

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 967**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**C07K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2005 E 05291553 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1632501**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un concentrado de factor de von Willebrand (FvW) mediante cromatografía y concentrado de FvW susceptible de ser así obtenido**

30 Prioridad:

**16.08.2004 FR 0408897**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.03.2014**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANCAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)  
ZONE D'ACTIVITE DE COURTABOEUF, 3,  
AVENUE DES TROPIQUES  
91940 LES ULIS, FR**

72 Inventor/es:

**MARTEL, SERGE;  
CHTOUROU, SAMI y  
POULLE, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 450 967 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 de preparación de un concentrado de factor de von Willebrand (FvW) mediante cromatografía y concentrado de FvW susceptible de ser así obtenido

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de factor de von Willebrand (FvW) mediante cromatografía.

10 El factor de von Willebrand es una proteína sanguínea multimérica cuyo peso molecular se sitúa entre aproximadamente 200 kDa y alrededor de 20 000 kDa, o incluso más. Esta proteína, sintetizada por las plaquetas y las células endoteliales, desempeña un papel fundamental en la lucha contra la hemorragia sanguínea, ya que el FvW actúa como un tampón gelificable que se extiende sobre una brecha vascular proporcionando adhesión de plaquetas para lograr la primera fase de la hemostasia, es decir, la formación del "tapón plaquetario" (trombo). Alrededor de este trombo se van a organizar los fenómenos de coagulación destinados a consolidar la detención del sangrado por formación de un coágulo de fibrina insoluble. El FvW también garantiza la estabilización y el transporte del Factor VIII en la circulación sanguínea, con el que está asociado en forma de complejos de tamaños variables, que se encuentra así protegido contra una rápida degradación mediante proteólisis debido a la sensibilidad del Factor VIII aislado frente a las proteasas.

15 Una deficiencia congénita en el FvW o mutaciones genéticas que modifiquen las propiedades del FvW conlleva la enfermedad de Willebrand, que se manifiesta, por lo tanto, por perturbaciones en la hemostasia primaria y en la coagulación.

20 Es esencial, por tanto, para el tratamiento de esta enfermedad, disponer de derivados de plasma humano enriquecidos en FvW de elevada pureza compatibles con inyecciones múltiples y repetidas. En efecto, las muestras de FvW insuficientemente purificadas procedentes del fraccionamiento del plasma humano contienen diferentes contaminantes (proteínas residuales) que pueden inducir respuestas inmunológicas adversas. Además, la administración de factor de von Willebrand asociado al factor VIII puede conllevar un riesgo de trombosis o de hipercogulabilidad para el paciente tratado (Makris y col., *Thromb.Haemost*, 88, 2002, pp. 377-378, Manucci P.M., *Thromb.Haemost*, 88, 2002, pp. 378-379).

25 Diversos procedimientos de preparación de concentrados de FvW asocian típicamente etapas de precipitación de una fracción de plasma, destinadas a eliminar la mayor parte de las proteínas indeseables (fibrinógeno, fibronectina, etc.), y/o cromatográficas (intercambio iónico, de afinidad, de inmutafinidad, de exclusión por tamaños, etc.) destinadas a la obtención de concentrados de gran pureza, que tengan una actividad específica elevada, y que permitan conservar la integridad de las formas multiméricas, especialmente las de elevado peso molecular cuya importancia biológica es fundamental en los procesos de cicatrización.

30 A modo de ejemplo, se puede citar la patente EP 0 359 593 que divulga la separación de proteínas de una fracción de plasma crioprecipitado que utiliza varias etapas de cromatografía de intercambio de aniones conducentes a la purificación del FvW.

35 La patente EP 0 503 991 divulga un procedimiento de preparación a la escala industrial de un concentrado de FvW que comprende una etapa de prepurificación de una fracción crioprecipitada de plasma y tres etapas sucesivas de cromatografía, siendo la tercera una cromatografía de afinidad en columna de gelatina inmovilizada sobre agarosa. El concentrado de FvW así obtenido muestra una actividad específica superior a 100 UI RCo/mg expresada en unidades de actividad del cofactor de ristocetina por mg de proteína y un índice de multímeros de alto peso molecular comparable al del plasma inicial.

