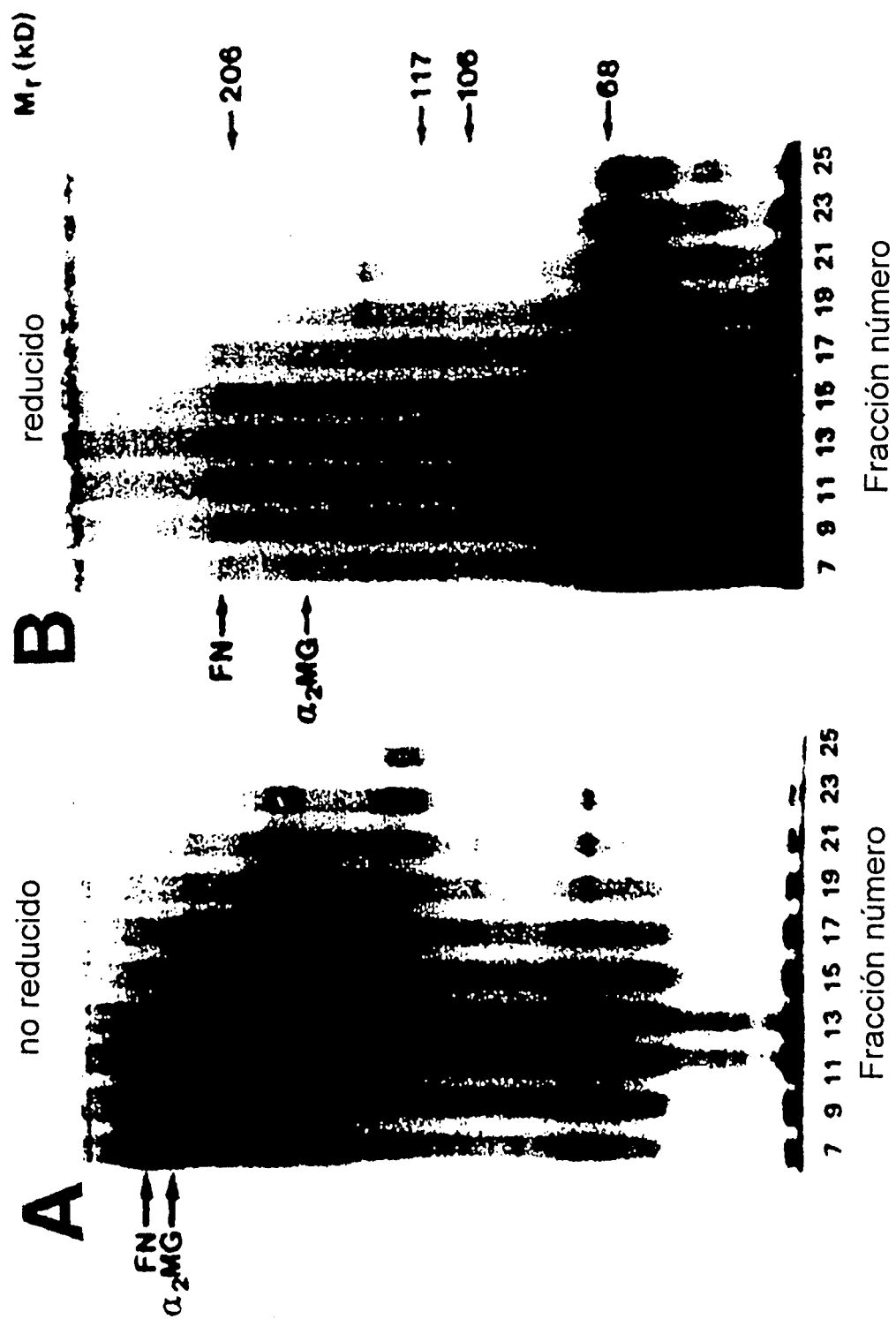


FIG. 8

