



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 827**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/755** (2006.01)  
**A61K 38/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08380326 .2**  
96 Fecha de presentación : **28.11.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2078730**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2009**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un concentrado de factor von Willebrand o del complejo de factor VIII/factor von Willebrand y utilización de los mismos.**

30 Prioridad: **08.01.2008 ES 200800021**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.08.2011**

73 Titular/es: **GRIFOLS, S.A.**  
**c/ Jesús y María, 6**  
**08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Ristol Debart, Pere;**  
**Faro Tomás, María Mercedes y**  
**Jorquera Nieto, Juan Ignacio**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 363 827 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

Procedimiento para la obtención de un concentrado de factor von Willebrand o del complejo de factor VIII/ factor von Willebrand y utilización de los mismos.

5

## 1- Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a un concentrado terapéutico del Factor von Willebrand o del complejo Factor VIII/Factor von Willebrand y al proceso para la preparación de un medicamento indicado para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand (EVW) y la Hemofilia A que se ha nanofiltrado por un tamaño de poro de 20 nm, lo cual permite la eliminación eficaz tanto de virus con envoltura como sin envoltura, como, por ejemplo, la hepatitis A o el eritrovirus B19.

10

## 2- Antecedentes

15

El Factor von Willebrand (FVW) es una proteína plasmática de estructura multimérica en la que el peso molecular de las diferentes formas varía entre aproximadamente los 230000 Daltons (Da) de cada subunidad monomérica hasta más de 20 millones de Da de las formas multiméricas de mayor peso molecular, constituyendo así la mayor proteína soluble conocida. Su concentración en plasma se sitúa aproximadamente en torno a 5 - 10 µg/ml [Siedlecki y otros, Blood, vol 88, n 8, 1996: 2939-2950] y la forma plasmática de menor tamaño es la correspondiente al dímero, con un tamaño aproximado de 500000 Da.

20

El FVW desarrolla un papel primordial en la hemostasia primaria, siendo responsable de la adhesión plaquetar sobre las superficies vasculares dañadas y por tanto de la formación del tapón plaquetar, sobre el que se desarrollarán los mecanismos de formación del coágulo de fibrina. Se sugiere que los multímeros de mayor peso molecular soportan con mayor eficacia los mecanismos de adhesión plaquetar al subendotelio y se ha relacionado la eficacia clínica de los concentrados de FVW con el contenido de estos multímeros de mayor peso molecular [Metzner y otros, Haemophilia (1998) 4, 25-32].

25

Además, en el plasma, el FVW ejerce el papel de transportador y estabilizador del Factor VIII (FVIII), encontrándose en estado nativo la molécula de FVIII unida a las formas multiméricas del FVW. El complejo Factor VIII/Factor von Willebrand (FVIII/FVW) alcanza una longitud que puede llegar a los 1150 nm [Furuya K y otros, Vox Sanguinis (2006) 91, 119-125]. Por otra parte, el FVW en su forma globular más pequeña tendría un tamaño de aproximadamente 149 x 77 x 3,8 nm pudiendo variar su estructura, dependiendo de la fuerza de cizalla, a una forma extendida o lineal [Siedlecki y otros, Blood (1996) 88, 2939-2950]. La concentración plasmática del FVIII se sitúa aproximadamente en torno a 0,05 - 0,1 µg/ml (por lo que es unas 50 a 100 veces inferior a la del FVW).

30

35

Defectos cuantitativos o cualitativos del FVW producen alteraciones en la hemostasia primaria, conocidas como enfermedad de von Willebrand, que se manifiesta en problemas hemorrágicos.

40

Los concentrados purificados de FVW y los concentrados de FVIII con elevado contenido en FVW funcional, presentan utilidad terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand.

45

Otro aspecto a considerar es que al ser el FVW el estabilizante natural del FVIII, los concentrados de FVIII con alto contenido en FVW, cuando se emplean para el tratamiento de la Hemofilia A, pueden presentar numerosas ventajas, como han apuntado algunos autores, por ejemplo: una mayor vida media "in vivo" del FVIII infundido, un efecto protector frente a los anticuerpos inhibidores del FVIII [Gensana M. y otros, Haemophilia, (2001) v.7, 369-374] [Bjorkman S. y otros, Clin Pharmacokinet, (2001) v.40, 815-832] [Behrmann K. y otros, Thromb Haemost, (2002) v.88, 221-229] y una posible menor frecuencia de desarrollo de anticuerpos inhibidores de la actividad del FVIII [Goudemand J. y otros, Blood (2006) 107: 46 - 51].

50

Se han establecido técnicas analíticas para caracterizar tanto el contenido como la actividad del FVW en estos concentrados. La determinación de la actividad del FVW como cofactor de Ristocetina (FVW:RCo) es uno de los métodos ampliamente usados para la determinación de la actividad del FVW [Heath y otros, Thromb Haemost 1992; 68:155-159]. La medida del antígeno de FVW (FVW:Ag) [Cejka J. Clin Chem. 1982; 28:1356-1358] nos muestra la cantidad de FVW, tanto activo como inactivo, en una muestra.

55

Uno de los parámetros relevantes para la estimación de la calidad funcional de los concentrados de FVW es la relación entre actividad FVW:RCo y antígeno FVW:Ag.

60

Dada la posible importancia de la estructura multimérica del FVW y de los multímeros de alto peso molecular en relación a su actividad y eficacia clínica, la caracterización de esta estructura multimérica es fundamental para determinar la utilidad de los concentrados de FVW y de los concentrados de FVIII con elevado contenido en FVW. Esta estructura multimérica se determina por electroforesis en gel [Ruggeri y otros, Blood 1981; 57:1140-1143].

65

Se han descrito diversos métodos de purificación del FVW o del complejo FVIII/FVW en el que el FVW es funcional

y a una concentración suficiente para su uso como producto terapéutico en la EVW, como muestran las patentes EP 0411810 y EP 0639203 o la publicación de Ristol P. y otros, Sangre (1996) 41:125-130.