40 La solicitud de patente EP 0 934 748 describe un procedimiento de preparación del FvW que incluye la combinación de cromatografías de intercambio de aniones y de intercambio de cationes. Las fracciones de FvW obtenidas presentan una actividad específica superior a 100 UI de FvW:Ag/mg expresada en unidades de antígeno de FvW por mg de proteína, pero que contienen proporciones más notables de factor VIII.

45 La patente US 6 579 723 describe un procedimiento de preparación de un FvW muy purificado mediante cromatografía de inmutafinidad cuyos inmutafinantes representan anticuerpos dirigidos contra FvW. Se puede preferir igualmente una etapa de purificación adicional mediante cromatografía de afinidad de heparina. Sin embargo, el inconveniente de una purificación por inmutafinidad es la posible presencia de anticuerpos residuales que puedan provocar reacciones inmunológicas.

50 La patente EP 0 383 234 enseña la preparación de un concentrado de FvW pasteurizado mediante cromatografía de intercambio de aniones, que se utiliza con disoluciones ácidas (pH de 5,5 a 6,5) que contienen hidratos de carbono, para fijar el factor VIII en el intercambiador de aniones. La recuperación conjunta de FvW, fibronectina y fibrinógeno no retenidos, mediante lavado del soporte, requiere etapas de precipitación adicionales para aislar un concentrado de FvW purificado.

55 Los procedimientos descritos anteriormente presentan el inconveniente de requerir varias etapas sucesivas, especialmente cromatográficas, lo que supone problemas de rendimiento y lentitud de aplicación a escala industrial.

Pueden utilizar, según los casos, soportes cromatográficos con ligandos de origen animal, tales como a base de gelatina, heparina o colágeno susceptibles de ser vehículo del prion patógeno responsable de la encefalopatía espongiiforme u otros virus específicos de la especie animal considerada. Estas dificultades aumentan debido a la necesidad de incluir en el procedimiento una inactivación viral y, en su caso, etapas adicionales de eliminación de agentes virucidas. Además, los concentrados de FvW obtenidos por dichos procedimientos no están exentos de factor VIII, lo que presenta el inconveniente de riesgos de trombosis en los pacientes. Además, la limpieza o lavado de los soportes de afinidad así como su desinfección sigue siendo difícil debido a la fragilidad del ligando, que impide el uso de disoluciones limpiadoras de propiedades desinfectantes fuertes (lejía, carbonato de sodio, carbonato de potasio, etc.). Finalmente, los soportes de afinidad tienen duraciones bastante cortas y su sustitución frecuente representa una importante carga financiera que aumenta el precio de coste del producto tratado.

Teniendo en cuenta las crecientes necesidades de fracciones de FvW muy puras, el solicitante se ha propuesto poner a punto un procedimiento para la preparación de FvW, cuya aplicación es muy simple, de alto rendimiento, que no requiere el uso de soportes cromatográficos con ligandos de origen animal y que da lugar a un concentrado de FvW de gran pureza, normalizado, con una actividad específica muy elevada y exento de factor VIII.

A este efecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de factor de von Willebrand de pureza muy elevada a partir de una fracción biológica que contiene factor de von Willebrand, caracterizado porque comprende una separación mediante cromatografía de intercambio de aniones usando un soporte de polímero vinílico, de tipo base débil, incluyendo dicha separación las etapas de

- a) carga del soporte cromatográfico con la fracción que contiene el factor de von Willebrand, previamente equilibrado con un tampón adecuado, a un caudal predeterminado, lo que permite la retención del factor de von Willebrand;
- b) lavado del soporte con un tampón ácido con un caudal superior al de la etapa a) hasta eliminar las proteínas y los contaminantes no retenidos;
- c) enjuague y equilibrado del soporte cromatográfico con el tampón y el caudal de la etapa a); y
- d) elución del factor de von Willebrand por aumento en la fuerza iónica del tampón de la etapa c).

De este modo, el solicitante ha descubierto que es posible gracias a un procedimiento muy simple lograr un concentrado de FvW de mayor calidad, con una actividad específica muy elevada y prácticamente exento de factor VIII. El solicitante ha podido demostrar más concretamente que la selección razonada del soporte cromatográfico intercambiador de aniones tipo polímero vinílico y de las condiciones físico-químicas especiales de lavado de este soporte (pH ácido, caudal aumentado) permite separar, en una sola etapa, el FvW retenido por el soporte del resto de proteínas, especialmente el factor VIII, y otros compuestos contaminantes presentes en la fracción biológica que contiene el FvW.

