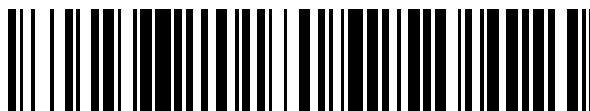


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 284**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2008 E 08754504 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2152735**

54 Título: **Procedimiento de producción de VWF maduro a partir del propéptido de VWF**

30 Prioridad:

**18.05.2007 US 930891 P**

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

**29.06.2015**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)**

**One Baxter Parkway  
Deerfield, IL 60015, US y**

**BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MUNDT, WOLFGANG;**

**MITTERER, ARTUR;**

**HASSLACHER, MEINHARD y**

**MAYER, CHRISTA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 539 284 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 producción de VWF maduro a partir del propéptido de VWF

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de producción de Factor de von Willebrand maduro a partir del propéptido del Factor de von Willebrand.

### Descripción de la técnica relacionada

10 En el curso de la maduración de las proteínas dentro de una célula, la proteína a madurar experimenta modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones incluyen, entre otras, acetilación, metilación, glucosilación y escisión proteolítica. Estas modificaciones son, en muchos casos, necesarias para la función y la actividad de la proteína y también pueden influir en la eficacia de las proteínas, en particular de las enzimas.

Las proproteínas (o precursores de proteínas) son proteínas inactivas que se convierten en una forma activa mediante una o más de estas modificaciones postraduccionales, en particular mediante la escisión de un propéptido de la proproteína. Los ejemplos de proproteínas incluyen, por ejemplo, proinsulina, protrombina, etc.

15 La producción de proteínas activadas es de gran importancia clínica y diagnóstica. Por ejemplo, pueden usarse proteínas activadas o maduras para controlar la coagulación sanguínea.

Las proteínas activas están habitualmente disponibles en cantidades muy bajas en organismos vivos. Por lo tanto, sus proproteínas y proenzimas se activan preferentemente *in vitro* poniéndolas en contacto con enzimas activadoras (por ejemplo, proteasas).

20 Los procedimientos actuales de producción de proteínas maduras a partir de proproteínas usan proteasas inmovilizadas o se realizan en solución libre. Ambos procedimientos tienen desventajas. Entre estas está el requerimiento de que la proteasa se inmovilice después del procesamiento.

25 El factor de Von Willebrand (VWF) es una glucoproteína que circula en el plasma como una serie de multímeros cuyo tamaño varía de aproximadamente 500 a 20.000 kD. Las formas multiméricas del VWF están compuestas de subunidades de 250 kD que se unen entre sí mediante puentes disulfuro. El VWF media la adhesión inicial de plaquetas al subendotelio de la pared de los vasos dañados; se cree que únicamente los multímeros más grandes muestran también actividad hemostática. Los multímeros que tienen masas moleculares grandes están almacenados en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan tras la estimulación. El VWF liberado se procesa entonces adicionalmente por las proteasas del plasma para dar como resultado formas de VWF de bajo peso molecular.

30 El VWF se sintetiza por las células endoteliales y los megacariocitos como un pre-propéptido de VWF ("pp-VWF") que consiste en una larga extensión de dominios repetidos. Después de la escisión del péptido señal, el propéptido de VWF dimeriza a través de enlaces disulfuro en su región C-terminal. Los dímeros sirven como protómeros para la multimerización, que está dirigida por enlaces disulfuro entre los extremos terminales libres. El ensamblaje hasta multímeros está seguido por la eliminación proteolítica del propéptido (Leyte y col., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

35 Se ha postulado que el papel fisiológico del propéptido de VWF yace en la dirección del ensamblaje de los multímeros de VWF, bien antes o después de la escisión de las moléculas del propéptido de VWF. (Takagi y col., JBC 264 (18) (1989), 10425-10430. Mientras que la eliminación del propéptido es casi completa en seres humanos, este procedimiento no es muy eficaz en el caso de niveles muy altos de expresión recombinante de VWF en líneas celulares de mamíferos. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de dichas líneas celulares modificadas generalmente comprenden una mezcla de VWF maduro y precursores de VWF como el propéptido de VWF. Con el fin de obtener el VWF maduro es, por lo tanto, necesario convertir los precursores de VWF, en particular el propéptido de VWF, en VWF maduro. En el documento EP 0 775 750 A, por ejemplo, esta maduración se alcanza usando furina. En particular, en el documento EP 0 775 750 A se sugiere la co-expresión de furina y VWF recombinantemente de modo que pueda ocurrir la maduración de VWF *in situ*. En el documento WO 00/49047 se describe un procedimiento de producción de VWF maduro usando trombina, en el que se realiza la maduración en solución o usando trombina unida a un soporte sólido.

### Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un procedimiento de producción de Factor de von Willebrand Maduro (VWF) a partir del propéptido del Factor de von Willebrand que comprende las etapas de:

- 50
- (a) inmovilizar el propéptido de VWF en una resina de intercambio aniónico,
  - (b) incubar el propéptido VWF inmovilizado con furina que comprende una actividad de al menos 0,2 Unidades de furina/Unidad de antígeno (Ag) de VWF para obtener VWF maduro inmovilizado, y
  - (c) aislar al menos el 90 % del VWF maduro de la resina de intercambio aniónico mediante elución.

La presente invención proporciona un procedimiento eficaz para producir Factores de von Willebrand (VWF) maduros a partir del propéptido de VWF. La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para producir VWF maduro mediante la inmovilización del propéptido de VWF en una resina de intercambio iónico, seguida por la maduración del propéptido de VWF unido con furina y la elución del VWF madurado de la resina de intercambio iónico. El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para la maduración in vitro del VWF a partir del propéptido de VWF. Este procedimiento permite la producción de VWF maduro con una actividad específica y pureza alta.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig.1 muestra la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  de la actividad de la furina.