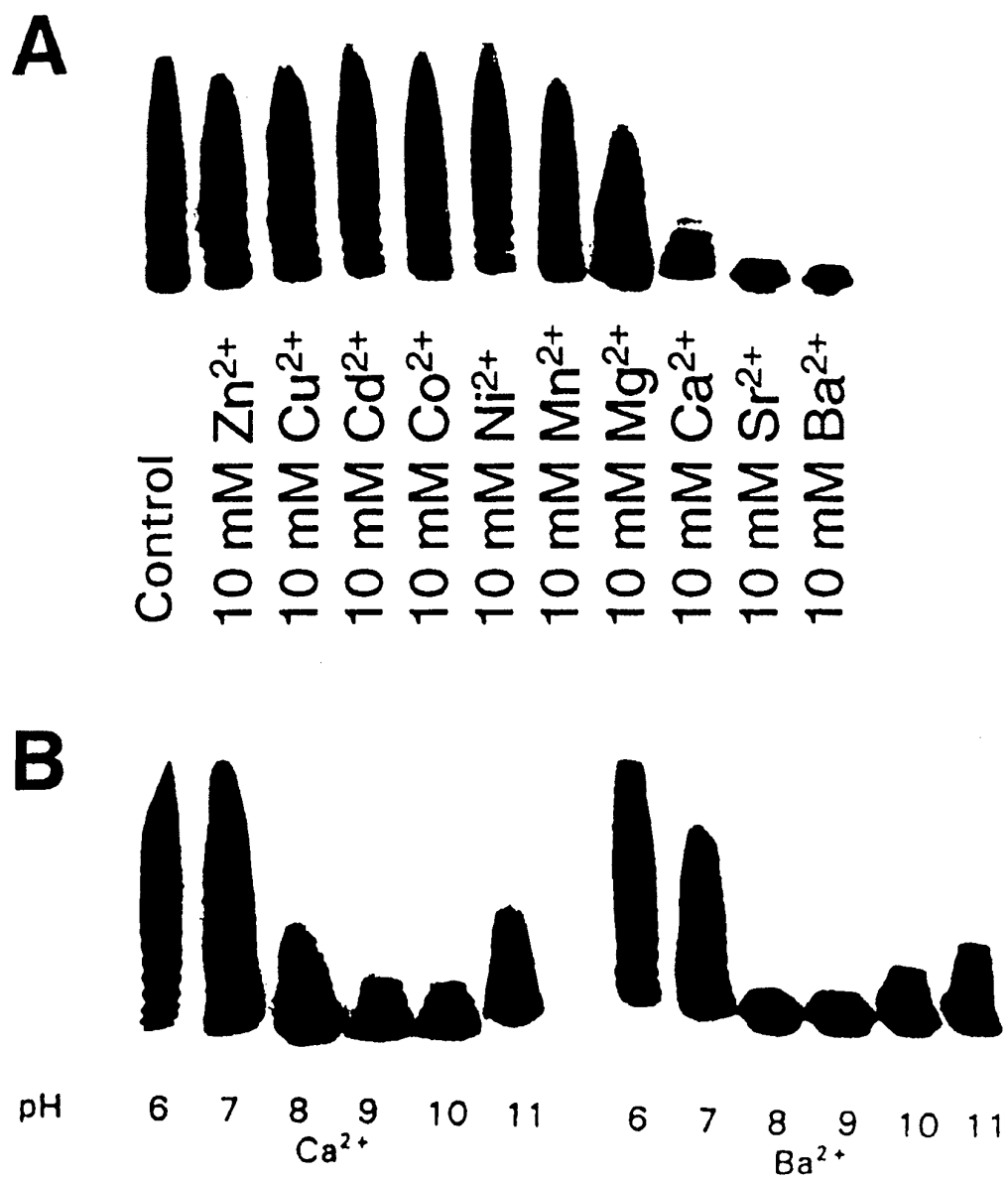
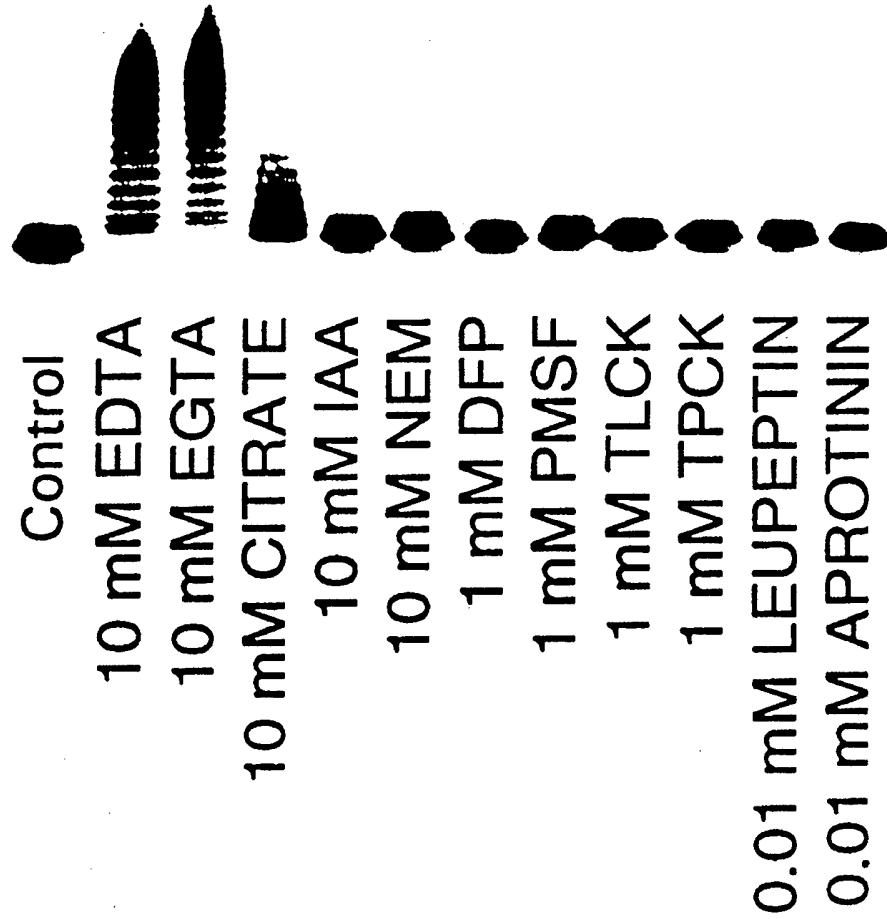


