



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 122**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05784035 .7**

96 Fecha de presentación : **09.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1817338**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Preparación de un preparado de factor de von Willenbrand con elevada actividad específica.**

30 Prioridad: **14.09.2004 DE 10 2004 044 421**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2011**

73 Titular/es: **BIOTEST AG.**  
**Landsteinerstrasse 5**  
**D-63303 Dreieich, DE**

72 Inventor/es: **Kretschmar, Michael y**  
**Möller, Wolfgang**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 122 T3

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

Preparación de un preparado de factor de von Willenbrand con elevada actividad específica

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un preparado de factor de von Willenbrand con actividad específica del FVW incrementada, en el que se utiliza hidroxilapatita como medio cromatográfico.

- 5 El factor de von Willenbrand es una glucoproteína que se sintetiza en las células endoteliales y megacariocitos. El peso molecular del monómero asciende a aproximadamente 225.000 Da. Mediante la formación de puentes disulfuro se forman en la célula dímeros que de nuevo se asocian formando oligómeros de hasta 40 subunidades dímeras igualmente a través de enlaces disulfuro. La concentración del factor de von Willebrand (FVW) suministrado al plasma asciende a 5-10 mg/l.
- 10 En la hemostasia primaria el FVW tiene la función de mediar la adhesión de los trombocitos al subendotelio lesionado y auxiliar en condiciones de fuerzas de corte elevadas, como en el sistema arterial, la agregación de trombocitos. Como función en la hemostasia secundaria el FVW se une al factor VIII, un importante cofactor en la coagulación sanguínea, en un complejo no covalente. El factor VIII se estabiliza de este modo y se protege de la degradación prematura.
- 15 El síndrome de von Willebrand (SVW) es una enfermedad sanguínea que es causada por variación cualitativa o cuantitativa del FVW. Frecuentemente para el tratamiento de formas graves del SVW se utilizan preparados plasmáticos del factor VIII que contienen una proporción relativamente alta de FVW. De este modo pueden ciertamente cortarse hemorragias, pero simultáneamente aumenta, en especial con una aplicación frecuente o prolongada, el riesgo de trombosis. Esto puede atribuirse a una sobredosificación de factor VIII. Es esencialmente adecuado en el sentido de la seguridad de los pacientes la terapia de enfermos de SVW con concentrados de FVW de alta pureza
- 20 pobres en / libres de factor VIII.
- Un problema frecuente en la preparación de un preparado de FVW es la pérdida de actividad específica del FVW. Según la definición anteriormente mencionada a una concentración de FVW de 5-10 µg/l en sangre y una actividad definida de en promedio 1 E/ml, la actividad específica del FVW asciende a 100 - 200 E por mg de antígeno de FVW. Por regla general la actividad específica del FVW cae drásticamente durante el primer paso del procesamiento en la
- 25 preparación de preparados de FVW. Esta pérdida de actividad específica se correlaciona estructuralmente con reacciones de degradación proteolíticas que conducen a la reducción de la proporción de moléculas de FVW macromoleculares (multímeros) y a la elevación de la proporción de moléculas de FVW de bajo peso molecular (dímeros / tetrameros).
- 30 En la literatura se describen distintos procedimientos que buscan una elevación de la actividad específica del FVW para contrarrestar esta problemática.
- El documento WO 98/38219 describe un procedimiento para la obtención de FVW en el que el FVW se une a un intercambiador catiónico a una baja concentración salina y mediante elución fraccionada se obtiene FVW de elevada actividad específica.
- 35 El documento WO 96/10584 describe un procedimiento para la obtención de FVW recombinante de alta pureza mediante cromatografía de afinidad de intercambio aniónico/heparina y el documento EP 0 705 846 la separación de fracciones de alto y bajo peso molecular de FVW recombinante mediante cromatografía de afinidad de heparina.
- La publicación de A.B. Federici, Haematologica (Junio 2003), 88, nº 6, 3-12 describe composiciones que contienen FVW. El documento US 5,128,254 da a conocer la purificación cromatográfica de componentes de megacariocitos o plaquetas como el factor de von Willebrand.
- 40 La publicación de Gorman y Ekert (1978), Thrombosis Research 12, 341-352 describe estudios sobre la estructura y la síntesis de factor antihemófilo humano. A este respecto el factor antihemofílico humano se purificó mediante cromatografía con hidroxilapatita que siguió a una precipitación de plasma y a una filtración en gel. La actividad coagulante del factor VIII y la actividad del FVW eluyeron simultáneamente.
- 45 La publicación de Saundry y col. (1987), Thrombosis Research 48, 641-652 da a conocer la purificación cromatográfica de ag:FVW usando dextrano-sulfato (DS) agarosa.
- Barington y Kaersgaard (1999), Vox Sanguinis 76, 85-89 describen estudios para proporcionar factor de von Willenbrand de alta pureza que contenga multímeros de alto peso molecular.
- Burnouf-Radosevich y Burnouf (1992), Vox Sanguinis 62, 1-11 describen estudios para el procesamiento cromatográfico de un concentrado de factor de von Willenbrand purificado a partir de un crioprecipitado humano.