La Fig.2 muestra la dependencia de la eficacia de maduración de la concentración de VWF. Se disolvieron 5 ml de VWF en tampón de resolubilización (citrato 100 mM, HEPES 100 mM,  $\text{pH}=7,0$ ), se enriquecieron con 5 Unidades de furina/U de VWF y se incubaron durante 22 h a 37 °C. Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE en geles al 8% y se visualizaron los péptidos separados mediante tinción de plata.

línea 1: 1 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 0 h  
 línea 2: 5 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 0 h  
 línea 3: 10 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 0 h  
 línea 4: 1 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 6 h  
 línea 5: 5 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 6 h  
 línea 6: 10 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 6 h  
 línea 7: 1 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 24 h  
 línea 8: 5 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 24 h  
 línea 9: 10 U/ml de VWF + 5 U/U de furina 24 h

La Fig.3 muestra la dependencia de la eficacia de maduración de la concentración de VWF. Se disolvieron 5 ml de VWF en tampón de resolubilización (citrato 100 mM, HEPES 100 mM,  $\text{pH}=7,0$ ), se enriquecieron con 0,4-0,5 Unidades de furina/U de VWF y se incubaron a 37 °C. Se recogieron las muestras a T = 0, 20 y 24 horas. Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE en geles al 8 % y los polipéptidos separados se visualizaron mediante tinción de plata.

línea 1: 10 U/ml de VWF  
 línea 2: VWF + 0,5 U/U de furina 0 h  
 línea 3: VWF + 1 U/U de furina 0 h  
 línea 4: VWF + 2 U/U de furina 0 h  
 línea 5: VWF + 2,5 U/U de furina 0 h  
 línea 6: VWF + 4 U/U de furina 0 h  
 líneas de 7-11: como anteriormente, 20 h  
 líneas de 12-16: como anteriormente, 24 h.

La Fig.4 muestra los eluatos del TMAE después de la maduración en columna. El flujo de MAB a través del material que contenía VWF/propéptido de VWF se bombeó en la columna a aproximadamente 180 - 220 Unidades de Ag de VWF/ml de resina y propéptido de VWF A /VWF antes de la maduración

1 CR38-E1+E2 (2,4 U de furina/U de VWF; 3 h a 37°C; FUR24\_04\_UFK\_02; gradiente de elución  
 2 CR30-E1 + E2 (3,2 U de furina/U de VWF; 1 h a 37°C; FUR\_UF06\_01 (clon 488-3); gradiente de elución  
 3 CR36-E, (7,8 U de furina/U de VWF; 4 h a 37°C; FUR\_015 (pre-purificado en TMAE), etapa de elución  
 4 CR37-E, (5,8 U de furina/U de VWF; 8 h a 4°C; FUR\_UF06\_01 (clon 488-3), lote de elución  
 5 CR38-E1+E2 (4,8 U de furina/U de VWF; 8 h a 4°C; FUR\_018 (pre-purificado en TMAE), gradiente de elución

### **Descripción detallada de la invención**

El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para la maduración in vitro del VWF a partir de su forma de propéptido de VWF. Los procedimientos convencionales actuales producen VWF maduro bien incubando su forma de propéptido con proteasas en una fase líquida, por lo que la maduración en sí misma (es decir, la escisión del propéptido a partir de la proteína) ocurre en un estado no unido en solución libre, o tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/49047, inmovilizando la proteasa en un transportador sólido, que se pone en contacto y se incuba con una preparación que comprende el propéptido de VWF (véase, por ejemplo, el documento WO 00/49047). Sin embargo, estos procedimientos tienen diversas desventajas frente al procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Industrialmente, el VWF, en particular el VWF recombinante (rVWF), se sintetiza y se expresa junto con rFVIII en una línea de células CHO genéticamente modificadas. La función del rVWF co-expresado es estabilizar el rFVIII en el procedimiento de cultivos celulares. El rVWF se sintetiza en la célula como la proforma que contiene un propéptido grande unido al extremo N-terminal. Tras la maduración en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, el propéptido se escinde mediante la acción de la proteasa celular furina y se secreta como un homopolímero de

subunidades idénticas, que consisten en dímeros de la proteína expresada. Sin embargo, la maduración es incompleta, conduciendo a un producto que comprende una mezcla de propéptido y VWF maduro.

Debido a la alta eficacia del procedimiento de la presente invención, el propéptido de VWF inmaduro que se expresa durante el procedimiento de síntesis recombinante se convierte sustancialmente completamente en VWF maduro.

5 Una preparación obtenible por este procedimiento puede comprender al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 %, incluso más preferentemente al menos el 99 %, de VWF maduro con respecto a su forma de propéptido de VWF.

Se ha mostrado en publicaciones anteriores que puede convertirse el propéptido de VWF en la forma madura mediante el tratamiento *in vitro* con furina o proteasas similares a furina (Schlokot U. y col. (1996) Biotechnol. Appl. Biochem. 24:257-267; Preininger A. y col. (1999) Cytotechnology 30:1-15). La furina pertenece a la familia de las convertasas de proproteínas y es dependiente de  $Ca^{++}$ . Esta enzima escinde específicamente el enlace peptídico del extremo C-terminal de arginina dentro de una secuencia específica, que contiene arginina en las posiciones -1 y -4. Puede encontrarse esta secuencia en numerosas proteínas humanas, mostrando que la furina juega un papel principal en la maduración de una serie de proteínas de propéptidos humanos.

10 La furina usada en el procedimiento de la presente invención es preferentemente de origen recombinante. Las proteasas producidas recombinantemente se emplean ventajosamente debido a que estas pueden producirse en altas cantidades.

Al contrario que en los procedimientos convencionales, el propéptido de VWF está inmovilizado en un soporte sólido (es decir, resina de intercambio iónico) de un modo en el que la proteína madura permanecerá inmovilizada en dicho soporte después de su reacción de maduración. Esto tiene varias ventajas sobre los procedimientos que se conocen en la técnica.

El procedimiento de la presente invención combina una etapa de purificación, preferentemente una etapa de purificación cromatográfica, con la reacción de maduración del propéptido de VWF. Por lo tanto, no se requiere una etapa de procedimiento separada para eliminar el propéptido o la proteasa. A diferencia del mismo, los procedimientos conocidos en la técnica siempre requerían que la proteína madurada se purificara adicionalmente bien a partir de la mezcla de proteína/proteasa/propéptido o de la mezcla de proteína/propéptido. El propéptido de VWF en el procedimiento de la presente invención está comprendido preferentemente en el flujo continuo o se recoge del soporte sólido mediante al menos una etapa de lavado, mientras que la proteína madurada permanece unida al soporte sólido a lo largo de este procedimiento. De este modo, el procedimiento de la presente invención aumenta la economía del procedimiento en comparación con los procedimientos de la técnica anterior y facilita la producción de una proteína madura a partir de su forma de propéptido.