5 Otros procesos de purificación de FVIII consiguen un producto final sin FVW o con un contenido de éste a nivel de trazas. Estos concentrados no son aptos para el tratamiento de la EVW. Además, en algunos casos el FVW residual contenido en estos concentrados de FVIII no es funcional, habiendo perdido parte de los multímeros que lo forman, especialmente los de mayor peso molecular. Por tanto, estos concentrados no poseerían las ventajas que tienen los concentrados de FVIII ricos en FVW cuando se emplean para el tratamiento de la Hemofilia A.

10 En el registro de concentrados de factores de coagulación, creado en 1997 y actualizado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) en 2006 (Kasper,C.K.; Brooker,M. Registry of clotting factor concentrates, January 2006), se relacionan (tablas 2 y 3) los concentrados de FVIII existentes, especificando, entre otros, el método de fraccionamiento, la inactivación viral, su contenido en FVW y la funcionalidad del mismo.

15 De entre los concentrados de FVIII nanofiltrados debemos diferenciar los que son nanofiltrados por 35 nm (o tamaño de poro superior), en los que esta nanofiltración no presenta eficacia frente a virus no envueltos, como por ejemplo el virus de la hepatitis A (de aproximadamente 24 nm) o el virus B19 (de entre 18 y 24 nm). Por otra parte los concentrados de FVIII nanofiltrados por tamaños de poro inferior a 35 nm no presentan contenido en FVW, o si lo presentan, éste carece de los multímeros de alto peso molecular, con lo cual no son eficaces para el tratamiento de la EVW y no poseen las ventajas que tienen los concentrados de FVIII ricos en FVW cuando se emplean para el tratamiento de la Hemofilia A.

20 Una gran capacidad de eliminación de agentes patógenos es imprescindible para asegurar la seguridad de los productos biológicos, por ello en los procesos de producción se incorporan diversos métodos con esta finalidad. Entre ellos cabe citar los tratamientos químicos de inactivación, basados en la acción de solventes orgánicos asociados a un detergente, que han demostrado gran eficacia frente a virus con envoltura lipídica pero que no presentan eficacia contra virus sin envoltura lipídica. Otros tratamientos físicos, como los tratamientos térmicos, son efectivos independientemente de la presencia o no de envuelta lipídica pero su eficacia depende de la severidad del tratamiento, la cual está condicionada a su vez por la resistencia a la inactivación de la proteína a tratar. Otras técnicas que contribuyen a la reducción de la carga viral consisten en separaciones por precipitación o cromatografía.

25 Un método que se ha mostrado muy efectivo en la eliminación de virus, independientemente de la presencia o no de envuelta lipídica, es la filtración por filtros de un tamaño de poro capaz de retener partículas víricas (nanofiltración). Este método se ha mostrado también eficaz en la eliminación de otras partículas infecciosas como los priones. A pesar de ello, la eficacia de este método está condicionada por el tamaño de poro aplicado, que se define, esencialmente, en función del tamaño de la proteína a filtrar.

30 Existen nanofiltros de diferentes tamaños de poro, normalmente entre 15 y 75 nanómetros (nm) y en general, a menor tamaño de poro mayor eficacia en la retención de patógenos, siendo los nanofiltros de poro inferior a 35 nm y preferentemente entre 15 y 20 nm los que consiguen retener los virus más pequeños, cuyo tamaño se sitúa entre los 18 y 23 nm, como el eritrovirus B19 o el virus de la hepatitis A (de aproximadamente 24 nm). Por sus características, la aplicación de estos nanofiltros sólo debería ser físicamente aplicable a aquellas proteínas de menor tamaño y que por tanto pueden ser filtradas con una recuperación aceptable para su producción industrial (normalmente la recuperación postnanofiltración debería ser mayor o igual al 60%).

35 Por su estructura molecular el FVW o el complejo FVIII/FVW no parece, a priori, filtrable por nanofiltros menores a 35 nm, especialmente las formas multiméricas de mayor peso molecular del FVW. Hasta la fecha, no se ha conseguido la nanofiltración del FVW o del complejo FVIII/FVW que incluya las formas multiméricas de mayor peso molecular, por nanofiltros de menos de 35 nm.

40 Del registro de concentrados de factores de coagulación de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) antes citado, un concentrado de FVIII nanofiltrado (por 20 nm en este caso) es el Cross Eight M de la Japanese Red Cross, también descrito en la publicación de K. Furuya y otros, Vox Sanguinis (2006) 91, 119-125. A pesar de que en la publicación se afirma que se consigue filtrar el FVW contenido en el concentrado de FVIII por 20 nm y que no se altera la estructura multimérica del mismo, vemos que según el registro de la FMH, este concentrado presenta un FVW no funcional. Volviendo a la publicación de Furuya observamos que el contenido en FVW es a nivel de trazas [pág. 123: ... the contents of vWF were similar to those usually found (0,007-0,015 U of vWF/U of FVIII:C) ...], cuando el cociente en plasma es de 1 unidad de actividad de FVW por cada unidad de actividad de FVIII (proporción 1:1). Por otra parte, de la caracterización realizada de la estructura multimérica de este FVW residual (figura 4, pág. 123) no se observan más de 10 bandas de multímeros, siendo conocido que una estructura multimérica bien conservada que presente los multímeros de alto peso molecular debe contener no menos de 11 bandas (Metzner y otros, Haemophilia (1998) 4; página 27, 2º párrafo). Por ello, lo que nos indica Furuya en su publicación es que el concentrado de FVIII purificado por cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales presenta un contenido de FVW a nivel de trazas, del que solo se conservan los multímeros de menor peso molecular, y que esta composición de FVW no se ve alterada por la nanofiltración por 20 nm. Evidentemente este concentrado (Cross

Eight M) no es adecuado para el tratamiento de la EVW ni se beneficia de la presencia de FVW en las proporciones (1:1) encontradas en el plasma humano normal.