Los procedimientos descritos hasta ahora adolecen de inconvenientes en lo que respecta a rentabilidad y efectividad de purificación. En el uso de una cromatografía de afinidad de heparina para aumentar la actividad específica del FVW se aumentó por ejemplo la actividad de una disolución de proteínas purificada previamente que contenía el FVW recombinante de 4,3 E por mg de antígeno de FVW a 7,3 E/mg. La actividad específica final del FVW de la proteína recombinante es baja. Los costes de una cromatografía de afinidad son comparativamente altos. Se consiguieron mejores resultados aplicando una cromatografía de intercambio catiónico. En la purificación de un anticuerpo recombinante se consiguió en combinación con cromatografía de intercambio aniónico y de inmutofinidad preconnectada una actividad específica del FVW de 30,4 E/mg. En el ejemplo de la purificación de un FVW plasmático mediante la combinación de cromatografía de intercambio catiónico e intercambio aniónico se alcanzó una pureza lograda de 65 E/mg de proteína. No se abordó el incremento de la actividad específica del FVW (actividad por cantidad de antígeno de FVW).

Existe la necesidad de un procedimiento rentable con el que puedan empobrecerse moléculas de FVW poco activas de una fracción de proteína para aumentar así la actividad específica. A este respecto debe alcanzarse una actividad específica del FVW que corresponda a la del hombre sano en el plasma. Conforme a la invención este objetivo se consigue mediante un paso de separación cromatográfico usando hidroxilapatita.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de FVW con elevada actividad de FVW con baja actividad, que comprende una cromatografía con hidroxilapatita como matriz cromatográfica, con la que se obtiene una preparación de VWF con elevada actividad que presenta una actividad específica del FVW de al menos 50 E/mg de antígeno de FVW. Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la preparación de una composición con una actividad específica del FVW de al menos 50 E/mg de antígeno de FVW, caracterizado porque se purifica una composición que contiene FVW mediante cromatografía con hidroxilapatita, en la que el FVW se une a la matriz de la columna de hidroxilapatita, el FVW con baja actividad específica se expulsa por lavado y a continuación se eluye el FVW de elevada actividad específica con mayor concentración salina, conteniendo el tampón de lavado 100-300 mM, preferiblemente 200-300 mM, y el tampón de elución 200-500 mM, preferiblemente 300-400 mM, de fosfato sódico o potásico.

La hidroxilapatita es una forma de fosfato cálcico con la composición  $Ca_5(PO_4)_3OH$  ó  $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$  que puede utilizarse como fase estacionaria para la cromatografía de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Además de la forma cristalina también puede utilizarse una forma cerámica que puede obtenerse por sinterización. La hidroxilapatita puede adquirirse por ejemplo en la firma Bio-Rad (Munich, Alemania). Su hidroxilapatita cerámica se proporciona en dos formas (tipo 1 y tipo 2). El material de tipo 1 tiene debido a su mayor superficie una mayor capacidad de unión para moléculas más pequeñas, p.ej. proteínas pequeñas. Por el contrario el material de tipo 2 presenta mayores poros en las partículas que hacen posible una penetración y con ello una mejor unión de moléculas grandes. p.ej. ADN o proteínas grandes. Los materiales presentan preferiblemente las siguientes propiedades:

Tabla 1

	Capacidad de unión dinámica	Diámetro de poro nominal
Tipo 1	> 13,7 mg de lisozima/ml de CHT*	600-800 A
Tipo 2	> 6,8 mg de lisozima/ml de CHT*	800-1000 A
*CHT = Hidroxi Apatita Cerámica		

La hidroxilapatita cristalina o cerámica está disponible libremente. Son conocidos procedimientos para su preparación en el estado de la técnica. En el marco de la presente invención es preferido el uso de hidroxilapatita cerámica.

La hidroxilapatita, en especial en su forma estabilizada cerámicamente es extraordinariamente bien adecuada para llevar a cabo procesos a escala industrial. Debido a sus propiedades de separación, la hidroxilapatita ofrece una mejor resolución que los medios cromatográficos de intercambio iónico descritos repetidamente. En los procedimientos de purificación con hidroxilapatita no deben añadirse a los tampones ni calcio ni aminoácidos.

El procedimiento puede llevarse a cabo en forma de una cromatografía en columna o en procedimiento discontinuo; es preferida la realización de una cromatografía en columna.

Habitualmente el procedimiento comprende que

(a) se une el FVW a la matriz de hidroxilapatita

(b) se expulsa por lavado el FVW de baja actividad específica del FVW a concentración salina media, y

(c) a continuación se eluye el FVW de elevada actividad específica del FVW a mayor concentración salina.

5 En el paso (a) se pone en contacto una disolución que contiene FVW de alta y baja actividad específica del FVW con la matriz de hidroxilapatita. La concentración total de fosfato sódico y/o potásico en esta disolución es habitualmente de 0 a 200 mM, preferiblemente de 1 a 100 mM, más preferiblemente de 1 a 50 mM, lo más preferiblemente de 10 a 30 mM.