Una ventaja adicional del procedimiento de acuerdo con la presente invención es que la furina puede obtenerse a partir del sobrenadante del cultivo celular en bruto de una línea celular que secreta dicha proteasa o extracto celular. Por lo tanto, no se requiere o solo se requiere la purificación parcial de la convertasa de proproteínas con el fin de madurar la proproteína unida a la resina de intercambio iónico.

Después de la maduración del propéptido de VWF hasta VWF maduro, la proteína madura inmovilizada en la resina de intercambio aniónico puede lavarse para eliminar las moléculas no deseadas de la resina. Estas moléculas incluyen el propéptido de VWF u otras proteínas y compuestos añadidos a dicha resina durante la incubación.

El procedimiento de la presente invención se termina cuando la proteína del VWF madura se eluye de la resina de intercambio aniónico. Esto es particularmente ventajoso debido a que permite la purificación del VWF maduro en la resina de intercambio aniónico sin la necesidad de etapas de procedimiento adicionales. Esto también permite la adición de etapas de lavado, por ejemplo para eliminar el propéptido de VWF, antes de la elución. Por lo tanto, la elución del presente procedimiento puede alcanzarse usando un tampón de elución con las propiedades deseadas y no con un tampón o solución que se requiera para activar el propéptido de VWF.

45 Debido a que el propéptido de VWF puede producirse recombinantemente en grandes cantidades, ésta es la fuente preferida de propéptido de VWF en el procedimiento de la presente invención. Sin embargo, el propéptido de VWF que se usa en la presente invención no se limita únicamente a aquel que se obtiene recombinantemente. El presente procedimiento puede usarse con el propéptido de VWF obtenido de cualquier fuente, incluyendo, pero sin limitación plasma, una fracción de plasma y una solución derivada de los mismos. El propéptido de VWF a madurar de acuerdo con la presente invención puede originarse de diversas fuentes, por lo que el VWF puede proporcionarse en una forma purificada, parcialmente purificada o incluso no purificada. Si el propéptido de VWF se proporciona en una forma parcialmente purificada o no purificada se considerará que algunos componentes (impurezas) pueden inhibir o inhibir parcialmente el procedimiento de maduración.

55 Dado que se prefiere usar en el procedimiento de la presente invención propéptido de VWF de origen recombinante, la solución que contiene el propéptido de VWF puede ser un sobrenadante de cultivo preparado a partir de un cultivo celular recombinante. Por supuesto, también es posible que la fuente del propéptido de VWF de la presente invención comprenda un propéptido de VWF parcialmente purificado producido recombinantemente, que puede usarse para la maduración.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la resina de intercambio aniónico comprende grupos trimetil-aminoetilo (TMAE). También son adecuadas otras resinas de intercambio aniónico que se conocen en la técnica que son capaces de unirse al propéptido de VWF.

5 Con el fin de facilitar el procedimiento de maduración y proporcionar el propéptido de VWF inmovilizado en la resina a una concentración elevada, en una realización de la invención, se empaqueta la resina cromatográfica en una columna cromatográfica. Dado que la concentración del propéptido de VWF en el curso de su maduración *in vitro* influye en la eficacia de maduración, es ventajoso empaquetar la resina cromatográfica en una columna. Además, el uso de columnas cromatográficas permite el control eficaz de los parámetros de maduración de un modo más reproducible y hace más sencillo que se realice la maduración de VWF *in vitro*.

10 Si el propéptido de VWF se inmoviliza en una resina de intercambio aniónico y se incuba con una solución que muestra actividad de convertasa del propéptido de VWF, la conductividad medida a 25 °C es, en una realización de la invención, inferior a 25 mS/cm, en una realización de la invención inferior a 20 mS/cm, y en otra realización de la invención inferior a 16 mS/cm.

15 El propéptido de VWF, así como, VWF pueden inmovilizarse eficazmente en resinas de intercambio aniónico a estos niveles de conductividad. Por consiguiente, los tampones aplicados en el curso del presente procedimiento tienen que adaptarse del modo correspondiente.

El VWF maduro se eluye de la resina de intercambio aniónico a una conductividad, medida a 25 °C, en una realización de la invención, de al menos 40 mS/cm, en otra realización de la invención, al menos 60 mS/cm, y en otra realización de la invención, al menos 80 mS/cm,

20 Por supuesto es posible aplicar etapas de lavado adicionales antes de eluir el VWF maduro de la resina de intercambio aniónico.

De acuerdo con una realización de la invención, la furina además comprende  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 0,01 a 10 mM, de acuerdo con otra realización, a una concentración de 0,1 a 5 mM; y de acuerdo con otra realización, a una concentración de 0,2 a 2 mM.

25 Para su actividad proteolítica, muchas proteasas necesitan cofactores como iones metálicos bivalentes. La furina requiere iones de calcio para su actividad. Por lo tanto, si se usa la furina para activar el VWF *in vitro*, se usan sales de calcio. La sal de calcio más preferida es el cloruro de calcio.

30 El tiempo de incubación de la furina con el propéptido de VWF inmovilizado puede variar dependiendo del sistema usado. También factores como la temperatura, tampones, etc. influyen en la eficacia del procedimiento de maduración. Sin embargo, una persona experta en la técnica es capaz de identificar y elegir el tiempo de incubación más apropiado. Generalmente, el procedimiento de maduración se termina en menos de 48 horas y tan solo 1 min o menos puede ser ya suficiente para producir VWF maduro a partir de su proforma. Debido a la alta especificidad de la furina, no ocurre la "sobreactivación" de VWF (degradación proteolítica adicional) incluso después de un tiempo de incubación prolongado.

35 De acuerdo con una realización de la invención, la incubación se realiza desde menos de 1 min hasta 48 horas; en otra realización desde 10 min hasta 42 horas; en otra realización desde 20 min hasta 36 horas; y en otra realización desde 30 min hasta 24 horas.