FIG. 9

A



B

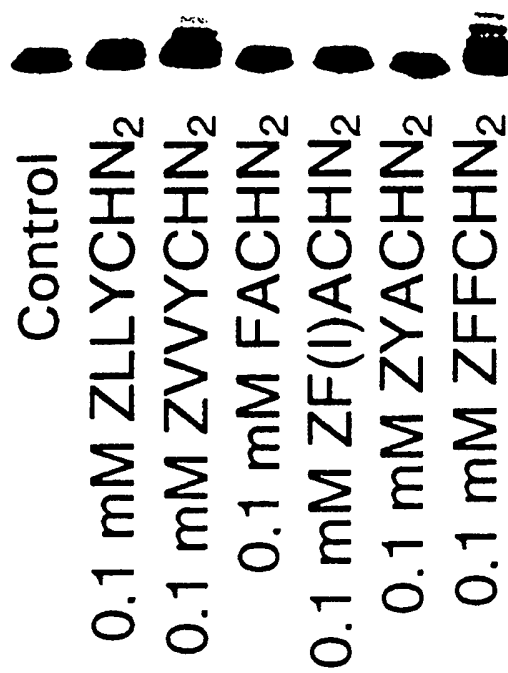


FIG. 10

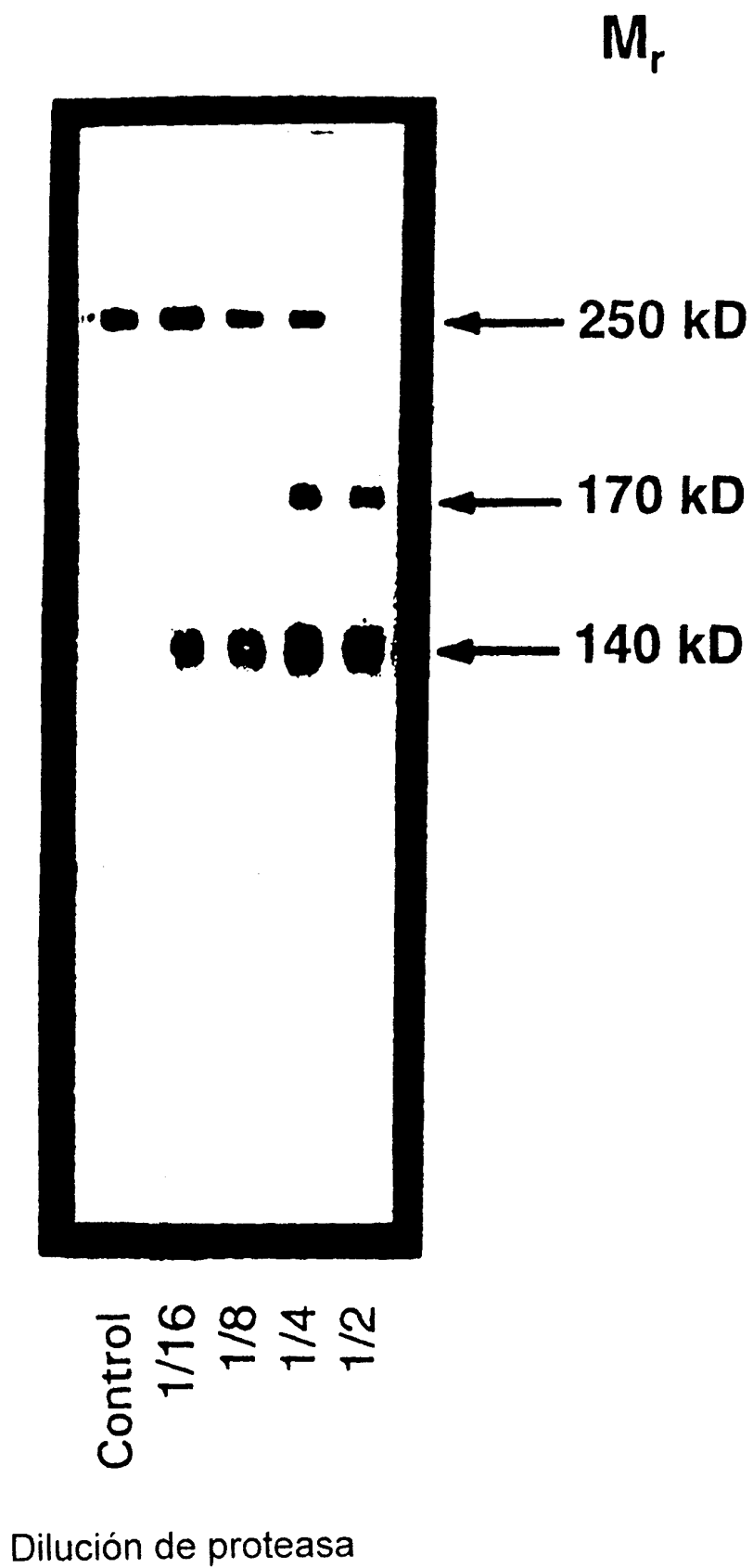