5 El otro concentrado de FVIII nanofiltrado, mencionado en el registro de concentrados de factores de coagulación de la Federación Mundial de Hemofilia antes citado, es el FACTANE de LFB. Según el registro este concentrado es nanofiltrado por 15 nm y contiene FVW. Este producto corresponde al obtenido según la patente WO2005040214, que nos describe una composición de FVIII nanofiltrado por un tamaño de poro entre 13 y 25 nm en la que se correlaciona la eficacia en la retención de virus con un contenido de FVW de alto peso molecular (superior a 10 multímeros) inferior al 15%, reafirmando lo observado en la publicación de Furuya, en el sentido de que los multímeros de menor peso molecular del FVW son nanofiltrables por 20 nm cuando se encuentran a concentraciones bajas con respecto al FVIII, es decir, con cocientes FVW/FVIII muy alejados de 1 (0,015 en el caso de Furuya y 0,15 en el caso de Factane, patente WO2005040214). En cambio los de mayor peso molecular son retenidos por el nanofiltro. Además, en esta patente, con objeto de recuperar el FVIII que, asociado al FVW, quedaría igualmente retenido, se procede a la disociación forzada del complejo FVIII/FVW mediante la adición de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración superior a 0,20 M, que es la concentración mínima a la que se disocia el complejo FVIII/FVW. A pesar de ello, todos los ejemplos se realizan a una concentración de  $\text{CaCl}_2$  de al menos 0,35 M, con objeto de asegurar la disociación del complejo FVIII/FVW y con ello la recuperación de FVIII. La composición definida en esta patente está dirigida exclusivamente al tratamiento del déficit de FVIII y no al de la EVW. Además, este producto no es apto para el tratamiento de la EVW, como puede comprobarse en la autorización de producto de la “Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé” [<http://afssaps-prd.afssaps.fr/php/ecodex/frames.php?specid=66716833&typedoc=R&ref=R0093176.htm>], en el punto 4.1 Indicaciones terapéuticas, donde se especifica claramente que el producto no contiene FVW en cantidad suficiente para el tratamiento de la EVW. También, en la publicación sobre el mismo producto [Vox Sanguinis (2007) 92, 327-337] los autores confirman que el producto (Factane) no está previsto para el tratamiento de la EVW (pág. 335).

25 En resumen, el objetivo de los procedimientos descritos por K. Furuya y otros, [Vox Sanguinis (2006) 91, 119-125] y por la patente WO2005040214 y publicación de Vox Sanguinis (2007) 92, 327-337 es obtener un concentrado de FVIII pobre en FVW (<15% o <0,15:1 de relación FVW/FVIII) aplicable al tratamiento de la Hemofilia A, pero que no gozaría de las ventajas que un concentrado rico en FVW aporta al tratamiento de la Hemofilia y que en ningún caso sería adecuado para el tratamiento de la EVW.

35 Se ha descrito (Siedlecki y otros, Blood, vol 88, n 8, 1996: 2939-2950) que el FVW cambia su estructura tridimensional bajo condiciones de flujo que provocan altas fuerzas de cizalla (high shear stress), lo cual permite “in vivo” los mecanismos de adhesión plaquetar. Este cambio de estructura hace que la molécula pase de ser una estructura globular a una forma más lineal. En este sentido, K. Furuya y otros, en su publicación (Vox Sanguinis (2006) 91, 119-125) ya indica que la filtración de su concentrado de FVIII por 20 nm debe realizarse a alta presión (0,8 bar) para conseguir un rendimiento de FVIII aceptable, lo cual sugieren que podría ser probablemente debido a que a menor presión el efecto de flujo no es suficiente para que el FVW presente cambie su estructura, dificultando con ello la filtración. A las condiciones definidas (0,8 bar) consiguen además una buena recuperación de los multímeros de bajo peso molecular del FVW presente, teniendo en cuenta que los valores de partida, previos a la nanofiltración, son de por sí muy bajos.

45 Los documentos citados no revelan la posible aplicación de la nanofiltración a través de 20 nm, al FVW o al complejo FVW/FVIII (relación  $\geq 0,4$ ) con un contenido funcional de multímeros de alto peso molecular que permitan su uso para el tratamiento de la EVW o mantengan las ventajas descritas de los concentrados ricos en FVW cuando se emplean para el tratamiento de la Hemofilia A. Es más, la WO2005040214 indica claramente al experto que este tamaño de poro impide el paso del FVW de alto peso molecular.

50 El estado de la técnica en cuanto a nanofiltración del FVW como producto terapéutico está limitado en la actualidad a la nanofiltración por 35 nm, como muestra la patente EP1632501. Esta patente muestra el procedimiento de obtención de un concentrado de FVW con un bajo contenido en FVIII (relación FVIII:C/FVW:RCo inferior a 0,06) que comprende una etapa de eliminación viral por nanofiltración mediante filtros de 35 nm de tamaño de poro, como se indica en el párrafo 23 de la descripción y en el ejemplo 1, párrafo 37. De esta patente podemos entender que la nanofiltración de una molécula del tamaño FVW no es factible por nanofiltros de tamaño de poro inferior a 35 nm.

55 Como hemos visto, no existe en la actualidad ningún concentrado terapéutico indicado para el tratamiento de la Enfermedad de von Willebrand nanofiltrado por 20 nm. Además el estado actual de la técnica indica que esta nanofiltración por 20 nm del FVW conteniendo los multímeros de alto peso molecular no es posible, al igual que ocurre con el complejo molecular FVIII/FVW, si los multímeros de alto peso molecular del FVW están presentes y si la proporción entre FVW y FVIII es superior a 0,15.

60 Por tanto, sigue siendo un problema sin resolver la preparación de un concentrado de FVIII/FVW nanofiltrado por 20 nm con proporciones entre ambos componentes del complejo macromolecular de FVIII y FVW más similares a las encontradas normalmente en el plasma humano (1 Unidad de FVW por cada 1 Unidad de FVIII), que retenga todas las ventajas del complejo FVIII/FVW nativo y sea apto para el tratamiento de la EVW y de la Hemofilia A.

Los procesos de obtención del FVW o del complejo FVIII/FVW a partir del plasma humano parten habitualmente de la fracción de crioprecipitado y se purifican por precipitaciones selectivas o más recientemente por técnicas cromatográficas, esencialmente por intercambio iónico y/o afinidad.

5 Los procesos de purificación del FVIII que en la actualidad se basan en la cromatografía por inmutofinidad (con anticuerpos monoclonales) consiguen un FVIII con una muy elevada actividad específica pero carecen de FVW funcional [K. Furuya y otros, Vox Sanguinis (2006) 91, 119-125].