El procedimiento de maduración también depende de la temperatura elegida en el curso de la incubación. La actividad enzimática óptima de las enzimas varía con la temperatura.

40 De acuerdo con una realización de la invención, la incubación se realiza a una temperatura de 2 a 40 °C; en otra realización de 4 a 37 °C. La furina puede ser eficazmente activa ya a bajas temperaturas como a 2 °C. Debería tenerse cuidado de seleccionar las temperaturas máximas de modo que no se dé, o no lo haga sustancialmente, la degradación inespecífica de la proteína. Esto se alcanza generalmente cuando, en una realización de la invención, las máximas temperaturas empleadas son inferiores a 50 °C; en otra realización, inferiores a 45 °C.

45 En el presente documento se desvela una preparación de VWF obtenible a partir del propéptido de VWF mediante un procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de la presente invención proporcionan VWF, que está sustancialmente libre de propéptido VWF debido a la alta eficacia del procedimiento.

50 También se desvela una preparación farmacéutica que comprende una preparación de VWF de acuerdo con la presente invención. La preparación farmacéutica puede emplearse en particular para tratar enfermedades de la coagulación sanguínea y puede combinarse con otros principios activos, tales como otros factores de coagulación sanguínea. Además, la preparación también puede comprender excipientes, transportadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables.

También se ha desvelado el uso de una preparación de VWF preparada de acuerdo con el procedimiento de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand

(EVW).

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Dependencia de calcio de la furina

Estudios enzimáticos sobre la furina (Molloy S.E. y col. (1992) J.Biol.Chem. 267:16396-16402) han mostrado que su actividad es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que la evaluación de la estructura cristalina (Than y col. (2005) Acta Cryst. D61:505-512) indica que la molécula tiene dos sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$ . Cameron y col. (Cameron A. y col. (2000) J.Biol.Chem. 275:36741-367499) describieron que la furina requirió concentraciones de calcio de al menos 1 mM para la actividad completa sin diferencias en la actividad cuando se aumentó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 50 mM. En un primer conjunto de experimentos, se ensayó y se cuantificó la dependencia del calcio en la furina recombinante desarrollada internamente en laboratorio. La furina se expresó a partir de un clon experimental de CHO, CHO 257/1 638-25, y se secretó en el medio de cultivo celular como una enzima soluble que contenía una Etiqueta-His en el extremo C-terminal. Se sometió una preparación de furina, prepurificada mediante cromatografía de quelato de Ni, a la determinación de la actividad usando un péptido sintético Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC como sustrato. Las reacciones de maduración del propéptido de VWF se realizaron en tampones de ensayo que contenían  $\text{Ca}^{2+}$  en el intervalo entre 0 y 40 mM. Los resultados representados en la Fig. 1 confirman los datos de la bibliografía en los que la furina recombinante expresada a partir de la línea de células CHO muestra una clara dependencia del calcio encontrándose una actividad máxima a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  entre 0,5 - 1 mM pero también una inhibición significativa por calcio a concentraciones mayores de 5 mM. Este potencial inhibidor del calcio tiene que tenerse en cuenta cuando el material de origen del rVWF contiene cantidades sustanciales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Ejemplo 2: Dependencia de la concentración de VWF

Tal como se deduce a partir de la cinética enzimática clásica, se consideró que una mayor concentración de sustrato podría conducir a una tasa de recambio mayor de la enzima permitiendo la maduración de VWF a consumo reducido de furina o tiempo de maduración reducido. Por lo tanto, los experimentos de maduración de VWF se llevaron a cabo a concentraciones de VWF de 1, 5 y 10 Unidades/ml usando 5 Unidades de furina/U de Ag de VWF en un volumen de incubación normalizado. Las muestras recogidas en los tiempos de 0, 6 y 24 horas de incubación a 37 °C se analizaron mediante SDS-PAGE. Los resultados mostrados en la Fig.2 confirman que a concentraciones más altas de VWF, la maduración de VWF avanza más rápido y podría permitir un tiempo de incubación reducido para esta etapa enzimática.

Igualmente, usando una preparación concentrada de VWF y llevando a cabo la reacción de maduración con 0,5 - 4,0 Unidades de furina/Unidad de Ag de VWF a 37 °C, los resultados indican que puede alcanzarse un grado de maduración del VWF >95 % con menos de 5 Unidades de furina/Unidad de Ag de VWF dentro de las 24 horas de incubación (véase la Fig.3).

Tal como muestra este ejemplo, la presente invención además mejora la eficacia de maduración de la furina cuando la concentración local del sustrato de propéptido de VWF en la columna es muy alto. También se mostró que concentraciones más altas del propéptido de VWF aumentaban la velocidad de maduración.

### Ejemplo 3: Maduración de VWF

En este ejemplo, se muestra la maduración del propéptido de VWF con furina. La furina se pone en contacto con el propéptido de VWF unido a una columna de cromatografía. La etapa de cromatografía se realizó en una resina de intercambio iónico de TMAE. Los detalles de la etapa de purificación en TMAE se enumeran en la Tabla 1 con las formulaciones de los tampones resumidas en la Tabla 2. Aplicando esta configuración, se investigaron distintos procedimientos para la maduración del propéptido de VWF unido en la columna; incluyendo el bombeado circular o bombeado de flujo descendente de la furina, mientras que concurrentemente varían los parámetros: temperatura, tiempo de contacto, contenido de NaCl y la cantidad específica de furina. Se investigó el VWF descubierto en el conjunto de elución para el grado de maduración mediante SDS-PAGE y evaluación visual de la relación propéptido de VWF/VWF (véase por ejemplo la Fig.4).