FIG. 11



FIG. 12
Degradación de rvWF

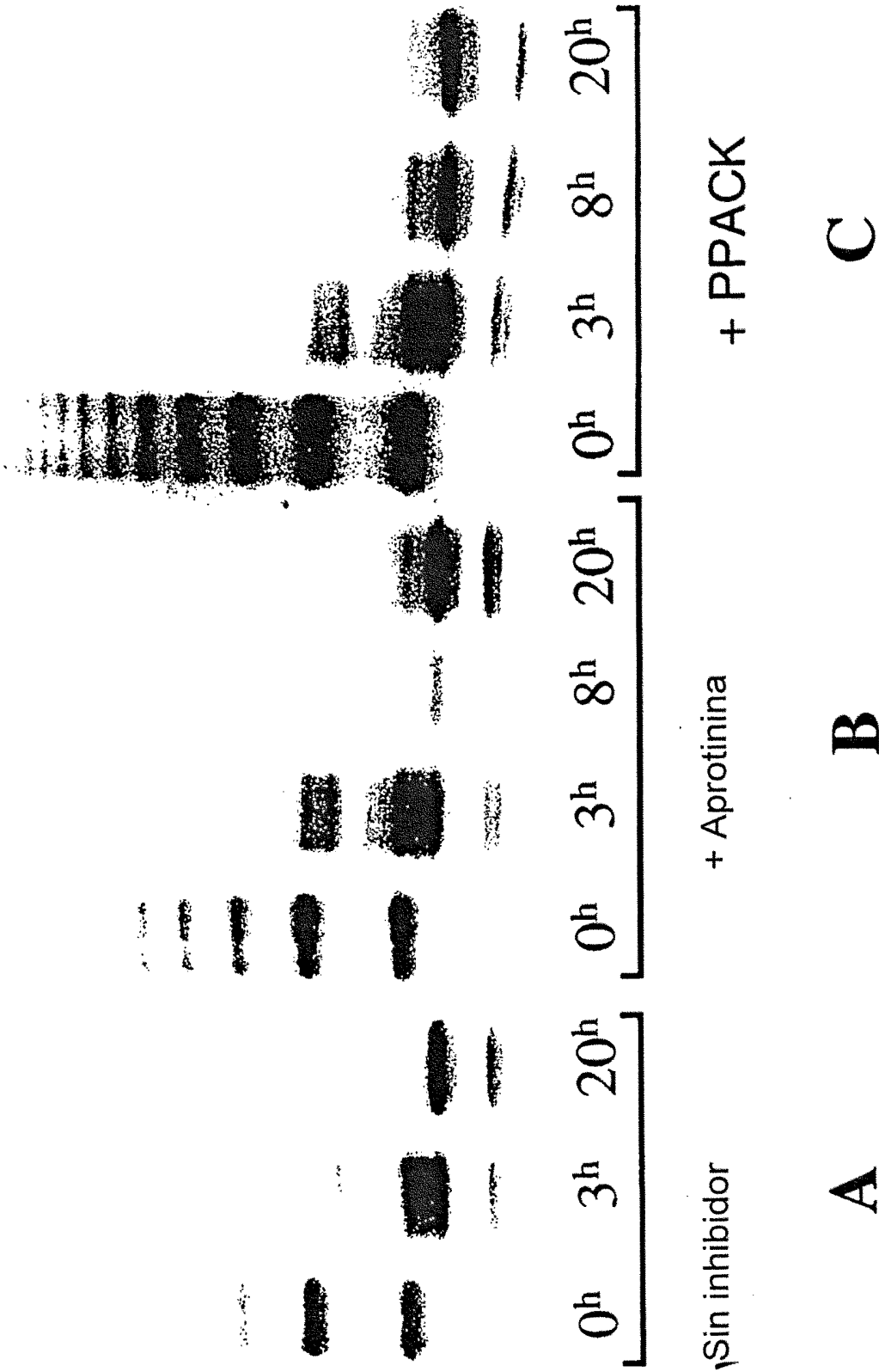


FIG. 13

Degradación de