10 Estos procesos de obtención del FVW o del complejo FVIII/FVW contemplan, como hemos visto, una o varias etapas específicas de inactivación o eliminación de virus.

15 En la presente invención, la actividad del FVW está basada en el papel del FVW como Cofactor del antibiótico Ristocetina (FVW:RCo) en la capacidad para inducir agregación plaquetaria (Farmacopea Europea 07/2006:20721). Esta actividad se expresa en Unidades Internacionales (UI FVW:RCo) y su concentración en UI/mililitro (UI FVW:RCo/ml).

20 La actividad de FVIII se refiere a actividad de FVIII coagulante (FVIII:C), que se basa en el papel del FVIII como cofactor en la activación del FX en presencia de FIXa, iones calcio y fosfolípidos (Farmacopea Europea 07/2006:20704). Se cuantifica por sustrato cromogénico y se expresa en Unidades Internacionales (UI FVIII) y su concentración en UI FVIII/mililitro (UI FVIII/ml).

### 3- Descripción de la Invención

25 La presente invención describe un concentrado terapéutico del Factor von Willebrand o del complejo Factor VIII/Factor von Willebrand que se ha nanofiltrado por un tamaño de poro de 20 nm, en la que el producto obtenido presenta una relación FVW:RCo/FVIII:C mayor o igual a 0,4 y una estructura multimérica del FVW conservada que incluye los multímeros de alto peso molecular (más de 11 bandas) y que es útil para la preparación de un medicamento indicado para el tratamiento de la Enfermedad de von Willebrand y de la Hemofilia A y al proceso para su obtención.

30 A partir de las investigaciones realizadas en la nanofiltración del FVW o del complejo FVIII/FVW, en la que el FVW presenta una estructura multimérica conservada, conteniendo los multímeros de alto peso molecular, sorprendentemente, los inventores han demostrado que para una solución conteniendo FVW o el complejo FVIII/FVW e iones calcio, es posible la filtración por un nanofiltro de tamaño de poro nominal de 20 nm, a una presión máxima inferior o igual a 0,5 bar y preferentemente entre 0,2 y 0,4 bar, de acuerdo con las reivindicaciones.

35 La solución a nanofiltrar está a una concentración máxima de 0,6 Unidades de Absorbancia (UA<sub>280</sub>), equivalente, como máximo, a 12 UI FVW:RCo/ml. La composición proteica de la solución, en adición al propio contenido de FVW y FVIII, puede estar formada además por otras proteínas, como por ejemplo el fibrinógeno o la fibronectina, siendo la actividad específica del FVW (UI FVW:RCo/mg proteína) mayor o igual a 1 y típicamente mayor o igual a 10. La actividad específica del FVIII (UI FVIII/mg proteína) en el caso de nanofiltración del complejo FVIII/FVW es también mayor o igual a 1, y típicamente mayor o igual a 10.

45 La solución a nanofiltrar puede contener calcio (cloruro) entre 0,05 y 0,20 M y al menos un aminoácido básico como estabilizante de la proteína, preferentemente histidina entre 20 y 30 mM. El pH de la solución a filtrar debe ser superior a 5,5, para prevenir la desnaturalización.

50 La relación de carga, expresada en actividad biológica de la proteína a filtrar puede alcanzar las 50 UI de FVW:RCo/cm<sup>2</sup> de superficie filtrante, equivalente a 0,5 mg de FVW/cm<sup>2</sup>.

55 A las condiciones definidas, es posible la filtración hasta 120 litros de solución por m<sup>2</sup> de superficie filtrante, obteniendo una recuperación de actividad de FVIII superior al 70% y una recuperación de actividad de FVW superior al 60%, con una estructura multimérica del FVW conservada (más de 11 multímeros) y un ratio FVW:RCo/FVIII que es como mínimo el 80% del material aplicado.

La solución a filtrar se caracteriza por presentar una relación de actividades FVW:RCo/FVIII mayor o igual a 0,4 y típicamente entre 1 y 3, siendo por tanto igualmente aplicable a soluciones de FVW sin FVIII como a soluciones del complejo FVIII/FVW, ya que el FVW al ser la molécula multimérica de mayor tamaño es la limitante del proceso.

60 A las condiciones definidas, el caudal normalizado de filtración es como máximo de 30 litros/hora/m<sup>2</sup>, y típicamente entre 10 y 20 litros/hora/m<sup>2</sup>, siendo el tiempo de filtración menor o igual a 12 horas. Esto posibilita su aplicación industrial, siendo evidente una modificación u optimización de estos parámetros por la simple variación de la superficie de nanofiltración, que por su elevado coste es el factor limitante del proceso.

65 En una realización preferente se procede a una prefiltración por un nanofiltro de un tamaño de poro entre 35 y 100 nm previa a la nanofiltración por un poro inferior a 35 nm. El ratio de áreas entre prefiltro y nanofiltro (< 35 nm) se

sitúa entre 1:2 y 1:4.

También es posible realizar una doble nanofiltración por 20 nm (20 nm + 20 nm), con lo que se incrementa el beneficio de seguridad añadida al producto por la nanofiltración.

Por la presente invención se obtiene un FVW o complejo de FVIII/FVW nanofiltrado que permite la preparación de un medicamento de alta pureza, apto para el tratamiento de la EVW y de la Hemofilia A, con una actividad de FVW superior a 100 UI FVW:RCo/ml y una relación entre las actividades de FVW y FVIII igual o mayor a 0,4 y en el que la estructura multimérica del FVW incluye los multímeros de alto peso molecular (más de 11 bandas).

#### 4- Ejemplos

De entre los nanofiltros comerciales disponibles, para ejemplificar la invención se han utilizado los nanofiltros Planova<sup>®</sup>, de Asahi Kasei Corporation, Japón, fabricados a partir de celulosa regenerada y cuyo tamaño de poro es aproximadamente de  $35 \pm 2$  nm en el caso del Planova 35N y de  $19 \pm 1$  nm en el caso del Planova 20N. Este tipo de filtros admiten tanto un modo de filtración terminal ("dead end"), como tangencial. En los siguientes ejemplos, la nanofiltración por Planova se ha realizado en modo terminal pero a efectos de la presente invención, es válido también su uso en modo tangencial, así como el uso de nanofiltros de otras marcas comerciales y composición, que el experto en la materia conoce. Tanto el montaje, como forma de operación y comprobación de la integridad de los nanofiltros a los que se refiere la presente invención están perfectamente definidos en las instrucciones de los fabricantes.