De forma ventajosa, la separación cromatográfica se lleva a cabo sobre un soporte sintético, resina o gel, cuya matriz es de tipo polímero vinílico, representando más preferiblemente un copolímero de oligoetilenglicol, de metacrilato de glicidilo y dimetacrilato de pentaeritritol, en el que se han injertado grupos intercambiadores de aniones de tipo base débil, tales como DEAE. Matrices de este tipo se conocen con la denominación Fractogel®-TSK y, en el contexto de la invención, los soportes intercambiadores de aniones representan en particular el DEAE-Fractogel®-TSK 650, disponible en dos granulometrías, M (rendimiento intermedio) y S (alto rendimiento), y cuyos usos han sido objeto de muchos estudios. El soporte cromatográfico se presenta habitualmente en forma de columnas cromatográficas de dimensiones adaptadas a las aplicaciones deseadas (columna analítica o preparativa).

Por consiguiente, el solicitante ha aprovechado las características de rigidez y de gran tamaño de los poros de este soporte en la aplicación del procedimiento que permite impedir la acumulación de determinadas proteínas con tendencia a precipitar en condiciones ácidas durante la cromatografía, tales como fibronectina y fibrinógeno, evitando de esta forma la colmatación del soporte, sin tener que recurrir a la adición de grandes cantidades de azúcar, como se describe en el documento EP 0 383 234. A este efecto, la no acumulación de estas proteínas se posibilita especialmente por un aumento del caudal durante la fase del lavado, gracias también a un tiempo de relajación importante de éstas para ponerse en las condiciones de pH del tampón ácido, teniendo en cuenta su peso molecular (> 300 kDa), y el hecho de su bajo contenido en las muestras de partida, lo que limita la probabilidad de encuentro que puede conducir a la formación de polímeros o de agregados in situ.

En el contexto de la invención, La fracción biológica que contiene el factor de von Willebrand representa bien plasma humano o bien una fracción de plasma humano crioprecipitado o de sobrenadante de plasma crioprecipitado que sigue conteniendo FvW o se ha obtenido por métodos convencionales de fraccionamiento (Cohn y col., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 y Kistler y col., Vox Sang., 7, 1962, 414-424), que se ha sometido en su caso a un tratamiento de prepurificación tal como por adsorción sobre hidróxido de aluminio, en el que el FvW está complejado junto con el factor VIII, o bien una fracción enriquecida en el complejo factor VIII/FvW recombinante aislado a partir de sobrenadante de cultivos celulares de acuerdo con técnicas conocidas o finalmente de complejo factor VIII/FvW obtenido en la leche de mamíferos transgénicos como se describe en la patente US 6 518 482. De forma especialmente preferida, La fracción de partida representa una fracción de FvW obtenida en una etapa previa de purificación de una fracción del plasma crioprecipitado por vía cromatográfica utilizando un intercambiador de aniones de tipo DEAE-Fractogel®-TSK 650, tal como se describe en las patentes EP 0 359 593 y EP 0 503 991.

Esta etapa previa tiene la ventaja de permitir la recuperación de la mayor parte de las proteínas de interés tales como el factor VIII, fibrinógeno y fibronectina.

5 El tampón de equilibrio (etapa a) o c)) se compone de cloruro de sodio, cuya concentración es preferentemente 0,11 M, y puede comprender además citrato trisódico, cloruro de calcio, glicina y lisina, a un pH de 6,9-7,1, cuyas concentraciones para cada uno de los componentes representan respectivamente, de manera preferida, 0,01 M, 0,001 M, 0,12 M y 0,016 M. Se puede también utilizar cualquier otro tampón, basado en cloruro de sodio, que comprenda otros compuestos biológicamente compatibles siempre que no desnaturalicen el FvW de manera irreversible.