rvWF del crioprecipitado

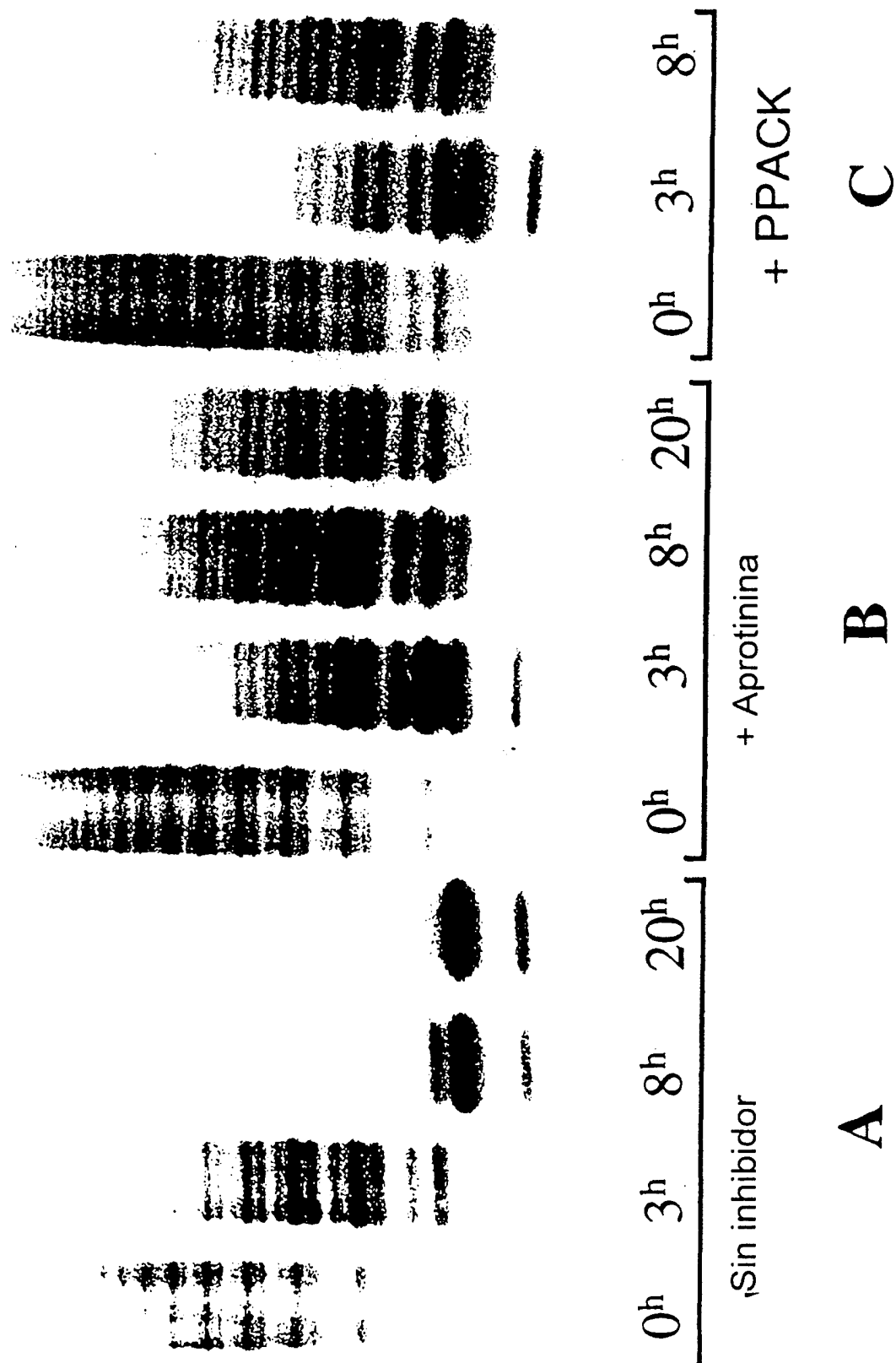


FIG. 14

Degradación de vWF-multímeros grandes y rvWF

