

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 684**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2005 E 05791971 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 1789444**

54 Título: **Preparación de un preparado de factor de von Willebrand usando hidroxilapatita**

30 Prioridad:

14.09.2004 DE 102004044419

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

07.01.2016

73 Titular/es:

**BIOTEST AG (100.0%)
LANDSTEINERSTRASSE 5
D-63303 DREIEICH, DE**

72 Inventor/es:

**KRETSCHMAR, MICHAEL y
MÖLLER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 555 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación de un preparado de factor de von Willebrand usando hidroxilapatita

5 La invención se refiere a un procedimiento para la purificación del factor de von Willebrand, realizándose al menos una cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita, en la que no se une VWF esencialmente, mientras que se unen proteínas contaminantes al medio de cromatografía.

10 El factor de von Willebrand es una glicoproteína que se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos. El peso molecular del monómero asciende a aproximadamente 225.000 Da. Mediante formación de puentes disulfuro se forman dímeros en la célula, que a su vez se asocian para dar oligómeros de hasta 40 subunidades dimericas igualmente a través de enlaces disulfuro. La concentración del factor de von Willebrand (VWF) emitido al plasma asciende a de 5 - 10 mg/l.

15 En la hemostasia primaria, el VWF tiene el objetivo de mediar la adhesión de trombocitos al subendotelio lesionado y fomentar la agregación de trombocitos en condiciones de altas fuerzas de cizallamiento, tal como en el sistema arterial. Como función en la hemostasia secundaria, VWF une el factor VIII, un cofactor importante en la coagulación de la sangre, en un complejo no covalente. El factor VIII se estabiliza debido a ello y se protege frente a la degradación prematura.

20 El síndrome de von Willebrand (VWS) es una hemofilia que se produce mediante la modificación cuantitativa o cualitativa del VWF. Con una prevalencia del 0,8 - 1,3 % es el VWS la hemofilia hereditaria más frecuente. Ésta afecta, a diferencia de la hemofilia A, de igual manera a hombres y mujeres. El VWS se clasifica en distintos tipos: los pacientes del tipo 1 presentan un nivel en sangre de VWF más bajo. En el VWS tipo 2 están englobados todos los defectos cualitativos del VWF en el plasma. Pueden aparecer alteraciones en la hemostasia primaria y/o secundaria. En pacientes del tipo 3 falta completamente el VWF. Algunos subtipos del tipo 2 y del tipo 3 se designan como forma grave del VWS. En la forma grave del VWS son necesarias terapias de sustitución con preparados que contienen VWF.

25 Con frecuencia, para el tratamiento de la forma grave del VWS se usan preparados plasmáticos del factor VIII que contienen una proporción relativamente alta de VWF. Si bien con ello pueden cortarse hemorragias, sin embargo al mismo tiempo aumenta el riesgo de trombosis, especialmente con el uso frecuente o prolongado. Esto se debe a una sobredosificación del factor VIII. Es esencialmente favorable en el sentido de la seguridad del paciente el tratamiento de enfermedades de VWS con concentrados de VWF muy puros, libres de o con bajo contenido de factor VIII.

30 En la bibliografía se han descrito distintos procedimientos para la purificación y obtención de VWF:

El documento EP-A-0 416 983 da a conocer la obtención de un complejo de VWF-factor VIII a partir de plasma humano mediante precipitación con una combinación de cloruro de bario e hidróxido de aluminio y cromatografía de intercambio de aniones posterior en Fractogel DEAE.

35 El documento EP 0 469 985 describe un procedimiento, en el que se obtiene VWF de crioprecipitado usando un intercambiador de aniones. A este respecto se une el factor VIII a una concentración salina de 250 mM, mientras que VWF permanece en el sobrenadante. El sobrenadante se une tras la reducción de la concentración salina hasta 100 - 150 mM a un segundo intercambiador de aniones y se eluye con NaCl 300 - 350 mM.

40 En el documento EP 0 503 991 se describe la purificación de VWF de crioprecipitado humano mediante un procedimiento de 3 etapas: 1. Cromatografía de intercambio de aniones con Fractogel DEAE y elución del VWF mediante NaCl 0,15 M. 2. Nueva cromatografía en Fractogel DEAE y elución del VWF mediante NaCl 0,17 M. 3. Separación de fibronectina y fibrinógeno mediante cromatografía de afinidad en gelatina-sefarosa. VWF se encuentra a este respecto en el flujo continuo. Como tampón se usan soluciones que contienen iones calcio y aminoácidos.