10 Cuando la fracción que contiene el FvW se ha aplicado sobre el soporte cromatográfico, se procede a su lavado por percolación del tampón ácido (etapa b)). El tampón ácido está ventajosamente compuesto de una sal alcalina o alcalinotérrica de ácido acético, cítrico o fosfórico, a una concentración comprendida entre 10 y 30 mM, pH comprendido entre 3,9 y 5,2, y representa preferentemente un tampón acetato de sodio 20 mM de pH 4,35 aproximadamente. Esta etapa de lavado permite el paso al filtrado de proteínas presentes en la fracción biológica de partida, tales como fibronectina, fibrinógeno, Factor VIII, etc., y contaminantes no retenidos o poco retenidos por el soporte. Se realiza por aumento del caudal aplicado a la etapa a). De esta manera se evita la acumulación de proteínas y contaminantes con tendencia a precipitar, sin la necesidad de añadir los azúcares que sería necesario eliminar posteriormente. El caudal de la presente etapa de lavado se selecciona razonadamente para obtener el efecto buscado, asegurándose de que éste no altere las propiedades físico-químicas del soporte cromatográfico por sus valores excesivos. Preferentemente, el caudal de lavado corresponde a un valor superior al de la etapa de equilibrado a) en un factor de aproximadamente 1,5 a 2. La duración del lavado viene determinada por medida de la densidad óptica (DO) del filtrado a la longitud de onda de 280 nm. En efecto, un valor de DO correspondiente al valor inicial es una buena indicación de la eliminación eficaz de los compuestos anteriormente citados del soporte y su salida de la columna cromatográfica.

15 20 25 30 Tras regresar al valor inicial, se disminuye el caudal al valor de la etapa a) y la elución del FvW (etapa d)) se lleva a cabo mediante el uso del tampón de la etapa a) cuya fuerza iónica se ha aumentado. Este aumento de la fuerza iónica se lleva a cabo ventajosamente por adición de cloruro de sodio cuya concentración final se lleva a 0,15-0,17 M. La utilización de acuerdo con la invención del soporte cromatográfico de matriz de polímero vinílico de acuerdo con la invención, de naturaleza ligeramente hidrófoba, permite la separación del FvW de las impurezas y/o proteínas adjuntas, tales como fibronectina. De forma sorprendente, el FvW obtenido mediante el procedimiento carece también de Factor VIII.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede adaptarse a volúmenes de plasma de aproximadamente 4000 litros.

35 El procedimiento puede incluir al menos una etapa de tratamiento de inactivación vírica de la fracción que contiene FvW a purificar. De este modo, esta se puede someter a un tratamiento clásico de inactivación vírica mediante disolvente-detergente, en presencia de agentes de inactivación tales como Tween®-TNBP, antes de la etapa cromatográfica, permitiendo esta última eliminar totalmente los productos residuales de esta etapa de descontaminación.

40 45 En particular, una vez se ha recogido la fracción de FvW, se puede someter a diversos tratamientos destinados a proporcionarle calidad terapéutica. De este modo, después de la etapa d), el procedimiento puede comprender una o varias etapas adicionales de filtración esterilizante convencional seguida de una eliminación vírica, tal como nanofiltración en un filtro de 35 nm. A continuación, la fracción de FvW se puede diafiltrar para incorporar los excipientes adecuados destinados a permitir un calentamiento en seco del FvW sin riesgo de desnaturalización, concentrarse mediante ultrafiltración, acondicionarse en recipientes y liofilizarse, después de la adición previa de un estabilizante adicional farmacéuticamente aceptable, tal como la albúmina. Finalmente, los liofilizados se someten a una última etapa de inactivación vírica por calentamiento en seco del liofilizado de acuerdo con las condiciones convencionales, a 80°C durante 72 horas, para la inactivación de virus no encapsulados que no se inactivaron ni eliminaron en al menos una de las dos etapas de inactivación y/o de eliminación de virus anteriores. Los liofilizados calentados en seco se reconstituyen en un medio acuoso compatible para uso clínico, preferentemente en 10 ml de agua purificada para inyección (PPI) y se pueden inyectar directamente por vía intravenosa.

50 De este modo, la aplicación del procedimiento, después de la etapa de ultrafiltración, conduce a un concentrado de FvW muy purificado, de calidad terapéutica, que tiene una actividad específica (A.S.) de al menos 90 UI RCo/mg de proteína. Además, El cociente R, que representa Factor VIII:C/FvW: RCo, es inferior a 0,06%. Este resultado revela que el concentrado de FvW carece de factor VIII o tiene solamente dosis muy pequeñas.