Un parámetro adicional que influyó en la eficacia de maduración fue la calidad del reactivo de furina. La furina se originó a partir de un sobrenadante de cultivo celular de un clon que expresaba furina etiquetada con His (CHO 257/1 638-25 experimental) con un nivel de expresión bajo y/o un clon que expresaba furina soluble sin Etiqueta con un nivel de expresión alto. Los resultados que se resumen en la Tabla 3 muestran que la maduración eficaz a 37 °C (1 hora de tiempo de contacto) podrían alcanzarse con una cantidad específica de furina unida en la columna tan baja como 2,4 Unidades de furina/Unidad de Ag de VWF. Podría obtenerse una maduración de > 95 % a 2-8 °C con una cantidad específica de furina de 3,3 Unidades/Unidad de Ag de VWF a las 4 horas de tiempo de contacto. A una fuerza iónica de NaCl 150 mM, la eficacia total de la maduración en la columna fue mejor en comparación con la de NaCl 90 mM, dejando la furina no unida a la resina de intercambio iónico en estas condiciones.

En la Tabla 4a y la Tabla 4b se muestran el perfil de impurezas de CHO y la actividad de proteasa de la furina en el conjunto eluido con respecto a los parámetros aplicados para la etapa de maduración de VWF en TMAE. Los resultados indican que la furina concentrada a partir del clon experimental "Etiquetado con His" (bajo nivel de

5 expresión) con la mayor cantidad de sobrenadante adicional del cultivo de células CHO bombeado a lo largo de la columna durante la maduración dio como resultado los mayores niveles de impurezas de CHO. Los datos de las etapas de maduración con furina del clon GMP dieron como resultado niveles de contaminación de CHO comparativamente bajos en los conjuntos eluidos y el volumen de cultivo de células CHO adicional bombeado a lo largo de la columna fue inferior al 2 % del volumen cargado en la columna durante la carga del producto VWF. El bajo volumen de cultivo celular de furina requerido para la maduración del propéptido de VWF sugeriría que el nivel de impurezas de CHO del conjunto eluido no debería sufrir un impacto significativo por el reactivo de furina y principalmente estaría causado por la fuente de VWF. Podría detectarse un perfil de contaminación similar para la actividad proteasa de la furina que se comporta como una "impureza de CHO".

10

Tabla 1: Detalles de la Etapa de Captura/Maduración con TMAE

Etapa	Tampón	Caudal	Volúmenes de la Columna
Condicionamiento	SIP1	150 cm/h	5
	WP2		5
	EP/WP1		10
Carga	material de partida, diluido 1:4 con agua		Aprox. 200
			5
	EP/WP1		5
Tratamiento con Furina	FEP	baja	
	Furina diluida en FDP		1-10
Elución	EP/WP1	150 cm/h	5
	Lavado del 20 % de EP3 en EP4		0,5
	20 % de EP3 - 80 % de EP3 en EP4		7
	EP3		10
Regeneración	WP2		5
	SIP1		5

Tabla 2: Tampones para la Etapa de Captura/Maduración con TMAE

Tampón		Formulación	pH/°C		Cond/°C	
FEP	Equilibrado de la Furina	HEPES 50 mM, NaCl 90 - 150 mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM,	7,00	24,7	16,00	24,6
FDP	Tampón de dilución de la furina	HEPES 100 mM, NaCl 90 - 150 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM,	7,00	26,5	16,25	26,9
EP/W P1	Equilibrado/lavado	Tris 10 mM, NaAc 100 mM, NaCl 86 mM,	6,50	25,3	16,62	25,1
EP3	Elución	Tris 10 mM, NaAc 100 mM, NaCl 200 mM,	7,52	23,5	83,4	23,5
EP4	Post-elución	Tris 10 mM, NaAc 100 mM, NaCl 1 M,	7,51	24,5	24,6	24,2
SIP1	Base	NaOH 0,5 M	---	---	---	---
WP2	Alto en sales	NaCl 2 M,	---	---	---	---

- 5 Durante los experimentos en la columna se observó que el rendimiento de la etapa disminuye significativamente con el número de lotes que se hacen en una columna. La razón identificada fue el ensuciamiento de la columna debido a un procedimiento de regeneración de la columna insuficiente que incluyó 5 VC de NaOH 0,5 M y 5 VC de NaCl 2M. El procedimiento se mantuvo tal como estaba, pero se utilizó la base precalentada a 30 – 40 °C para mejorar la eficacia de limpieza. Se descubrió que esta medida era suficiente para impedir que la columna se ensuciara y que hubiera un descenso del rendimiento de esta etapa del procedimiento.

Tabla 3: Condiciones para la Maduración del Propéptido de VWF en TMAE

ID de la Ejecución	Furina		tiempo de contacto	Flujo		Temp. °C	NaCl en el Tampón mM
	Unidades/Unidad de Ag de VWF	Volumen (VC)		ml/min	dirección		
CR02	14	6,5	18	0,06	circular  flujo descendente  flujo descendente	30-37°C	120
CR04	18	5,8	2	3,0			
CR05	11	5,8	18	3,0			
CR08	16	4,2	1	0,5			
CR09	9	4,2	1	0,5			
CR21	26	2,2	1	0,4			
CR23	7	1,1	1	0,2			
CR24	6	1,1	1	0,2			
CR27	4,7	1,1	1	0,2			
CR29	2,4	3,0	3	0,5			
CR30	3,2	6,4	1	1,2	flujo descendente	2-8°C	
CR33	5,8	10,4	20	1,0	circular		
CR34	6,4	10	8	1,0			
CR35	8,2	4,5	8	0,5			
CR36	7,8	4,5	4	0,5			
CR38	4,8	3,5	8	0,5			
CR39	5,9	3,3	4	0,5			

- 10 La carga de VWF en la columna estuvo siempre en el intervalo de 160 -180 unidades de antígeno/ml de resina. Después de cargar y lavar de acuerdo con la Tabla 1 la maduración del propéptido de VWF con furina siguió con los parámetros aplicados tal como se describe en la tabla. La última columna enumera el contenido de NaCl de la furina diluida bombeada a lo largo de la columna.