Ejemplo 1: Obtención del material de partida.

La solución del complejo de FVIII/FVW previa a la nanofiltración, procedente de plasma humano, puede ser obtenida, por ejemplo, a partir del crioprecipitado solubilizado, por precipitación con Polietilenglicol y posterior purificación por cromatografía de afinidad, como muestra la patente EP 0411810. La solución nanofiltrada puede ser posteriormente purificada, para conseguir un producto de alta pureza, por ejemplo por precipitación con glicina, como muestra la patente EP 0639203. Alternativamente, el FVIII o el FVW o ambos pueden proceder de biosíntesis mediante la tecnología del ADN recombinante en células o en animales transgénicos [Wood W.I. y otros, Nature (1984) 312: 330-337]; [Toole, J.J. y otros, Nature (1984) 312: 342-347].

Ejemplo 2: Nanofiltración del complejo FVIII/FVW.

A partir de 14,7 litros de una solución del complejo de FVIII/FVW parcialmente purificada, con una actividad específica de 10,4 UI FVIII/UA<sub>280nm</sub> y con una concentración de FVW:RCo de 5,69 UI/ml, equivalente a 0,235 UA<sub>280nm</sub>, en presencia de histidina 25 mM y 0,14 M de calcio a un pH de 6,77 y temperatura de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  se procede a la filtración en serie por un filtro Planova 35N de  $0,12 \text{ m}^2$  y un filtro Planova 20N de  $0,3 \text{ m}^2$ . La filtración tiene lugar a caudal constante de aproximadamente  $14 \text{ L/h/m}^2$ , manteniéndose una presión diferencial en el Planova 20N entre 0,20 y 0,30 bar durante la filtración de toda la solución, la cual finaliza tras un tiempo de 3,3 horas. La productividad, por unidad de área y de tiempo es de 3,6 UI FVIII/cm<sup>2</sup>/hora, 8,2 UI FVW RCo/cm<sup>2</sup>/hora (proporción FVW:RCo/FVIII:C = 2,3) y de 9,8 UI FVW:Ag/cm<sup>2</sup>/hora. La recuperación de actividad es de 94% de FVIII y de 95% de FVW RCo.

Ejemplo 3: Características del complejo de FVIII/FVW nanofiltrado por Planova 20N.

Se procesaron, según se ilustra en el ejemplo 2, 7 lotes diferentes de material de partida. En todos los casos se parte del complejo FVIII/FVW, con una actividad específica próxima o superior a 10 UI FVIII/UA<sub>280nm</sub> y con una concentración proteica de  $0,3 \pm 0,2 \text{ UA}_{280\text{nm}}$ , en presencia de histidina 25 mM y 0,14 M de calcio a un pH de  $6,8 \pm 0,2$  y temperatura de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . Se procedió a la clarificación por  $0,1 \mu\text{m}$  y posterior nanofiltración en serie por Planova 35N y Planova 20N. La filtración se mantuvo a caudal constante entre 10 y 20 litros/h/m<sup>2</sup>. La presión operativa en el filtro Planova 20N se mantuvo entre 0,2 y 0,4 bar durante toda la filtración y en todos los casos.

Los resultados obtenidos (tabla 1) muestran que la nanofiltración del complejo de FVIII/FVW por tamaño de poro de 20 nm en las condiciones establecidas no tiene impacto alguno sobre la actividad y pureza (actividad específica) del nanofiltrado obtenido.

El análisis comparativo de los ratios FVW:RCo/FVIII y FVW:RCo/FVW:Ag (tabla 1) obtenidos en el material antes y después de nanofiltrar permite constatar que, en las condiciones establecidas es posible filtrar el FVW contenido en el concentrado de FVIII/FVW por tamaño de poro de 20 nm sin afectar a la funcionalidad de este FVW como cofactor de Ristocetina.

Tabla 1

CARACTERÍSTICAS DEL COMPLEJO FVIII/FVW ANTES y DESPUÉS DE NANOFILTRAR							
ACTIVIDAD ESPECÍFICA				Relación (FVW:RCo/FVIII)		Relación (FVW:RCo/FVW:Ag)	
(UI FVIII/UA <sub>280</sub> )		(UI FVW:RCo/UA <sub>280</sub> )					
ANTES DE NANOFILTRAR	DESPUÉS DE NANOFILTRAR	ANTES DE NANOFILTRAR	DESPUÉS DE NANOFILTRAR	ANTES DE NANOFILTRAR	DESPUÉS DE NANOFILTRAR	ANTES DE NANOFILTRAR	DESPUÉS DE NANOFILTRAR
10,1±2,9	9,4±3,3	24,0±8,2	24,1±11,2	2,3±0,5	2,3±0,1	0,8±0,06	0,9±0,07

Los valores corresponden a la Media de 7 lotes ± DE

5 Ejemplo 4: Estructura multimérica del FVW obtenida por electroforesis en gel, constatando la conservación de la misma, incluyendo los multímeros de mayor peso molecular, superior a 11 bandas.

10 En la figura 1 se muestra la estructura multimérica del FVW en diferentes lotes de producto final, con y sin etapa de nanofiltración. En la fotografía original se pueden contar al menos 16 bandas en carriles correspondientes al material nanofiltrado.

10 Ejemplo 5: Efecto de la presión diferencial sobre la nanofiltración del complejo FVIII/FVW.

15 Se procede a la filtración por Planova 35N de una solución parcialmente purificada de FVIII/FVW, con una actividad específica del FVIII de aproximadamente 10 UI/UA<sub>280nm</sub> y con concentraciones comprendidas en el intervalo 0,1-0,3 UA<sub>280nm</sub>, en las condiciones descritas en los ejemplos 2 y 3. La nanofiltración se ajusta a alta (0,8 bar) y baja presión (0,3 bar), obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2.