55 El grado total de purificación del presente procedimiento es superior a 10 000, cuando se utiliza una fracción biológica de plasma.

El producto final de FvW obtenido, es decir, el liofilizado de FvW caliente reconstituido en agua PPI, tiene un índice de multímeros, medido con respecto al método 0275 de la Farmacopea Europea, comparable al del plasma, que es del 70%. Las tasas residuales de TNBP y Tween® se ajustan también a los valores fijados por la Farmacopea

Europea.

La estabilidad del concentrado de FvW (después de la ultrafiltración) se ha estudiado durante 24 horas a temperatura ambiente: no se detecta ninguna traza de proteólisis. Además, el producto final liofilizado de FvW sigue siendo estable durante un período de almacenamiento de aproximadamente dos años a 30°C y seis meses a 40°C. Tiene una capacidad de enlace al Factor VIII similar al del FvW presente en el plasma natural.

Los ejemplos siguientes ilustran realizaciones de la presente invención sin limitar su alcance en forma alguna.

### Ejemplo 1

#### 1) Obtención de una fracción que contiene FvW

Se utiliza un crioprecipitado de plasma humano resuspendido en una disolución acuosa de heparina sódica (a 2 U/ml), a un pH de 7-7,1.

Esta suspensión del crioprecipitado se somete a una prepurificación con hidróxido de aluminio para eliminar los principales contaminantes, tal como se describe en la patente EP 359 593. El sobrenadante prepurificado se recupera y se somete a un tratamiento de inactivación vírico convencional mediante disolvente-detergente, en presencia de Tween®- TNBP.

La disolución de crioprecipitado precipitado prepurificado se inyecta a continuación en una columna cromatográfica de Fractogel® TSK-DEAE 650 (M) de 25 cm de longitud y de 1 cm de diámetro, previamente equilibrada en tampón constituido por citrato trisódico 0,01 M, cloruro de calcio 0,001 M, cloruro de sodio 0,11 M, glicina 0,12 M y lisina 0,016 M, ajustado a pH 7,01, cuya velocidad lineal de la fase móvil se fija a 100 cm/hora. El FvW, el factor VIII y la fibronectina quedan retenidos en el soporte cromatográfico. Las proteínas poco o nada retenidas en el soporte, principalmente el fibrinógeno y las IgG, se elimina en el filtrado, así como los Tween® y TNBP, mediante varios lavados sucesivos con el mismo tampón.

Cuando la DO, medida a 280 nm, vuelve a su valor inicial, se aumenta la concentración de cloruro de sodio del tampón a 0,15 M. En estas condiciones, el FvW se eluye. El eluato así obtenido está muy enriquecido en FvW y fibronectina, y sigue conteniendo Tween® y TNBP, así como factor VIII residual.

#### 2) Separación cromatográfica

La fracción enriquecida FvW anteriormente eluida, que constituye un lote de fracción de partida que contiene el FvW de acuerdo con la invención, se carga en una columna cromatográfica de DEAE-Fractogel®-TSK-650 (M) de 25 cm de longitud y de 1 cm de diámetro, previamente equilibrada en tampón idéntico al de 1), con una osmolaridad de 387 mosmolkg<sup>-1</sup>, cuya velocidad lineal se fija a 100 cm/hora. Se inyectan 140 ml de esta fracción que contiene 12,9 UI de FvW/ml y 6,6 UI de Factor VIII/ml, es decir, un cociente R de 51,1% (R= FVIII:C/FvW:RCo).

A continuación la columna se lava con un tampón ácido de acetato de sodio 20 mM ajustado a pH 4,35 y 80 mosmolkg<sup>-1</sup>, con una velocidad lineal de 150 cm/hora. En estas condiciones, se garantiza una eliminación muy buena no solamente de los residuos de los agentes de inactivación vírica, sino también de la fibronectina y, sobre todo, del factor VIII que seguía complejoado con el FvW, sin observar precipitación de dichas proteínas en la columna. Cuando la DO vuelve a su valor inicial, se vuelve a poner la velocidad lineal a 100 cm/hora y a continuación se enjuaga la columna y se equilibra con el mismo tampón que anteriormente, que contiene NaCl a 0,11 M.