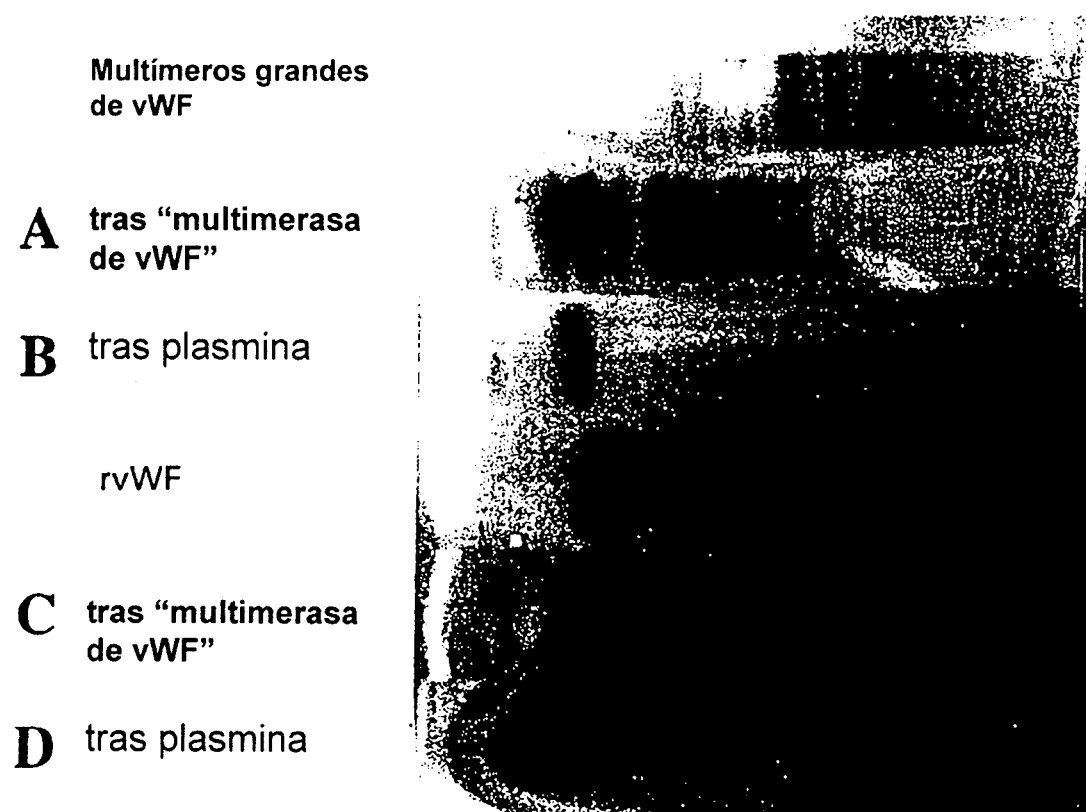


FIG. 15

Degradación de rvWF con Plasmina (cinética)