10 En el paso de lavado (b) se lava la matriz de hidroxilapatita con un tampón de concentración salina media. La concentración total de fosfato sódico y/o potásico en este tampón de lavado es por regla general de 100 a 300 mM, preferiblemente de 200 a 300 mM, más preferiblemente de 200 a 270 mM, lo más preferiblemente de 210 a 250 mM. A este respecto el FVW de baja actividad específica del FVW se expulsa por lavado. Cuanto más alto sea el valor del pH del tampón, tanto más baja puede seleccionarse la concentración salina.

15 En el paso (c) puede eluirse FVW de alta actividad específica del FVW con un tampón de concentración salina más elevada. El tampón de elución contiene por regla general de 200 a 500 mM, preferiblemente de 250 a 500 mM, más preferiblemente de 300 a 400 mM, de fosfato sódico y/o potásico.

20 Mediante el desplazamiento de las concentraciones salinas pueden modificarse el rendimiento y la pureza. Cuanto más alta sea la concentración salina del tampón de lavado, tanto más activa es la fracción de valor obtenida. Sin embargo el rendimiento se reduce de este modo. Además el valor del pH seleccionado influye en la concentración salina óptima para el tampón de lavado. Cuanto más bajo es el valor del pH tanto más fuerte es la unión del FVW a la matriz de hidroxilapatita. Correspondientemente las concentraciones salinas pueden ser más elevadas a valores del pH bajos, a valores del pH más elevados por el contrario más bajas.

25 La cromatografía con hidroxilapatita se lleva a cabo a un valor del pH de 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,8, más preferiblemente de 6,0 a 6,8, lo más preferiblemente de 6,2 a 6,5. Habitualmente el tampón de desarrollo, lavado y elución, así como la disolución de proteínas a aplicar, tienen el mismo valor del pH. Pero también son practicables variantes en las que estas disoluciones presenten distintos valores del pH.

30 Según las condiciones del valor del pH y las aspiraciones de rendimiento pueden eluirse de columnas de hidroxilapatita moléculas de FVW poco activas con tampones que contienen una concentración salina media. A pH 6,0 pueden utilizarse por ejemplo tampones que contengan de 200 a 270 mM de fosfato sódico o potásico, preferiblemente de 220 a 250 mM de fosfato sódico. A pH 6,5 serían adecuados por ejemplo tampones que contengan de 180 a 260 mM, preferiblemente de 210 a 250 mM, de fosfato sódico o potásico. Tras la separación de las moléculas de FVW poco activas pueden eluirse las moléculas de FVW muy activas con un tampón de alta salinidad, por ejemplo de 250 a 500 mM de fosfato sódico o potásico, preferiblemente de 300 a 400 mM de fosfato sódico o potásico.

35 La cromatografía de unión a hidroxilapatita conforme a la invención puede combinarse con otras técnicas de purificación. Ha mostrado ser especialmente ventajoso llevar a cabo en primer lugar una "cromatografía de paso" con hidroxilapatita para el empobrecimiento de impurezas principales. A continuación la fracción de paso se aplica a una columna de hidroxilapatita como se ha descrito anteriormente. Las moléculas de FVW se unen y el FVW con actividad específica del FVW elevada se eluye selectivamente.

40 En una forma de realización especial se lleva a cabo por consiguiente en primer lugar una cromatografía de paso con hidroxilapatita en la que el FVW no se une a la matriz de hidroxilapatita y a continuación la fracción de paso se recromatografía en condiciones de unión y se eluye la fracción de FVW con actividad específica del FVW elevada.

45 Una "cromatografía de paso" en el sentido de esta solicitud comprende que (i) se pone en contacto una composición que contiene FVW y una o varias proteínas impurificantes con una matriz de hidroxilapatita, de modo que al menos una proteína impurificante se une a la matriz de hidroxilapatita, mientras que el FVW substancialmente no se une a la matriz de hidroxilapatita, y dado el caso a continuación (ii) se separa el FVW no unido de la matriz de hidroxilapatita. En el caso de una cromatografía de columna se encuentra FVW en el paso y al menos una proteína impurificante, p.ej. fibronectina y/o fibrinógeno, se une a la matriz de hidroxilapatita.

50 La cromatografía de paso se lleva a cabo a un valor del pH de 6,5 a 8,5, preferiblemente de 6,8 a 8,5, más preferiblemente de 6,8 a 7,5, lo más preferiblemente de 7,0 a 7,5. Habitualmente el tampón de desarrollo, lavado y elución, así como la disolución de proteínas a aplicar tienen el mismo valor del pH. Pero son posibles también variantes en las que estas soluciones presenten distintos valores del pH.

5 La composición que contiene FVW que se pone en contacto en la cromatografía de paso con la matriz de hidroxilapatita contiene preferiblemente fosfato sódico y/o fosfato potásico. La concentración total de fosfato sódico y/o fosfato potásico en la disolución es por ejemplo de 0 a 100 mM, preferiblemente de 10 a 50 mM, lo más preferiblemente de 20 a 40 mM, es decir como tampón de desarrollo puede utilizarse una solución tampón con las concentraciones indicadas.