La elución de la fracción que contiene el FvW se lleva a cabo por aumento de la concentración de NaCl en el tampón de equilibrado a 0,17 M, ajustado a pH 6,95 y 492 mosmolkg<sup>-1</sup>.

La fracción eluida de FvW se somete a continuación a los tratamientos convencionales de filtración esterilizante en filtros de 0,22 µm, nanofiltración en filtros de 35 nm, diafiltración contra una disolución que contiene arginina, al menos un aminoácido hidrófobo y citrato trisódico, tal como ha descrito el solicitante en la solicitud de patente FR 03 08403, y de ultrafiltración de acuerdo con las técnicas conocidas, de manera que el concentrado de FvW muestra una actividad específica (A.S.) de al menos 90 UI RCo/mg de proteína.

Los concentrados de FvW reciben una adición de albúmina a 10 g/l y a continuación se liofilizan a -40°C durante 48 horas. La liofilización va seguida de un tratamiento térmico de inactivación vírica por calentamiento en seco del liofilizado a 80°C durante 72 horas.

Para comparar los resultados del procedimiento de acuerdo con la invención en lo que respecta a la calidad del concentrado de FvW obtenido en términos de actividad específica, contenido residual en diversos contaminantes proteínicos, especialmente el factor VIII, se han llevado a cabo comparaciones con el concentrado de FvW obtenido por aplicación del procedimiento descrito en la patente EP 0 503 991, denominado procedimiento A.

La aplicación del procedimiento de acuerdo con esta patente comprende los siguientes pasos consistentes en:

- hacer pasar un lote de fracción de FvW obtenido después de la primera separación cromatográfica descrita en 1) En una segunda columna cromatográfica de 25 cm de longitud y de 1 cm de diámetro que contienen del DEAE-Fractogel®- TSK 650 (M) en las condiciones de aplicación que se describen en 1) (tampón, velocidad lineal idénticos);
- eliminar el filtrado y enjuagar la columna con el tampón de equilibrado,
- eluir el FvW por aumento de la concentración de NaCl en el tampón de equilibrado a 0,17 M,
- someter el eluato de FvW a una etapa de purificación adicional en una columna cuyo soporte cromatográfico es del tipo gelatina inmovilizada sobre agarosa equilibrada en tampón de equilibrado destinada a eliminar la fibronectina residual.

El eluato de esta última etapa cromatográfica se somete a continuación a tratamientos de filtración esterilizante idénticos, filtración de eliminación vírica, de diafiltración, de ultrafiltración, de adición de albúmina, de liofilización y calentamiento en seco.

La Tabla 1 presenta los resultados de los rendimientos de preparación de las fracciones de FvW expresados en UI RCo/mg de proteína, en diversos estadios del procedimiento de acuerdo con la invención y de acuerdo con A, es decir, después de todas las cromatografías, ultrafiltración, y después de la liofilización, calentamiento en seco (80°C, 72 horas) y reconstitución en 10 ml de agua purificada para inyección (PPI). Se someten a los mismos tratamientos de ultrafiltración y de calentamiento en seco del liofilizado de la fracción de FvW de partida seguido de una redisolución en 10 ml de agua PPI. Los rendimientos se expresan en forma de cociente:

$$R1 = \frac{\text{A.S. de la fracción de FvW de partida}}{\text{A.S. de la fracción de FvW después de las cromatografías}}$$

$$R2 = \frac{\text{A.S. de la fracción de FvW de partida ultrafiltrada}}{\text{A.S. de la fracción de FvW de partida}}$$

$$R3 = \frac{\text{A.S. del liofilizado de FvW de partida calentado}}{\text{A.S. del liofilizado de FvW de partida}}$$

Los A.S. (UI RCo/mg), medidos en el concentrado de FvW y los contenidos de fibronectina residual (TFR) correspondientes también se indican.

Los valores dados representan los valores promedio de seis ensayos.

Tabla 1

n = 6	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	As*	TFR µg/UIFvW:R Co
fracción de FvW de acuerdo con la invención	87 ± 5	97,9 ± 5,2	84,1 ± 6,1	98,7 ± 5,6	< 0,04
fracción de FvW de acuerdo con A	-	89,4 ± 5,7	84,1 ± 11,6	98,3 ± 14,5	< 0,04
*: A.S. obtenido para el concentrado de FvW					

Los dos procedimientos son comparables y proporcionan concentrados de FvW con un rendimiento satisfactorio y un A.S. elevado en ambos casos.