Tabla 4a: Maduración del Propéptido de VWF en Columna; Perfil de Furina y CHO en el Conjunto Eluido

ID de la ejecución	Carga	Tratamiento con Furina					
		Furina total	Cantidad espec. de Furina	Vol. de Furina	de equivalente CCS	tiempo de contacto	de temp.
	[ml]	[Unidades]	[U/U Ag de VWF]	[ml]	[ml]	[horas]	[°C]
CR23	1646	11810	12	47,2	47	1	37
CR24	1675	9383	6	6	392	1	37
CR25	1923	18688	12	20,2	553	1	37
CR26	1925	13980	9	16,4	503	1	37
CR27	1925	7688	4,7	4,8	313	1	37



(continuación)

ID de la ejecución	Carga	Tratamiento con Furina					
		Furina total	Cantidad espec. de Furina	Vol. de Furina	de equivalente CCS	tiempo de contacto	de temp.
	[ml]	[Unidades]	[U/U Ag de VWF]	[ml]	[ml]	[horas]	[°C]
CR29	2001	4040	2,4	3,3	215	1	37
CR30	2001	5526	3,3	34,9	35	1	37
CR33	2001	10306	5,8	77	77	20	4
CR34	2001	11231	6,4	55	55	8	4
CR35	2001	13387	8,2	5	5	8	4
CR36	2000	13387	7,8	5	5	4	4
CR38	2001	9105	4,8	2,5	3	8	4

Tabla 4b: Maduración del Propéptido de VWF en Columna; Perfil de Furina y CHO en el Conjunto Eluido

Conjunto Eluido						
ID de la ejecución	Ag de VWFA	CHO	Contenido específico en CHO	Furina	Contenido específico en Furina	Factor de Reducción para furina
	[mg]	[µg]	[ug/ug de VWF]	[U]	[U/U Ag de VWF]	
CR23	22,93	2094	0,091	1152	50	10
CR24	17,53	2077	0,118	908	52	10
CR25	12,8	2727	0,213	2643	206	7
CR26	16,1	3417	0,212	2202	137	6
CR27	19,1	1868	0,098	2700	141	3
CR29	19,3	2533	0,131	1354	70	3
CR30	22,9	2094	0,091	1152	50	5
CR33	17,9	2334	0,130	886	49	12
CR34	11,7	n.d.	n.d.	121	10	93
CR35	20,2	968	0,048	671	33	20
CR36	19,8	1324	0,067	817	41	16
CR38	14,8	n.d.	n.d.	820	55	11

- 5 En las Tablas 4a y 4b, se muestran los detalles de los experimentos de maduración en columna incluyendo los volúmenes de VWF/propéptido de VWF (flujo continuo de MAB), concentrado de furina y el sobrenadante de cultivo celular equivalente aplicado a la columna. Se muestra el perfil de contaminación para las proteínas de CHO y la actividad proteasa de la furina en el conjunto eluido. La ejecución de CR 24 - 29 usó concentrado de furina del clon experimental Etiquetado con His (fabricado a escala Piloto); en CR30 -CR33 se usó concentrado de furina del clon GMP (fabricado a una escala de fermentador de 10 litros); CR23 y CR35 - CR38 usaron furina prepurificada a partir del clon experimental y el GMP, respectivamente.
- 10

Los conjuntos eluidos también se investigaron para la calidad del VWF en términos de degradación proteolítica adicional mediante electroforesis en gel de agarosa. Puede visualizarse bien la degradación proteolítica adicional

mediante electroforesis en gel de agarosa en geles al 2,5 % donde las principales bandas de las estructuras multiméricas de VWF están flanqueadas por bandas débiles adicionales denominadas bandas "satélite". Los resultados de transferencia de Western de varios lotes no indican la formación significativa de bandas satélite en los conjuntos eluidos de VWF de TMAE después de la maduración en columna sin importar las condiciones aplicadas.

5 El VWF maduro encontrado en el conjunto eluido se analizó para la secuencia del extremo N-terminal para comprobar si la furina usaba el sitio de escisión correcto en las condiciones de la maduración en columna. Se secuenció el VWF de los lotes CR33, CR35 y CR 36 y se descubrió que la secuencia del extremo N-terminal corresponde a la secuencia esperada y nativa para el VWF maduro (SLSCRPPMV...N-term) confirmando adicionalmente la calidad de las etapas de procesamiento *in vitro*.

10 **Ejemplo 4: Implementación a Escala Piloto de la Maduración en Columna**

La maduración en columna del propéptido VWF con furina se implementó a escala piloto en una columna de 9 litros con 30 cm de diámetro aplicando una carga total de aproximadamente 16 g de VWF por lote. El procedimiento se realizó a 2 – 8 °C con un tiempo de maduración con furina de 8 horas de acuerdo con una ejecución de CR35 a escala de laboratorio. El procedimiento de captura/maduración de TMAE planeado para la escala piloto se resume en la Tabla 5. Para la maduración, se introdujeron el lavado 2, la activación y el lavado 3 después de la carga, pero antes de la elución. Para la elución del VWF maduro, se aplicó la etapa de elución.

Tabla 5: Procedimiento de Captura/Maduración en TMAE a Escala Piloto

<b>Etapas</b>	<b>Tampón</b>	<b>Vol. de Tampón</b>	<b>Caudal</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Comentarios</b>
		<b>CV</b>	<b>cm/h</b>		
Precondicionamiento	SIP1, WP2, EP/WP1	15	150	36 min	
Carga	material de partida diluido 1:4:5 (<15 mS/cm a TA)	Apr. 765	150	apr.26h	160 - 180 Ag de VWF U /ml de resina
Lavado 1	EP/WP	5	150	12 min	
Lavado 2	FE1	5	150	12 min	HEPES 50 mM, NaCl 150mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM, pH 7,0 (TA)
Act. de Furina	Furina diluida con tampón FE1 (apr. 15 mS/cm).	2-4	baja	8 h,	Diluida con tampón FE1: HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl <sub>1</sub> 1 mM, pH=7,0 (TA) Volumen reciclado apr. 4 - 5 veces
Lavado 3	FE1	1	150	2,4 min	
Lavado 4	EP/WP	5	150	12 min	
Elución, var1	EP1	20	75	96 min	
Elución, var2	Gradiente: de EP3 al 20%/EP4 al 80% a EP3 al 80%/EP4 al 20%	7	75	33 min	
Elución, var2	EP3	10	150	24 min	
Post-condicionamiento	WP2, SIP1, WP2, EP/WP1	20	150	48	T= apr. 30°C

Los datos para las 13 etapas de captura/maduración en columna a escala piloto se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Maduración en columna a escala de Planta Piloto (volumen de carga de 2100 litros/lote) en una columna Fractogel de 15 l de EMD TMAE 650