10 Mediante el paso preconectado de la cromatografía de paso pueden obtenerse preparaciones de FVW que solo contienen pequeñas cantidades de fibrinógeno y fibronectina. Por regla general la concentración de antígeno de fibrinógeno en la cromatografía de paso es inferior a 25 µg/ml, preferiblemente inferior a 15 µg/ml, más preferiblemente inferior a 10 µg/ml, lo más preferiblemente de 5 µg/ml como máximo. La concentración de antígeno de fibronectina en la cromatografía de paso es inferior a 250 µg/ml, preferiblemente inferior a 150 µg/ml, más preferiblemente inferior a 100 µg/ml, lo más preferiblemente de 50 µg/ml como máximo. La concentración de antígeno de fibrinógeno y antígeno de fibronectina puede determinarse por procedimientos conocidos de por sí.

15 Mediante el paso preconectado de la cromatografía de paso puede conseguirse un empobrecimiento considerable de las proteínas impurificantes fibrinógeno y fibronectina. Así, la concentración de fibrinógeno en la fracción de paso es preferiblemente inferior al 10%, más preferiblemente inferior al 5%, todavía más preferiblemente inferior al 2,5%, de la concentración de fibrinógeno en la solución de aplicación (antes de la cromatografía de paso). La concentración de fibronectina en la fracción de paso es preferiblemente inferior al 10%, más preferiblemente inferior al 5%, todavía más preferiblemente inferior al 2,5%, de la concentración de fibronectina en la solución de aplicación (antes de la cromatografía de paso).

20 El rendimiento de la cromatografía de paso (referido al balance de masas) es por regla general superior al 50%, preferiblemente superior al 60%, lo más preferiblemente superior al 75%. Para la cromatografía de paso es conveniente pero no necesario utilizar iones fosfato como sustancia tampón. Para la elución de FVW en la cromatografía de unión el fosfato es un agente específico.

25 Como materiales de partida pueden utilizarse soluciones genéricas que contienen FVW, en particular fracciones plasmáticas que contienen FVW. El FVW puede unirse a una columna de hidroxilapatita a valores del pH de preferiblemente 6,0 a 6,8, con especial preferencia de 6,2 a 6,5, a una baja concentración salina de 0-100 mM de fosfato potásico o sódico, preferiblemente a 10-50 mM.

30 En una forma de realización especial puede utilizarse en lugar de hidroxilapatita pura como matriz cromatográfica fluoroapatita. La fluoroapatita se prepara por reacción de hidroxilapatita con una sustancia que contenga flúor. La firma Bio-Rad (Múnich, Alemania) produce p.ej. fluoroapatita cerámica mediante una reacción al 90% de hidroxilapatita cerámica con un reactivo fluorado. La fluoroapatita en comparación con la hidroxilapatita es claramente más estable en condiciones de valor del pH ácidas. Por consiguiente se utiliza habitualmente fluoroapatita para llevar a cabo cromatografías a pH más bajos que los que son técnicamente convenientes para la hidroxilapatita. Para una purificación de moléculas de FVW de elevada actividad con fluoroapatita, la cromatografía puede llevarse a cabo de forma similar al procedimiento propuesto para la hidroxilapatita. Las concentraciones salinas deben adaptarse al valor del pH seleccionado ( $\geq 5,0$ ).

35 El procedimiento conforme a la invención puede comprender además uno o varios de los siguientes pasos:

- (1) congelación brusca a una temperatura inferior a -30°C y descongelación próxima a 0°C (crioprecipitación)
- (2) precipitación con etanol o adsorción en hidróxido de aluminio
- 40 (3) inactivación de virus de la composición que contiene FVW mediante tratamiento con disolvente/detergente
- (4) cromatografía de intercambio aniónico
- (5) precipitación de fibronectina mediante ajuste de un valor del pH inferior a pH 5,4
- (6) cromatografía de afinidad
- (7) diafiltración o ultrafiltración
- 45 (8) cambio de tampón por diálisis o filtración en gel
- (9) esterilización por filtración
- (10) liofilización

(11) inactivación de virus por tratamiento térmico (p.ej. aprox. 30 min a aprox. 100°C)

Los pasos de procedimiento (1) a (5) se llevan a cabo preferiblemente antes de la cromatografía con hidroxilapatita. Pero también pueden realizarse menos de los 5 pasos de procedimiento. La secuencia de los pasos no es forzosa.

5 Los pasos (6) a (11) pueden llevarse a cabo en caso de que se desee. En especial la cromatografía de afinidad no es necesaria, pues ya mediante la cromatografía con hidroxilapatita puede conseguirse una elevada pureza.

10 Como material de partida para los procedimientos de la presente invención puede utilizarse por consiguiente una fracción plasmática prepurificada. A este respecto puede tratarse de una disolución de crioprecipitado purificada adicionalmente. Así, la disolución de crioprecipitado puede por ejemplo precipitarse con hidróxido de aluminio y purificarse a continuación adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. Es igualmente preferido que la disolución de crioprecipitado se someta a una inactivación de virus. El procedimiento preferido para la inactivación de virus es un tratamiento con disolvente/detergente, como está descrito en la patente de EEUU nº 4,540,573.