Tabla 2

PLANOVA 35N	CONDICIÓN DE PROCESO	PRESIÓN (bar)	CONCENTRACIÓN PROTEICA APLICADA (DO <sub>280nm</sub> )	RELACIÓN DE CAUDAL % con respecto caudal inicial	
				Tras 1 HORA	Tras 3 HORAS
	ALTA PRESIÓN	0,8		0,179	10,6
0,271				14,6	n.d. <sup>(1)</sup>
BAJA PRESIÓN (n=5)	0,3		0,187±0,039	98,2±7,3	88,6±3,5
			0,133-0,236	92,1-110,8	84,5-92,5

20 <sup>(1)</sup> no disponible dado que se interrumpe el proceso por colmatación y bloqueo del nanofiltro.

25 Asimismo, a partir de esta solución de complejo de FVIII/FVW prefiltrada por Planova 35N se procede a la filtración por Planova 20N en las condiciones descritas en el ejemplo 2. La nanofiltración se ajusta a alta (0,8 bar) y baja presión (0,3 bar), obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3

PLANOVA 20N	CONDICIÓN DE PROCESO	PRESIÓN (bar)	CONCENTRACIÓN PROTEICA APLICADA (DO <sub>280nm</sub> )	RELACIÓN DE CAUDAL (% con respecto caudal inicial )	
				Tras 1 HORA	Tras 3 HORAS
	ALTA PRESIÓN	0,8	0,146	40	n.d. <sup>(1)</sup>
BAJA PRESIÓN (n=4)	0,3	0,199±0,05	86,5±9,9	75,7±4,5	
		0,139-0,254	75,7-98,4	72,1-82,1	

<sup>(1)</sup> no disponible dado que se interrumpe el proceso por colmatación y bloqueo del nanofiltro.

5 En la filtración por Planova 35N a alta presión se produce una drástica caída de caudal, observando tan sólo el 10,6% y 14,6% del caudal inicial tras una hora de nanofiltración y, en un caso, tan sólo el 7,9% del caudal inicial a las 3 horas. En la filtración por Planova 35N a una presión diferencial de 0,3 bar el caudal se mantiene en un 88,6% incluso tras 3 horas de nanofiltración.

10 En la filtración por Planova 20N, tomando como material de partida una solución de complejo de FVIII/FVW prefiltrada por Planova 35N y a una presión diferencial de 0,8 bar se obtiene una relación de caudal de un 40% tras una hora de nanofiltración e interrumpiéndose la filtración antes de las 3 horas por colmatación del filtro. Cuando la filtración por Planova 20N se realiza a una presión diferencial de 0,3 bar el caudal se mantiene en un 75,7% incluso tras 3 horas de nanofiltración.

15 De los ejemplos anteriores, se evidencia que el mantenimiento de unas condiciones bajas de presión durante la filtración por tamaño de poro igual o inferior a 35 nm evita que se produzca una brusca caída de caudal. Consecuentemente, en estas condiciones de presión no se observa fenómeno de bloqueo de parte de los poros de la membrana filtrante debido a la deposición de moléculas de alto peso molecular presentes en la solución de FVIII/FVW como son las formas multiméricas del FVW que alcanzan tamaños de hasta 20000000 Da.

Ejemplo 6: Efecto de la concentración del material aplicado sobre la nanofiltración del complejo FVIII/FVW.

25 A partir de distintas soluciones del complejo de FVIII/FVW parcialmente purificado, con una actividad específica del FVIII de aproximadamente 10 UI FVIII/UA<sub>280nm</sub>, con una actividad de FVW en relación a la actividad FVIII (FVW:RCo:FVIII) de aproximadamente 2, y comprendiendo unas concentraciones en el intervalo 0,1-0,65 UA<sub>280nm</sub> se procede a la filtración por Planova 20N a una presión diferencial de aproximadamente 0,5 bar y en las mismas condiciones de proceso y composición de producto (excepto su concentración) descritas en los ejemplos 1 y 2.

30 En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 4

PLANOVA 20N	CONCENTRACIÓN PROTEICA APLICADA (DO <sub>280nm</sub> )	RELACIÓN DE CAUDAL (% con respecto caudal inicial)		RELACIÓN DE APLICACIÓN (UA <sub>280nm</sub> /cm <sup>2</sup> de P20N)	PRODUCTIVIDAD (Actividad filtrada por unidad de área P20N y tiempo) <sup>(2)</sup>		RECUPERACIÓN PROTEÍNA (DO <sub>280nm</sub> ) (%)
		Tras 1 HORA	Tras 3 HORAS		UI FVIII/cm <sup>2</sup> /h	UI FVW:RCo/cm <sup>2</sup> /h	
		0,106	80,7		71,4	1,77	
0,170	63,6	30,5	1,39	2,0	4,1	87,6	
0,314	60,7	33	2,85	3,9	7,8	82,5	
0,343	52,9	32	2,19	3,2	6,5	88,6	
0,648	16,2	nd <sup>(1)</sup>	1,16	0,9	1,8	46,8	

(1) n.d: no determinado (por bloqueo y colmatación previa del nanofiltro).

35 (2) Valores calculados en base a la cantidad de proteína filtrada en 6 horas, considerando en todos los casos



una actividad específica de 10 UI FVIII/UA<sub>280nm</sub>, un ratio FVW:RCo/FVIII de 2 y la recuperación de proteína observada en cada caso.

La reducción de caudal observada durante la nanofiltración es directamente proporcional a la concentración del material de carga. Así, el caudal observado tras una hora de nanofiltración es del 80,7%; 63,6%; 60,7%; 52,9% y 16,2%, con respecto al caudal inicial, para concentraciones de 0,106 UA, 0,17 UA, 0,314 UA, 0,343 UA y 0,648 UA, respectivamente. En relación con el caudal observado tras 3 horas de nanofiltración, el descenso hasta valores de un 30,5% del caudal inicial es atribuible al hecho de llevar a cabo la nanofiltración en las condiciones de presión que representan el límite superior de proceso.