TMC	Carga de Ag de VWF	Actividad de Furina/VWF	Tiempo de Maduración	Temperatura de Maduración	Contenido en Propéptido de VWF en el Conjunto Eluido	Contenido en Propéptido de VWF en la Carga
	U/ml de resina	U/U	h	°C	% de Ag de VWF	% de Ag de VWF
ORVWTMC06006	124	0,7	4	20	0,64	49,61
ORVWTMC06007	133	1,3	4	20	0,64	61,64
ORVWTMC06008	113	0,7	4	20	0,52	58,62
ORVWTMC06009	120	0,7	4	20	0,71	65,58
ORVWTMC06010	144	2,0	4	20	0,64	55,34
ORVWTMC06011	159	0,4	4	20	2,61	42,46
ORVWTMC06012*	123	0,1	4	20	8,15	n.d.
ORVWTMC06013	128	0,4	4	20	1,88	43,91
ORVWTMC06014	131	1,9	4	20	2,31	72,25
ORVWTMC06015	114	0,8	4	TA	1,03	46,18
ORVWTMC06016	123	0,6	4	TA	1,52	56,72
ORVWTMC06017	128	0,7	4	TA	1,65	57,02
ORVWTMC06018	143	0,2	4	TA	1,79	n.d.
Media	129	0,9	4	n.a.	1,3	55,4
Min	113	0,2	4	20	0,5	42,5
máx.	159	2,0	4	25	2,6	72,3
*ejecución no considerada para el análisis estadístico						

5 De acuerdo con la invención, el rVWF, que incluyó el propéptido de rVWF, se trató con rfurina, aunque también funcionó la furina no recombinante, mientras que se adsorbió en una resina de intercambio iónico, que evitó la necesidad de concentrar el rVWF por otros medios antes del tratamiento con rfurina. Después de la dilución apropiada, se aplicó el material de partida a la resina de intercambio iónico, al cual se adsorbió el rVWF. Se eliminó el exceso de iones  $Ca^{++}$  mediante una etapa de equilibrado, y se bombeó la rfurina en la columna, donde esta residió durante un tiempo determinado. La rfurina no unida, el propéptido de VWF y el exceso de proteínas de CHO se eliminaron mediante una etapa de lavado, y se eluyó el rVWF de la columna mediante un aumento de la fuerza iónica.

15 Los datos de la Tabla 6 muestran que la maduración de la furina en la columna es eficaz y que el contenido en propéptido de VWF puede reducirse de una media del 55,4 % del antígeno del propéptido de VWF en el material de carga a una media del 1,3 % del antígeno de propéptido de VWF del Ag de VWF total del conjunto eluido. Puede alcanzarse el nivel de maduración del producto de VWF del conjunto eluido, de media el 98,7 % de Ag de VWF maduro/Ag de VWF total, con un uso de furina de una media de 0,9 Unidades de furina/Unidad de antígeno de VWF cargado en la columna en las condiciones indicadas en la tabla. A concentraciones muy bajas de rfurina (0,1 Unidades/Unidades de rVWF) el procedimiento de maduración dio como resultado una cantidad más alta de propéptido de VWF residual.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de Factor de von Willebrand (VWF) maduro a partir del propéptido de Factor de von Willebrand que comprende las etapas de:
  - (a) inmovilizar el propéptido de VWF en una resina de intercambio aniónico,
  - (b) incubar el propéptido de VWF inmovilizado con furina que comprende una actividad de al menos 0,2 Unidades de furina/Unidad de antígeno de VWF (Ag) para obtener VWF maduro inmovilizado, y
  - (c) aislar al menos el 90 % del VWF maduro de la resina de intercambio aniónico mediante elución.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho propéptido de VWF es de origen recombinante.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha resina de intercambio aniónico comprende grupos trimetilaminoetilo (TMAE).
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha resina de intercambio aniónico está empacutada en una columna cromatográfica.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el propéptido de VWF es inmovilizado en la resina de intercambio aniónico y es incubado con furina a una conductividad medida a 25 °C inferior a 25 mS/cm, tal como inferior a 20 mS/cm, tal como inferior a 16 mS/cm.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho VWF maduro es eluido de la resina de intercambio aniónico a una conductividad medida a 25 °C de al menos 40 mS/cm, tal como al menos 60 mS/cm, tal como al menos 80 mS/cm.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha furina está comprendida en una solución, que comprende CaCl<sub>2</sub> adicional a una concentración de 0,01 a 10 mM, tal como de 0,1 a 5 mM, tal como de 0,1 a 2 mM.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la incubación se realiza desde 1 min hasta 48 horas, tal como desde 10 min hasta 42 horas, tal como desde 20 min hasta 36 horas, tal como desde 30 min hasta 24 horas.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la incubación se realiza a una temperatura de 2 a 40 °C, tal como de 4 a 37 °C.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha furina es de origen recombinante.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la furina tiene una actividad de al menos 0,5 Unidades de furina/Unidad de VWF (Ag).
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la furina comprende una actividad de 0,5-4,0 Unidades de furina/Unidad de VWF (Ag).
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el VWF maduro es al menos el 95 % de VWF maduro, tal como al menos el 98 % de VWF maduro, tal como al menos el 99 % de VWF maduro.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la incubación se lleva a cabo a 2-8 °C o a 37 °C.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 13, en el que se incuban una media de 0,9 Unidades de furina/Unidad de VWF (Ag) durante al menos 4 horas.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la furina tiene una actividad de al menos 0,2-2,0 Unidades de furina/Unidad de VWF (Ag), opcionalmente durante un periodo de 4 horas.