15 Como material de partida puede utilizarse igualmente una disolución de proteínas que contenga FVW recombinante (FVWr) de sobrenadantes de cultivo celular. El término "FVWr" comprende tanto FVW con la secuencia natural como también variantes con una secuencia de aminoácidos modificada con respecto a la del FVW natural en la que pueden estar substituidos, eliminados y/o añadidos uno o varios aminoácidos. Las variantes presentan por regla general actividad de FVW. Son conocidas para el técnico en la materia (Fischer y col. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero and homo-dimers. FEBS Lett 1994; 351:345-348. Fischer y col. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor produced at industrial scale fermentation of transformed CHO cells co-expressing recombinant furin. FEBS Lett 1995; 375.259-262) procedimientos para la preparación de vectores de expresión adecuados para la inclusión de los vectores en las células huésped y para el cultivo de las células huésped.

20 En especial en el uso de fracciones plasmáticas puede llevarse a cabo antes de la cromatografía con hidroxilapatita una precipitación por pH para la separación de fibronectina. La precipitación por pH para la separación de fibronectina de una fracción plasmática comprende por ejemplo que

(i) se ajuste el valor del pH de la fracción plasmática por debajo de pH 5,4 de modo que se forme un precipitado y

(II) se separe el precipitado formado.

30 El término "fracción plasmática" designa en este contexto una composición que se ha obtenido de plasma y que contiene distintas proteínas del plasma. La fracción plasmática que se utiliza como composición de partida en el paso (i) es una composición líquida. Preferiblemente la composición líquida es una solución o una suspensión, lo más preferiblemente la composición es una solución. En una forma de realización especial la fracción plasmática es un crioprecipitado disuelto. Este crioprecipitado disuelto puede purificarse previamente por distintos procedimientos. Son ejemplos el tratamiento con hidróxido de aluminio, el tratamiento con disolvente/detergente y/o la cromatografía de intercambio aniónico. La concentración de cloruro sódico o cloruro potásico en la fracción plasmática es preferiblemente de 50 a 250 mM, más preferiblemente de 100 a 200 mM, lo más preferiblemente de 120 a 150 mM. La fracción plasmática puede contener por ejemplo las siguientes sustancias también: iones citrato, iones acetato, iones fosfato y/o aminoácidos.

40 La concentración de fibronectina en la fracción plasmática que se somete al paso (i) es por regla general de al menos 0,05 g/l, preferiblemente de por lo menos 0,1 g/l, todavía más preferiblemente de por lo menos 0,25 g/l, lo más preferiblemente de por lo menos 0,5 g/l. La concentración de fibronectina en la fracción plasmática puede ser por ejemplo de 0,1 a 5 g/l, preferiblemente de 0,1 a 2 g/l.

45 Para la separación de fibronectina de la fracción plasmática el valor del pH de la fracción plasmática se ajusta por debajo de pH 5,4. De este modo se forma un precipitado que contiene fibronectina. Preferiblemente el valor del pH se ajusta por debajo de pH 5,3, todavía más preferiblemente por debajo de pH 5,2. El valor del pH ajustado se encuentra por consiguiente preferiblemente en un intervalo de pH 4,5 a 5,4, preferiblemente en un intervalo de pH de 4,7 a 5,3, más preferiblemente en un intervalo de pH de 4,8 a 5,2, todavía más preferiblemente en un intervalo de pH de 4,9 a 5,1. Por regla general el ajuste del valor del pH se alcanza por adición de un componente ácido. Como componente ácido pueden utilizarse distintos ácidos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido acético. El componente ácido se añade habitualmente durante un determinado periodo de tiempo, por ejemplo a 50 gotas. Con ello se ajusta ("titula") poco a poco un valor del pH en el intervalo anteriormente indicado.

Durante y después del ajuste del valor del pH la fracción plasmática preferiblemente se mantiene en movimiento o se entremezcla, por ejemplo mediante agitación. Es preferido además que después del ajuste del valor del pH la

fracción plasmática se entremezcle adicionalmente durante un periodo de tiempo determinado (p.ej. mediante agitación), en general durante por lo menos 10 minutos, preferiblemente durante por lo menos 20 minutos, lo más preferiblemente durante un periodo de tiempo de 30 a 90 minutos. En este periodo de tiempo se forman agregados pegajosos que contienen una proporción considerable de fibronectina. Por consiguiente está previsto conforme a una forma de realización preferida que se utilice un agitador adecuado, p.ej. un agitador de rotor o paleta, en cuya paleta de agitación se adhiere el precipitado. La fibronectina precipitada puede por consiguiente separarse fácilmente de la disolución.

La precipitación por pH para la separación de fibronectina puede llevarse a cabo en un amplio intervalo de temperaturas, p.ej. de aprox. 1°C a aprox. 37°C. Son intervalos de temperaturas preferidos de 4 a 35°C, más preferiblemente de 10 a 30°C, lo más preferiblemente el procedimiento se lleva a cabo a 20 a 25°C.

Mediante la precipitación por pH para la separación de fibronectina de las fracciones plasmáticas, puede reducirse la concentración de fibronectina en la fracción plasmática en por lo menos un 50%. Preferiblemente la concentración de fibronectina en la fracción plasmática se reduce en un 70 a 99%, más preferiblemente en un 80 a 99%, lo más preferiblemente en un 90 a 98% o en un 95 a 98%. En una forma de realización especial la pérdida de FVW en el paso de precipitación se encuentra como máximo en un 50%, preferiblemente como máximo en un 40%, más preferiblemente como máximo en un 30%, todavía más preferiblemente como máximo en un 20%, lo más preferiblemente como máximo en un 10%.