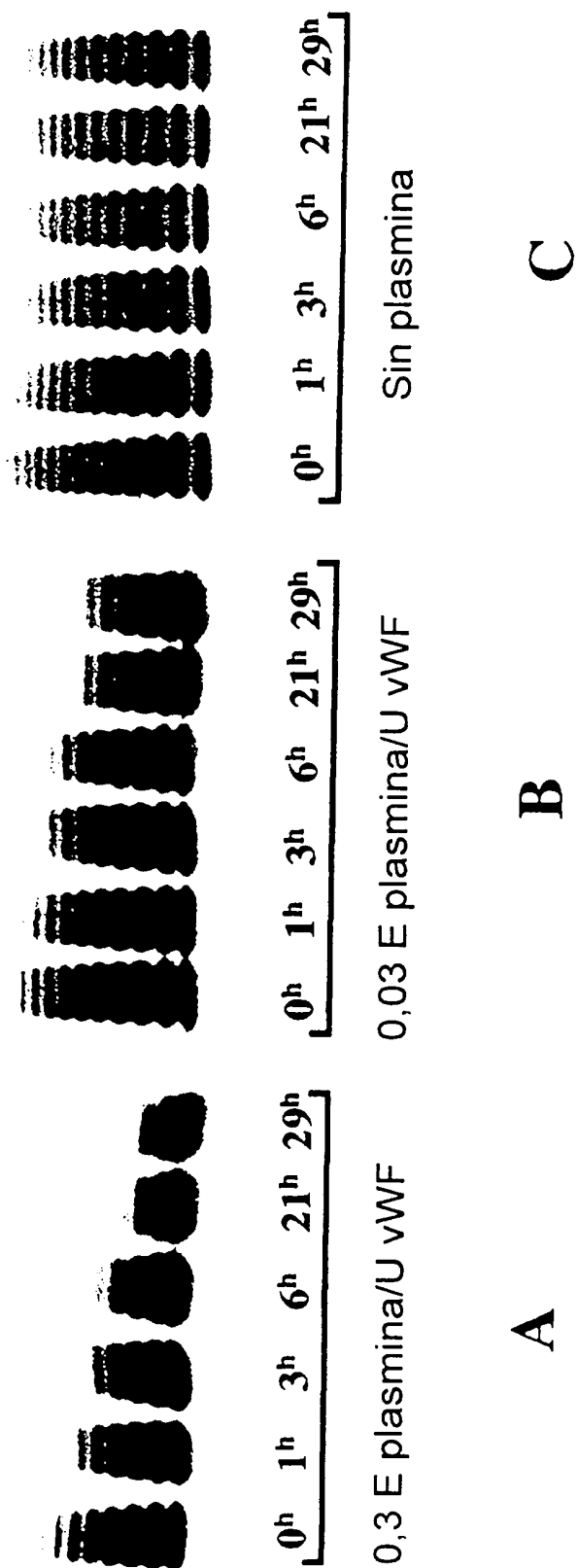


FIG. 16

Degradación de rvWF con Plasmina ± Inhibidores

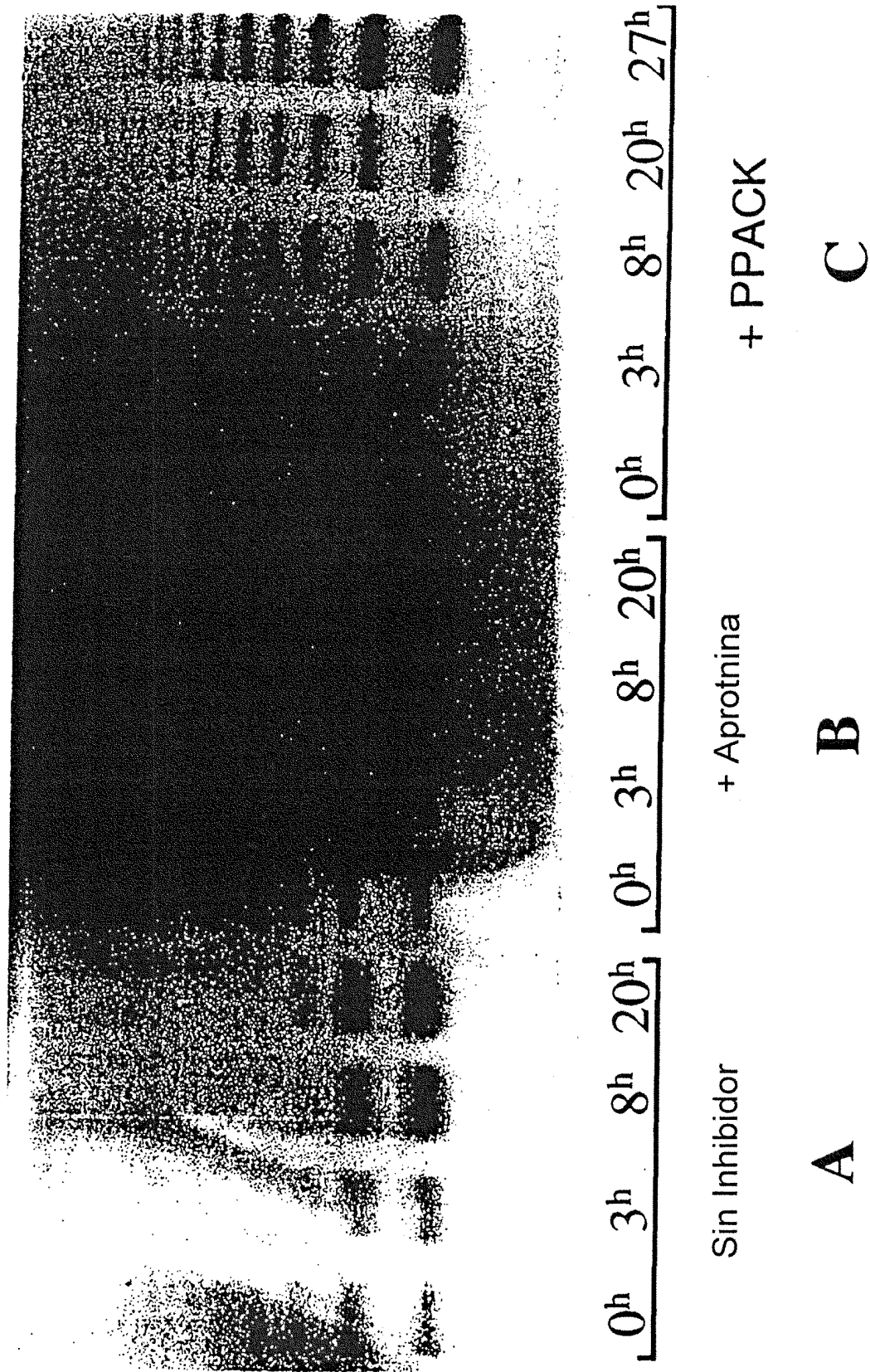


FIG. 17