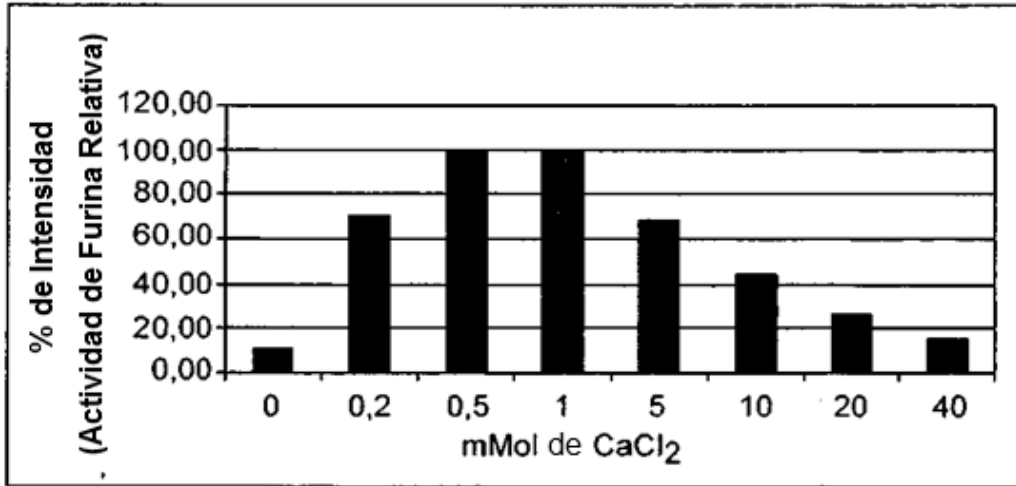


FIG. 1

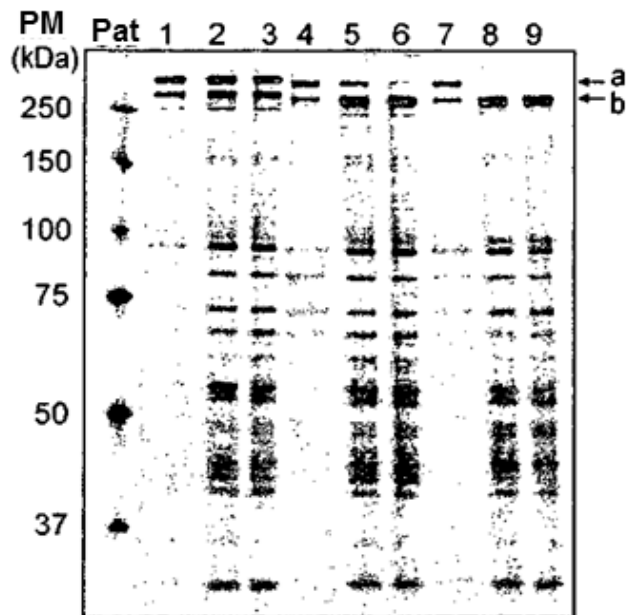


FIG. 2

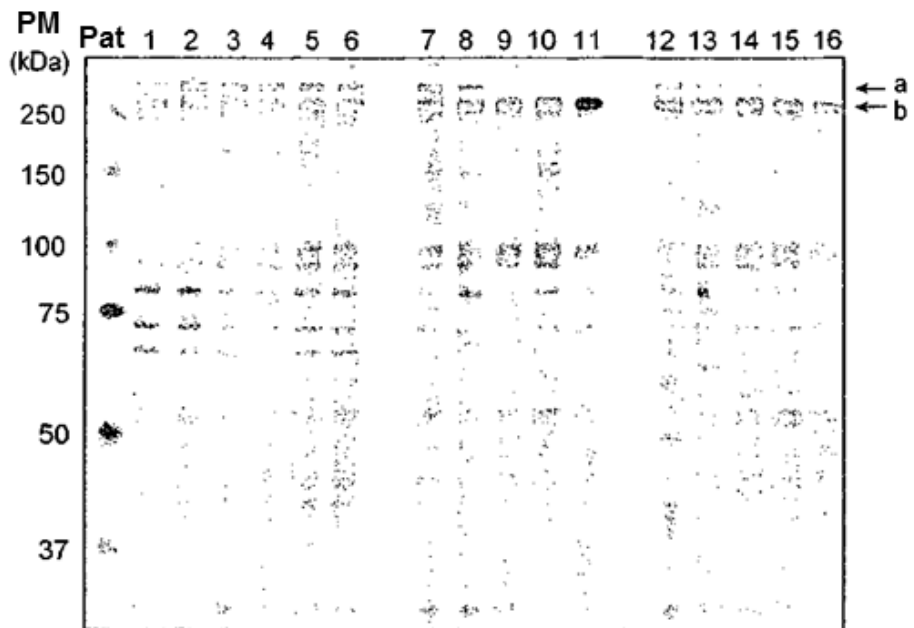


FIG. 3

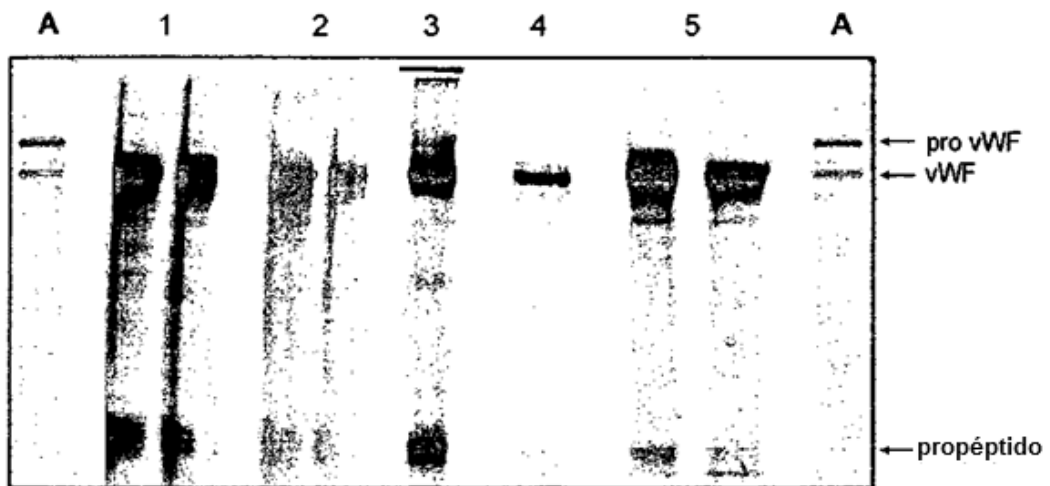


FIG. 4