Se describe además una composición que contiene FVW que puede obtenerse mediante un procedimiento conforme a la invención como el descrito en la presente solicitud. Preferiblemente se trata de una preparación de FVW substancialmente pura. "Substancialmente pura" significa que la composición está substancialmente libre de otras proteínas, en especial que no es detectable fibronectina ni fibrinógeno alguno.

La preparación de FVW puede presentar una actividad específica de por lo menos 75 E/mg de proteína, preferiblemente tiene una actividad específica de por lo menos 85 E/mg de proteína, más preferiblemente de por lo menos 100 E/mg de proteína, lo más preferiblemente de por lo menos 120 E/mg de proteína. Mediante el procedimiento conforme a la invención pueden conseguirse por consiguiente actividades específicas de > 100 E por mg de proteína. La actividad del FVW puede determinarse como se describe en los ejemplos. Mediante la cromatografía con hidroxilapatita conforme a la invención la actividad específica (E/mg de proteína) puede incrementarse en al menos un 100%, preferiblemente en al menos un 150%, lo más preferiblemente en al menos un 175%.

La composición conforme a la invención tiene preferiblemente una actividad específica del FVW de por lo menos 50 E/mg de antígeno de FVW, más preferiblemente de por lo menos 75 E/mg de antígeno de FVW, todavía más preferiblemente de por lo menos 100 E/mg de antígeno de FVW, todavía más preferiblemente de por lo menos 120 E/mg de antígeno de FVW, todavía más preferiblemente de por lo menos 125 E/mg de antígeno de FVW, lo más preferiblemente de por lo menos 150 E/mg de antígeno de FVW. Mediante la cromatografía con hidroxilapatita conforme a la invención la actividad específica del FVW (E/mg de antígeno de FVW) puede incrementarse en al menos un 20%, preferiblemente en al menos un 35%, lo más preferiblemente en al menos un 50%.

Otro aspecto de la invención es el uso de hidroxilapatita para la preparación de un preparado de FVW con elevada actividad específica del FVW. La invención se refiere además al uso de hidroxilapatita para la separación de FVW con elevada actividad específica del FVW de FVW con baja actividad específica del FVW. La solicitud describe además el uso de hidroxilapatita para aumentar la actividad específica del FVW de una composición que contenga FVW. Las formas de realización preferidas del uso conforme a la invención corresponden a las del procedimiento conforme a la invención y de la composición conforme a la invención.

Las distintas formas de realización descritas en la presente solicitud pueden combinarse entre sí.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención más detalladamente.

**Ejemplo 1:** Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con hidroxilapatita a escala de laboratorio

La disolución de proteínas que contiene FVW pasó por los siguientes pasos de purificación previa: Se sometió una disolución de crioprecipitado a una precipitación con hidróxido de aluminio. A continuación se llevó a cabo una inactivación de virus mediante tratamiento con disolvente/detergente. En la subsiguiente cromatografía de intercambio aniónico se obtuvo una fracción de lavado que contenía FVW que estaba impurificada sobre todo con fibrinógeno y fibronectina. La disolución de proteínas se sometió por titulación a pH 5,2 a un paso de precipitación en el que se eliminó una gran parte de la fibronectina y el fibrinógeno. A continuación se llevó a cabo una ultra- y diafiltración con la que la disolución de proteínas se concentró aprox. 7 veces y se diafiltró frente al tampón de

desarrollo de la cromatografía siguiente. La disolución de proteínas así obtenida contenía aprox. 930 µg/ml de antígeno de FVW, 270 µg/ml de antígeno de fibrinógeno y 2400 µg/ml de antígeno de fibronectina. La disolución de proteínas se aplicó a una columna de hidroxilapatita (CHT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania) equilibrada con fosfato Na 10 mM pH 7,0. La fracción de paso contenía aprox. 560 µg/ml de antígeno de FVW, 5 µg/ml de antígeno de fibrinógeno y 50 µg/ml de antígeno de fibronectina. El balance de masas da por resultado un rendimiento del paso del 78% para el antígeno de FVW y una actividad del FVW del 73%.

Una disolución de proteínas así prepurificada se tituló a pH 6,0 para la purificación adicional conforme a la invención. A continuación la disolución se aplicó a una columna de hidroxilapatita (CHT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania) que se había equilibrado con tampón de desarrollo (fosfato Na 20 mM pH 6,0). El FVW se unió cuantitativamente. Se llevó a cabo una primera elución con 45% del tampón de elución B (fosfato Na 400 mM pH 6,0), la segunda con 100% de B. La disolución de proteínas aplicada contenía 540 µg/ml de antígeno de FVW, 4 µg/ml de fibrinógeno y 48 µg/ml de fibronectina. La actividad del FVW en esta disolución ascendía a 46 E/ml. La primera fracción de elución contenía 38 µg/ml de antígeno de FVW, 2 µg/ml de antígeno de fibronectina y tenía una actividad del FVW de 0,7 E/ml. La concentración de antígeno de fibrinógeno se encontraba por debajo del límite de detección de 1 µg/ml. La fracción de valor (2ª fracción de elución) presentó una concentración de antígeno de FVW 173 µg/ml y una actividad del FVW de 23 E/ml. No pudo detectarse ni antígeno de fibrinógeno ni antígeno de fibronectina. La actividad residual de moléculas de FVW que se comprobaron que eran especialmente poco activas se separó. El rendimiento de la actividad del FVW se encontraba en el 84%, la del antígeno de FVW en el 51%.