Para una concentración de carga próxima a 0,3 UA se obtienen los valores óptimos de productividad (7,8 UI de FVW:RCo/cm<sup>2</sup>/h equivalentes a 46,8 UI de FVW:RCo/cm<sup>2</sup>) así como de recuperación de proteína (ver tabla). Cuando la concentración del material de carga es máxima (0,648 UA) se observa colmatación de la filtración desde el inicio de filtración y los valores de productividad y recuperación descienden drásticamente hasta valores inferiores a 2 UI de FVW:RCo/cm<sup>2</sup>/h y 46,8% de recuperación total de proteína, resultando inviable la nanofiltración a esta concentración.

De estos resultados se puede establecer que el rango viable de concentración para la nanofiltración de la solución de FVIII/FVW con actividad específica de aproximadamente 10 UI FVIII/UA<sub>280nm</sub> es  $\leq 0,6$  UA, aproximadamente equivalente a  $\leq 6$  UI/ml de FVIII y  $\leq 12$  UI/ml de FVW:RCo.

Ejemplo 7: Efecto de la concentración de calcio sobre la nanofiltración del complejo FVIII/FVW.

A partir de distintas soluciones del complejo de FVIII/FVW formulado con albúmina con una actividad específica superior a 10 UI FVIII/UA<sub>280</sub> y una actividad de FVIII entorno a 3 UI/ml, equivalente aproximadamente a 4 UI/ml de FVW:RCo, se procede a la filtración por un filtro de tamaño de poro de 20 nm en presencia de arginina 0,1 M, histidina 25 mM y de calcio 0,05 mM a un pH de 7,3 $\pm$ 0,1. La filtración se lleva a cabo manteniendo una presión diferencial en el Planova 20N de aproximadamente 0,5 bar. En la tabla 5 se muestran los parámetros más relevantes obtenidos en los ensayos llevados a cabo con dos lotes de producto independientes.

Tabla 5

COMPOSICIÓN MATERIAL APLICADO		PRODUCTIVIDAD (UI/cm <sup>2</sup> /h)		RECUPERACIÓN (%)
DO <sub>280nm</sub>	FVIII (UI/ml)	FVIII	FVW:RCo	ACTIVIDAD FVIII
0,143	2,77	1,6	2,0 <sup>(1)</sup>	43,3
0,188	2,96	1,6	2,0 <sup>(1)</sup>	46,6

<sup>(1)</sup> Valores calculados en base a las UI de FVIII filtradas por unidad de tiempo y superficie y considerando un ratio (FVW:RCo/FVIII) de 1,24.

Estos resultados indican que la práctica ausencia de calcio (0,05 mM) y su sustitución por arginina (0,1M) produce una caída de productividad relevante alcanzándose valores de 1,6 UI FVIII/cm<sup>2</sup>/hora y 2,0 UI FVW RCo/cm<sup>2</sup>/hora en ambos casos, remarcablemente inferiores a los observados en el ejemplo 2 (3,6 UI FVIII/cm<sup>2</sup>/hora y 8,2 UI FVW RCo/cm<sup>2</sup>/hora), con similar actividad de FVIII en el material de partida.

Asimismo, la recuperación de actividad de FVIII observada en ambos ensayos desciende hasta valores de 43,3% y 46,6% respectivamente. Sin embargo, aún en estas condiciones, es factible la nanofiltración del complejo macromolecular de FVIII y FVW con proporciones entre las actividades de FVW y FVIII similares a las encontradas en la naturaleza (1:1).

Ejemplo 8: Producción de un lote de FVIII/FVW nanofiltrado a escala industrial.

A partir de una solución parcialmente purificada del complejo de FVIII/FVW proveniente de más de 3000 litros de plasma y con una actividad específica de 15,6 UI FVIII/UA<sub>280</sub> se procede a la filtración en serie por un filtro de tamaño de poro nominal de 35 nm (Planova 35N) de 4 m<sup>2</sup> y dos filtros de tamaño de poro nominal de 20 nm (Planova 20N) de 4 m<sup>2</sup> en presencia de histidina 25 mM y de calcio 0,14 M a pH 6,80. La filtración se lleva a cabo a caudal constante a 107 L/h aproximadamente y manteniendo una presión diferencial en el Planova 20N entre 0,20 y 0,35 bar, habiéndose alcanzado la carga de aplicación (solución de producto + postlavado) de 120,2 kg/m<sup>2</sup> de Planova 20N. La actividad total aplicada por unidad de área fue de 8,9UI FVIII/cm<sup>2</sup> y 19,1 UI FVW:RCo/cm<sup>2</sup>. La recuperación de actividad de la nanofiltración fue del 70,4% de FVIII y del 77,3% de FVW:RCo. Al incluir el postlavado y tras concentrar el producto nanofiltrado obtenido la recuperación de actividad observada fue de 97,5% de FVIII y de 86,8% de FVW:RCo.

La precipitación con cloruro sódico y glicina posterior (según EP 0639203) da lugar a un concentrado de FVIII/FVW nanofiltrado y de alta pureza.

5 El concentrado de FVIII/FVW nanofiltrado y de alta pureza obtenido se estabiliza y, previamente a la dosificación del producto a viales, se ajusta de potencia.

El contenido relativo de FVW en relación al contenido de FVIII, expresado como la relación entre FVW:RCo/FVIII. a lo largo del proceso de purificación se muestra a continuación en la tabla 6:

10

Tabla 6

15

20

Evolución de la actividad (UI FVW:RCo/UI FVIII) en el proceso de purificación		
	Producto nanofiltrado (n=1)	Producto no nanofiltrado (n=6)
Material de partida	1,7	1,57±0,19
Intermedio concentrado	1,9	1,71±0,11
Producto de alta pureza	1,5	1,14±0,25
Producto de alta pureza formulado	1,5	1,24±0,19

25

Estos resultados indican que la implementación de la nanofiltración en el proceso de purificación del complejo FVIII/FVW no afecta esencialmente a la etapa de purificación posterior que conduce a un producto de alta pureza. Esto indica por tanto que en las condiciones establecidas para la nanofiltración del concentrado de FVIII/FVW por tamaño de poro de 20 nm no se altera la proporción de formas multiméricas de mayor peso molecular del FVW dado que tal alteración hubiera tenido previsiblemente un impacto negativo en la purificación posterior por precipitación.