La Tabla 2 presenta los resultados de los diferentes ensayos destinados a evaluar el tipo de contaminantes proteínicos y químicos residuales presentes en un liofilizado de FvW calentado en seco y redisueltos en 10 ml de agua PPI, obtenido de acuerdo con la invención (Producto I) y de acuerdo con A (Producto II). Los valores dados representan los valores promedio de seis ensayos.

Tabla 2

	Producto I	Producto II
Actividad VIII:C (UI/ml)	0,035 ± 0,025	1,8 a 9,2
R	0,035 ± 0,025	1,84 a 8,85

(continuación)

	Producto I	Producto II
Contenido en proteínas (g/l)	9-10	11,25 ± 0,25
Contenido de Tween® (mg/l)	< 20	< 20
Contenido en TNBP (mg/l)	< 0,1	< 0,1

Entre el concentrado obtenido de acuerdo con el procedimiento A y el obtenido de acuerdo con la invención aparece una diferencia considerable en lo que respecta al cociente R (FVIII:C/FvW:RCo). En efecto, el concentrado obtenido de acuerdo con la invención está prácticamente exento de FVIII:C dosificable.

- 5 La Tabla 3 presenta los resultados de los rendimientos, actividades específicas y contenidos en fibronectina residual, obtenidos a partir de un mismo lote de fracción de partida de FvW, dividido en dos fracciones iguales de FvW, de la que una se ha sometido al procedimiento de acuerdo con la invención y la otra fracción se ha sometido al procedimiento de acuerdo con A. Los rendimientos se han determinado en diferentes estadios de los procedimientos de acuerdo con las condiciones descritas para los resultados de la Tabla 1. Los valores dados representan los valores promedio de seis ensayos.

Tabla 3

n = 6	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	As*	TFR µg/UIFvW:R Co
fracción de FvW de acuerdo con la invención	89 ± 10	88 ± 12	86,3 ± 9,2	98,7 ± 5,6	< 0,04
fracción de FvW de acuerdo con A	87 ± 10	76,3 ± 7,5	70 ± 8	98,3 ± 14,5	< 0,04
*: A.S. obtenido para el concentrado de FvW					

Los resultados de la Tabla 3 indican claramente que la calidad del producto final de FvW obtenido por el procedimiento de la invención es al menos igual a la obtenida con el procedimiento de acuerdo con A, y que los rendimientos son comparables.

- 15 La Tabla 4 presenta el contenido en diversas proteínas presentes en una fracción de FvW liofilizada y calentada en seco y redisuelta en 10 ml de agua PPI, obtenida con el procedimiento de la invención (Producto III) y de acuerdo con el procedimiento A (Producto IV). Los valores dados representan los valores promedio de tres ensayos.

Tabla 4

n = 3	Producto III	Producto IV
FvW (µg/ml)	1022 ± 57	1015 ± 72
FVIII (µg/ml)	0,14 ± 0,08	1,82 ± 0,53
Fibrinógeno (µg/ml)	8,2 ± 5,2	3,5 ± 1,2
Fibronectina (µg/UI FvW:RCo)	> 0,04	> 0,04
Inmunoglobulina G (µg/ml)	1,93 ± 0,71	4,23 ± 0,95
Inmunoglobulina A (µg/ml)	1,4	2,23 ± 0,46
Inmunoglobulina M (µg/ml)	< 8,5	28,8 ± 8,9
Inhibidor de inter-α-tripsina (µg/ml)	14,83 ± 5,25	1,93 ± 0,83
Plasminógeno (µg/ml)	0,006	0,0106 ± 0,0022
Proteína C (µg/ml)	< 2,5	< 2,5

- 20 Los resultados de la Tabla 4 muestran que la fracción de FvW de acuerdo con la invención presenta un contenido claramente inferior en FVIII y en inmunoglobulinas M comparada con la obtenida por la aplicación del procedimiento A. En cambio, contiene más cantidad de Inhibidor de inter-α-tripsina (ITI), lo que no es perjudicial para las propiedades terapéuticas del concentrado de FvW, contrariamente al parámetro de contenido en FVIII mensurable.