Tabla 2: Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con hidroxilapatita a escala de laboratorio

	Antígeno de FVW [µg/ml]	Actividad del FVW [E/ml]	Actividad específica del FVW [E por mg de antígeno de FVW]
Material de partida de crom. I	560	46	85
Elución 1 crom. II	38	0,7	18
Elución 2 crom. II	173	23	133

La concentración de antígeno de FVW se determinó con ayuda del STA<sup>®</sup> Compact de la firma Diagnostica Stago Roche (Roche Diagnostics, Mannheim) y sus reactivos de ensayo (STA LIA vWF).

La actividad del FVW se determinó como actividad del cofactor de ristocetina sobre la agregación plaquetaria con el analizador BCT<sup>®</sup> (Behring Coagulation Timer, Dade Behring, Schwalbach). El ensayo del cofactor de ristocetina determina la capacidad de unión del FVW a la glucoproteína Ib/IX receptor plaquetario bajo la influencia del antibiótico ristocetina.

**Ejemplo 2:** Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con hidroxilapatita a escala industrial

La disolución de partida se preparó conforme al Ejemplo 1 hasta la primera cromatografía. La disolución de proteínas así preparada contenía aprox. 1,43 mg/ml de antígeno de FVW a una concentración total de proteínas de 3,79 mg/ml. La actividad específica ascendía a 36,4 E/mg de proteína. Para la purificación cromatográfica se utilizaron columnas con un diámetro de 10 cm. La disolución de proteínas se aplicó en un primer paso de purificación cromatográfico a una columna de hidroxilapatita (CHT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania) equilibrada con fosfato Na 10 mM pH 7,0 con un volumen de lecho de gel de 1,0 l. La fracción de paso (fracción de valor 1) contenía aprox. 0,67 mg/ml de antígeno de FVW a una concentración total de proteínas de 0,86 mg/ml. La actividad específica ascendía a 68,7 E/mg de proteína y la actividad específica del FVW a 96,5 E/mg de antígeno de FVW.

Una disolución de proteínas así prepurificada se tituló a pH 6,5 para la purificación adicional y para la separación de moléculas de FVW poco activas. A continuación la disolución se aplicó a una columna de hidroxilapatita (CHT tipo 2, Bio-Rad, Múnich, Alemania) con un volumen de lecho de gel de 1,5 l que se había equilibrado con tampón de desarrollo (fosfato Na 20 mM pH 6,5). El FVW se unió cuantitativamente. Se llevó a cabo una primera elución para la separación de moléculas de FVW poco activas con fosfato Na 220 mM pH 6,5. La fracción de valor 2 con una concentración de proteínas de 0,20 mg/ml y un contenido de antígeno de FVW de 0,13 mg/ml se eluyó a continuación con fosfato Na 300 mM pH 6,5. Mediante este paso cromatográfico pudo incrementarse la actividad

específica del FVW de 87,5 E/mg de antígeno de FVW a 171 E/mg de antígeno de FVW. La actividad específica se incrementó a este respecto a 107 E/mg de proteína. Las impurezas como fibronectina, fibrinógeno o factor VIII se encontraban por debajo del límite de detección.

5 La variación de las actividades específicas del FVW durante el proceso de purificación (véase la Tabla 3) muestra que durante la primera cromatografía este parámetro no se afecta positivamente. El segundo paso cromatográfico conforme a la invención por el contrario es sobresalientemente adecuado para incrementar la actividad específica del FVW, lo que corresponde a una separación de moléculas de FVW poco activas.

Tabla 3: Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con hidroxilapatita a escala industrial

	Antígeno de FVW [mg/ml]	Actividad específica [E por mg de proteína]	Actividad específica del FVW [E por mg de antígeno de FVW]
Partida	1,43	36,4	96,5
Fracción de valor 1	0,67	68,7	87,5
Fracción de valor 2	0,13	107	171

10

El antígeno de FVW y la actividad del FVW se determinaron como se indica en el Ejemplo 1.

La determinación de proteínas se llevó a cabo conforme a la ley de Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ), en la que

A = Absorción a 280 nm

$\epsilon$  = Coeficiente de absorción (aquí coeficiente de absorción teórica de 0,75 cm<sup>2</sup>/mg)