Degradación de vWF de crioprecipitado con Plasmina

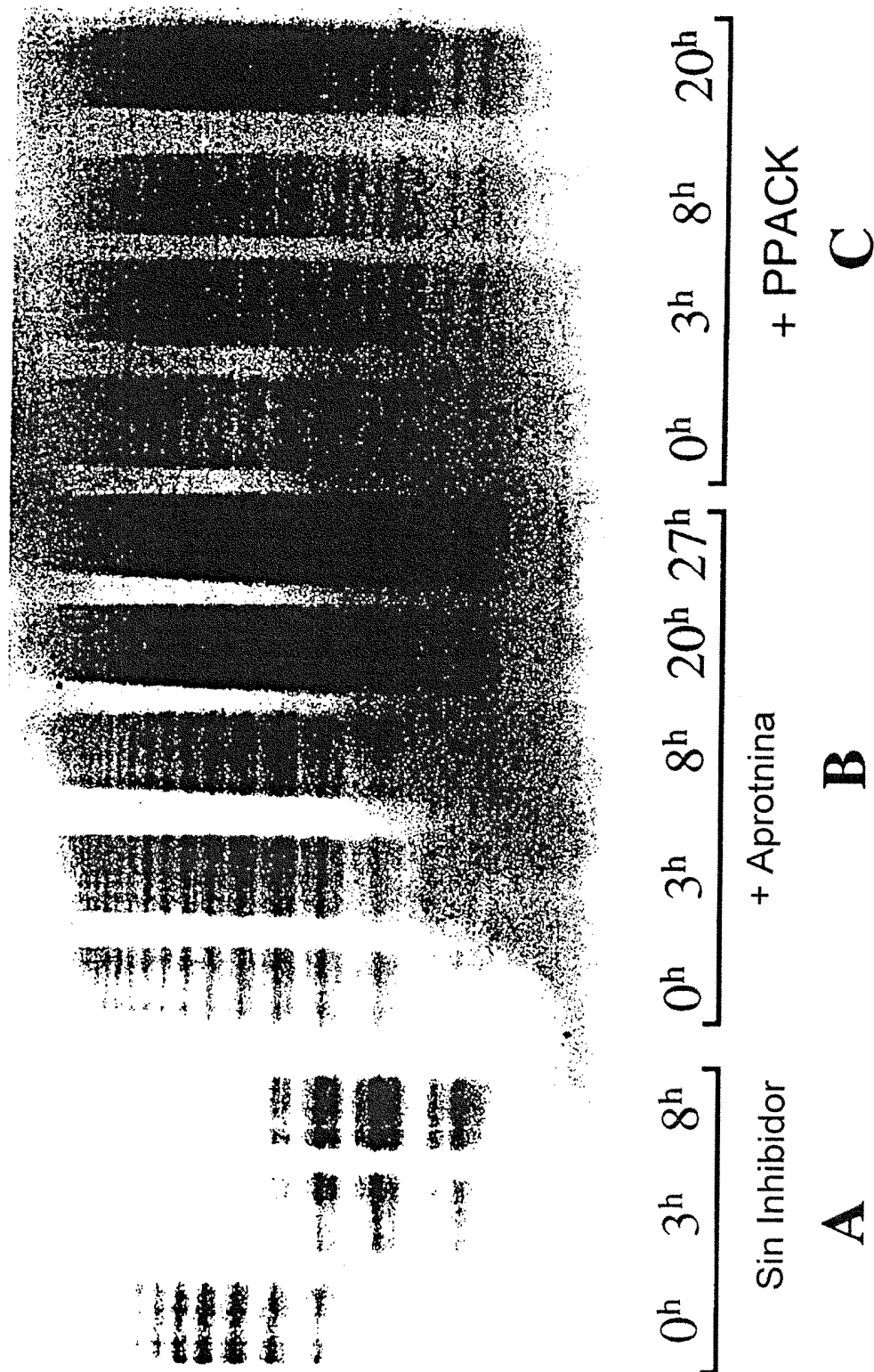


FIG. 18

Incubación de rvWF en plasma humano deficiente en vWF