### Ejemplo 2

- 25 Se utilizan diversas fracciones que contienen FvW obtenidas a partir de un crioprecipitado sometido al tratamiento explicado en el Ejemplo 1. 1). Estas fracciones de FvW se han ajustado de tal manera que contienen tasas variables

## ES 2 450 967 T3

del cociente R (FVIII:C/FvW:RCo) inicial, en una gama de valores comprendida entre 30% y aproximadamente 120%.

5 Estas fracciones se someten a continuación a una separación cromatográfica de acuerdo con la invención y de acuerdo con el procedimiento A y los diversos tratamientos proporcionan liofilizados calentados en seco y redisueltos en agua PPI, de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1. 2).

Los resultados de los rendimientos se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5

R inicial	32,6%	51%	64,6%	120,8%
Rendimiento de FvW de acuerdo con A (%)	92,9	47,4	46,8	97,4
Rendimiento de FvW de acuerdo con la invención (%)	93,1	53,4	95,7	104
R de acuerdo con A (%)	8,8	22,8	10,6	21,3
R de acuerdo con la invención (%)	0	0,05	0	0

La aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención conduce, por tanto, a una eliminación casi total del FVIII garantizando un mayor rendimiento de producción.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un concentrado de factor de von Willebrand de pureza muy elevada a partir de una fracción biológica que contiene factor de von Willebrand, **caracterizado porque** comprende una separación mediante cromatografía de intercambio de aniones usando un soporte de polímero vinílico, de tipo base débil, incluyendo dicha separación las etapas de a) - carga del soporte cromatográfico con la fracción que contiene el factor de von Willebrand, previamente equilibrado con un tampón adecuado, a un caudal predeterminado, lo que permite la retención del factor de von Willebrand;
- 5
- b) - lavado del soporte con un tampón ácido con un caudal superior al de la etapa a) hasta eliminar las proteínas y los contaminantes no retenidos;
- 10 c) - enjuague y equilibrado del soporte cromatográfico con el tampón y el caudal de la etapa a); y
- d) - elución del factor de von Willebrand por aumento en la fuerza iónica del tampón de la etapa c).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la separación cromatográfica se lleva a cabo sobre un soporte de tipo polímero vinílico injertado con grupos intercambiadores de aniones que representan el DEAE.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el soporte cromatográfico representa un copolímero de oligoetilenglicol, metacrilato de glicodiilo y metacrilato de pentaeritrol en el que se han injertado grupos intercambiadores de aniones de tipo base débil, tales como DEAE.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el tampón de equilibrio (etapa a) o c)) se compone de cloruro de sodio.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la concentración de cloruro de sodio es de 0,11 M.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, **caracterizado porque** el tampón de equilibrado comprende además citrato trisódico, cloruro de calcio, glicina y lisina, con un pH comprendido entre 6,9 y 7,1.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** las concentraciones de los componentes del tampón de equilibrado representan respectivamente, 0,01 M, 0,001 M, 0,12 M y 0,016 M.
- 25 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el tampón ácido de lavado está ventajosamente compuesto de una sal alcalina o alcalinotérrica de ácido acético, cítrico o fosfórico, en una concentración comprendida entre 10 y 30 mM y un pH comprendido entre 3,9 y 5,2.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado porque** el tampón ácido de lavado representa un tampón acetato de sodio 20 mM y pH 4,35.
- 30 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el caudal en la etapa de lavado corresponde a un valor superior al de la etapa de equilibrado a) en un factor de aproximadamente 1,5 a 2.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** en la etapa d), la fuerza iónica del tampón de la etapa c) está aumentada por adición de cloruro de sodio cuya concentración final se lleva a 0,15-0,17 M.
- 35 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** comprende una etapa de inactivación vírica de la fracción biológica por disolvente-detergente.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** comprende después de la etapa de elución d), una o varias etapas adicionales de
- 40 - filtración esterilizante,  
- filtración de eliminación vírica,  
- diafiltración,  
- ultrafiltración de concentración,
- 45 - adición de un estabilizante farmacéuticamente aceptable,  
- liofilización,  
- calentamiento en seco de inactivación vírica y,  
- reconstitución del liofilizado caliente en un medio acuoso compatible para uso clínico.