15

c = Concentración de proteínas en mg/ml

d = Espesor de capa en cm

**Ejemplo 3:** Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con fluoroapatita

20

La disolución de partida se preparó conforme al Ejemplo 1 hasta la segunda cromatografía. La disolución de proteínas contenía a una concentración de proteínas de 0,83 mg/l una actividad específica de 64,8 E/mg y una actividad específica del FVW de 95,1 mg/l. Por adición de HCl la disolución de proteínas se tituló a un valor del pH de 6,0. A continuación la disolución se aplicó a una columna de fluoroapatita (CFT tipo 2, Bio-Rad, Múnich, Alemania) con un volumen de lecho de gel de 13,2 ml que se había equilibrado en tampón de desarrollo (fosfato Na 20 mM pH 6,0). Una parte del FVW se unió. Se consiguió una separación de moléculas de FVW poco activas mediante una primera elución con un tampón que contenía fosfato Na 241 mM pH 6,0 (fracción de valor 1). La fracción de valor 2 con una concentración de proteínas de 0,12 mg/ml y un contenido de antígeno de FVW de 0,06 mg/ml se eluyó a continuación con fosfato Na 400 mM pH 6,0. Mediante este paso cromatográfico pudo incrementarse la actividad específica del FVW a 152 E/mg de antígeno de FVW. La actividad específica se incrementó a este respecto a 77 E/mg de proteína. Debido a la unión más débil del FVW en las condiciones de pH seleccionadas no tiene lugar una unión completa del FVW, de modo que se encuentra una parte en la fracción de paso.

30

Tabla 4: Aumento de la actividad específica del FVW de una fracción plasmática que contiene FVW prepurificada mediante cromatografía con fluoroapatita

	Antígeno de FVW [mg/ml]	Actividad específica [E por mg de proteína]	Actividad específica del FVW [E por mg de antígeno de FVW]
Partida	0,57	64,68	95,1
Paso	0,07	47,1	89
Fracción de valor 1	0,06	39,3	71,7

Fracción de valor 2	0,06	77	152
---------------------	------	----	-----

### Citas bibliográficas complementarias

Las siguientes citas bibliográficas relativas a distintos métodos analíticos se indican de manera complementaria

#### Actividad del FVW:

- 5 Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D (1998): Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Lab Res* 28 (4): 201-210.

#### Antígeno de FVW:

- Budde U, y col. (1984): Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 64 (5): 981-985.
- 10 Newmann DJ, Henneberry H, Price CP (1992): Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem* 29 (Pt1): 22-42.

#### Antígeno de fibronectina:

- Sandberg L, y col. (1985): Plasma fibronectin levels in acute and recovering malnourished children. *Clin Physiol Biochem*. 3(5): 257-264.
- 15 Colli A, y col. (1986): Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. *Cancer.*: 58(11): 2489-2493.

#### Antígeno de fibrinógeno:

- Ernst E, Resch KL (1993): Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med.*: 118(12): 956-963.
- 20 Jelic-Ivanovic Z, Pevcevic N (1990): Fibrinogen deetrmation by five methods in patients receiving streptokinase therapy. *Clin Chem.*: 36(4): 698-699.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la separación de FVW con elevada actividad de FVW con baja actividad, que comprende una cromatografía con hidroxilapatita como matriz cromatográfica, con la que se obtiene una preparación de VWF con elevada actividad que presenta una actividad específica del FVW de al menos 50 E/mg de antígeno de FVW.
- 5 2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, caracterizado porque el tampón de lavado contiene 100-300 mM, preferiblemente 200-300 mM, y el tampón de elución 200-500 mM, preferiblemente 300-400 mM, de fosfato sódico o potásico.
- 10 3. Procedimiento para la preparación de una composición con una actividad específica del FVW de por lo menos 50 E/mg de antígeno de FVW, caracterizado porque se purifica una composición que contiene FVW mediante cromatografía con hidroxilapatita, en la que el FVW se une a la matriz de la columna de hidroxilapatita, el FVW con baja actividad específica se expulsa por lavado y a continuación se eluye el FVW de elevada actividad específica con mayor concentración salina, conteniendo el tampón de lavado 100-300 mM, preferiblemente 200-300 mM, y el tampón de elución 200-500 mM, preferiblemente 300-400 mM, de fosfato sódico o potásico.
- 15 4. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cromatografía se lleva a cabo a un valor del pH entre 5 y 7, preferiblemente entre 5,5 y 6,8.
5. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque como tampón de desarrollo se utiliza una solución que contiene fosfato sódico o potásico.
- 20 6. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en primer lugar se lleva a cabo una cromatografía de paso con hidroxilapatita, la fracción de paso se recromatografía en condiciones de unión y la proteína objetivo se eluye como fracción de FVW de alta pureza.
7. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se utiliza hidroxilapatita cerámica.
8. Procedimiento conforme a la reivindicación 7, caracterizado porque la hidroxilapatita cerámica es del tipo I o del tipo II.
- 25 9. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque como material de partida se utiliza una fracción plasmática prepurificada.
10. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque como material de partida se utiliza una disolución de crioprecipitado purificada adicionalmente.
11. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque como material de partida se utiliza una disolución de crioprecipitado precipitado con hidróxido de aluminio.
- 30 12. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque como material de partida se utiliza una disolución de crioprecipitado precipitado con hidróxido de aluminio prepurificada cromatográficamente.
13. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque antes de la cromatografía con hidroxilapatita se lleva a cabo una precipitación por pH para la separación de fibronectina.
- 35 14. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque como material de partida se utiliza una disolución de proteínas con FVW preparado de manera recombinante.
15. Uso de hidroxilapatita para la preparación de un preparado de FVW con elevada actividad específica que ascienda por lo menos a 50 E/mg de antígeno de FVW.