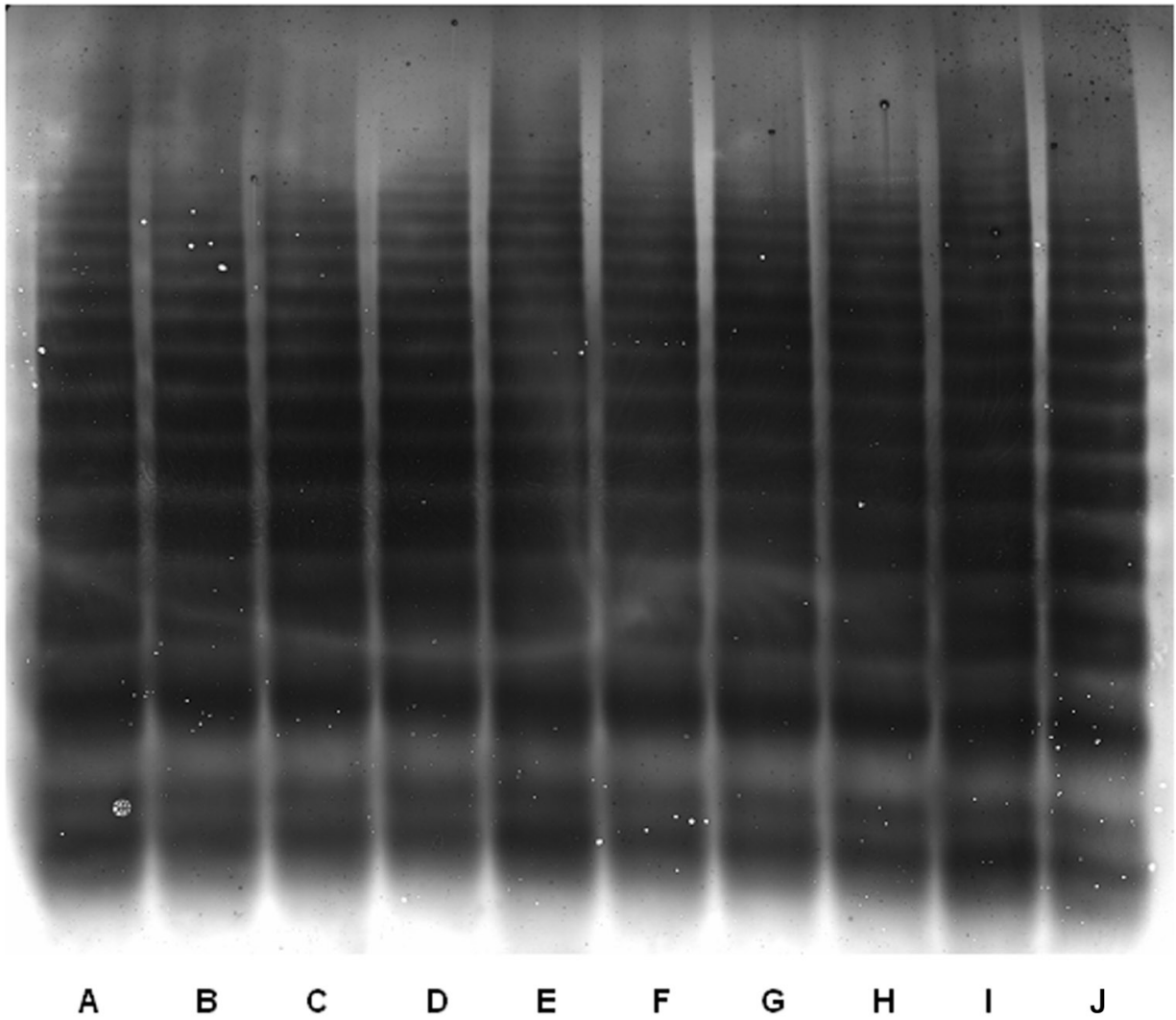
30

El concentrado nanofiltrado FVIII/FVW presenta una concentración relativa de FVW suficiente para su uso como producto terapéutico en la EVW y un contenido de FVIII que también permite su utilización para el tratamiento de la Hemofilia A, con el beneficio adicional de la presencia de cantidades similares a las encontradas en la naturaleza del FVW, estabilizante natural del FVIII, cuyas propiedades beneficiosas en el tratamiento de la Hemofilia A se han mencionado con anterioridad.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la obtención de un concentrado de factor von Willebrand o del complejo Factor VIII/Factor von Willebrand, de origen humano o recombinante, caracterizado por:
- 5           a)    preparación de una solución de (1) Factor von Willebrand o de (2) complejo de Factor VIII/ Factor von Willebrand que contiene FVW a una concentración de hasta 12 UI FVWRCo/ml y una proporción entre Factor von Willebrand/Factor VIII superior o igual a 0,4;
- b)    proceder a la nanofiltración de la solución preparada en a) mediante un filtro de 20 nanómetros, a una presión máxima menor o igual a 0,5 bar, en presencia de ión calcio y a un pH superior a 5,5.
- 10
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración de ión calcio en la solución sometida a nanofiltración varía entre 0,05 y 0,2 M.
3. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que el Factor von Willebrand recuperado después de la nanofiltración mantiene una estructura multimérica que incluye multímeros del orden de 11 ó superior.
- 15
4. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la recuperación del Factor von Willebrand después de la nanofiltración es mayor o igual al 60%.
- 20
5. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la recuperación del Factor VIII después de la nanofiltración es mayor o igual al 70%.
6. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se aplica una relación de carga hasta 50 UI de Factor von Willebrand por cm<sup>2</sup> de superficie filtrante.
- 25
7. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la concentración máxima de la solución a filtrar es de 0,6 UA (DO<sub>280</sub>).
- 30
8. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la nanofiltración se realiza a una presión entre 0,2 y 0,4 bar.
9. Procedimiento de nanofiltración, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el caudal normalizado de nanofiltración se sitúa entre 10 y 20 litros/hora/m<sup>2</sup>.
- 35

Figura 1



A, C, E, G, I: Producto no nanofiltrado  
B, D, F, H, J: Producto nanofiltrado