45 El documento WO 89/12065 describe la separación de proteínas plasmáticas de crioprecipitados de plasma mediante unión de las proteínas en Fractogel DEAE y elución gradual mediante adición creciente de NaCl. El procedimiento es adecuado en particular para la obtención de concentrados del factor VIII, así como para la preparación de concentrados de fibrinógeno, fibronectina y VWF.

50 El documento WO 96/10584 describe un procedimiento para la obtención de VWF recombinante muy puro por medio de cromatografía combinada de intercambio de aniones/de afinidad con heparina y el documento EP 0 705 846 describe la separación de fracciones de alto y bajo peso molecular de VWF recombinante por medio de cromatografía de afinidad con heparina.

El documento WO 98/38219 describe un procedimiento para la obtención de VWF, en el que el VWF con una concentración salina baja se une a un intercambiador de cationes y mediante elución fraccionada se obtiene VWF con actividad específica alta.

En "The factor VIII / von Willebrand factor complex: basic and clinical issues", Augusto B. Federici, Haematologica vol. 88 (suplemento 9) se describen composiciones que contienen VWF.

El documento US 5.128.245 describe el uso de hidroxilapatita para la purificación de VWF.

5 En "studies on the structure and subunit composition of human antihemophilic factor", J. J. Gorman, Thrombosis Research, vol. 12, n.º 2, 1978 se describe un procedimiento para la purificación del complejo de factor VIII-VWF mediante unión del complejo a hidroxilapatita.

En "Chromatography of vWF on dextran sulphate sepharose", R.H. Saundry, Thrombosis research vol. 48, n.º 6, 1987 se describe un procedimiento para la purificación de VWF con ayuda de dextranosulfato-agarosa.

10 Los procedimientos descritos hasta ahora tienen inconvenientes. Una cromatografía de intercambio de aniones presenta una resolución no satisfactoria. Para la obtención de un preparado muy puro es necesaria por regla general una combinación con una cromatografía de afinidad. Las cromatografías de afinidad son a su vez caras. En la combinación de cromatografía de intercambio de aniones y de intercambio de cationes se obtuvieron para un preparado de VWF plasmático actividades específicas de como máximo 83 E/mg de proteína. Igualmente, en un procedimiento en el que se usaron para la purificación de un VWF recombinante la cromatografía de intercambio de aniones, cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de intercambio de cationes, se consiguió una actividad específica de sólo 59,2 E/mg de proteína.

Un objetivo de la presente invención es poner a disposición un procedimiento de preparación sencillo, eficaz, con el que pueda prepararse de manera económica un preparado de VWF muy puro, esencialmente libre de factor VIII con una alta actividad específica.

20 Sorprendentemente se encontró que una etapa de cromatografía con hidroxilapatita como matriz de cromatografía muestra resultados ventajosos. Se determinó sorprendentemente que hidroxilapatita puede usarse no sólo como cromatografía de unión, en la que se une VWF y las impurezas permanecen no unidas o se eluyen en otra etapa, sino también como cromatografía de flujo continuo, en la que VWF no unido fluye a través de la columna y las impurezas se unen.

25 De acuerdo con la invención se usa por tanto hidroxilapatita como medio de cromatografía de flujo continuo para la purificación del VWF. La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de VWF, caracterizado porque se realiza al menos una cromatografía con hidroxilapatita, en la que no se une VWF esencialmente, mientras que las proteínas contaminantes se absorben en el medio de cromatografía.

30 Preferentemente se une menos del 30 %, más preferentemente menos del 25 %, aún más preferentemente menos del 20 %, lo más preferentemente menos del 10 % del VWF existente en la solución de carga a la matriz de hidroxilapatita.

35 La hidroxilapatita es una forma de fosfato de calcio con la composición $Ca_5(PO_4)_3OH$ o $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$, que puede usarse como fase estacionaria para la cromatografía de proteínas, ácido nucleicos y otras macromoléculas. Además de la forma cristalina de la hidroxilapatita puede usarse también una forma cerámica que puede obtenerse mediante sinterización. La hidroxilapatita puede adquirirse por ejemplo por la empresa Bio-Rad (Múnich, Alemania). Su hidroxilapatita cerámica se pone a disposición en dos formas (tipo 1 y tipo 2). El material tipo 1 tiene debido a superficies más grandes una capacidad de unión más alta para moléculas más pequeñas, por ejemplo proteínas pequeñas. Por el contrario, el material tipo 2 presenta poros más grandes en las partículas, que permite una introducción y con ello una mejor unión de moléculas grandes, por ejemplo ADN o proteínas grandes. Los materiales presentan preferentemente las siguientes propiedades:

Tabla 1

	Capacidad de unión dinámica	Diámetro de poro nominal
Tipo 1	>13,7 mg de lisozima/ml de CHT*	600-800 Å
Tipo 2	>6,8 mg de lisozima/ml de CHT*	800-1000 Å
*CHT= <i>ceramic hydroxy apatite</i>		

La hidroxilapatita cristalina o cerámica está libremente disponible. En el estado de la técnica se conocen procedimientos para su preparación.

45 El procedimiento de acuerdo con la invención comprende que (i) se lleve a contacto una composición que contiene VWF y una o varias proteínas contaminantes con una matriz de hidroxilapatita, de modo que al menos una proteína contaminante se une a la matriz de hidroxilapatita, mientras que VWF no se une esencialmente a la matriz de hidroxilapatita, y dado el caso a continuación (ii) se separa VWF no unido de la matriz de hidroxilapatita. Esta forma

de realización se designa en la presente solicitud como "cromatografía de flujo continuo".

El procedimiento puede realizarse en forma de una cromatografía en columna o en el procedimiento discontinuo; se prefiere la realización de una cromatografía en columna. En el caso de una cromatografía en columna se encuentra VWF en el flujo continuo y al menos una proteína contaminante, por ejemplo fibronectina y/o fibrinógeno, se une a la hidroxilapatita. La cromatografía con hidroxilapatita se realiza de acuerdo con esta forma de realización con un valor de pH de 6,5 a 8,5, preferentemente de 6,8 a 8,5, más preferentemente de 6,8 a 7,5, lo más preferentemente de 7,0 a 7,5. Habitualmente tienen el mismo valor de pH el tampón de migración, de lavado y de elución, así como la solución de proteínas que va a cargarse. Sin embargo son practicable también variantes en las que estas soluciones presentan distintos valores de pH.

10 La composición que contiene VWF, que se pone en contacto con la matriz de hidroxilapatita, contiene preferentemente fosfato de sodio y/o fosfato de potasio. La concentración total de fosfato de sodio y/o de fosfato de potasio en la solución es por ejemplo de 0 a 100 mM, preferentemente de 10 a 50 mM, lo más preferentemente de 20 a 40 mM, es decir como tampón de migración puede usarse una solución de tampón con las concentraciones mencionadas.

15 La solución que contiene VWF, por ejemplo una solución de crioprecipitado previamente purificada, se carga en una columna de hidroxilapatita con una concentración salina baja de fosfato de sodio o de potasio 0 - 100 mM, preferentemente a 10 - 50 mM, con un pH de preferentemente 6,8 a 8,5, de manera especialmente preferente con un pH de 7,0 - 7,5. La hidroxilapatita es en esta forma de realización preferentemente hidroxilapatita cerámica, de manera especialmente preferente del tipo 1, tal como se comercializa por Bio-Rad (Múnich, Alemania). Con estas condiciones no se une la mayor parte de las moléculas de VWF a la matriz y se encuentra en el flujo continuo, mientras que las proteínas contaminantes, tales como por ejemplo fibrinógeno o fibronectina, se unen en gran parte a la matriz.

Mediante la cromatografía de flujo continuo de acuerdo con la invención pueden obtenerse preparaciones de VWF que contienen sólo bajas cantidades de fibrinógeno y fibronectina. Por regla general, la concentración de antígeno de fibrinógeno en la fracción de flujo continuo es menor de 25 µg/ml, preferentemente menor de 15 µg/ml, preferentemente menor de 10 µg/ml, lo más preferentemente como máximo 5 µg/ml. La concentración de antígeno de fibronectina en la fracción de flujo continuo es habitualmente menor de 250 µg/ml, preferentemente menor de 150 µg/ml, más preferentemente menor de 100 µg/ml, lo más preferentemente como máximo 50 µg/ml. La concentración de antígeno de fibrinógeno y de antígeno de fibronectina puede determinarse mediante procedimientos en sí conocidos, por ejemplo tal como se describen en los ejemplos de la presente solicitud. El empobrecimiento de fibronectina y fibrinógeno se recomienda en particular debido a que estas proteínas pueden originar problemas técnicos del procedimiento debido a su tendencia a la agregación, por ejemplo en filtraciones. La fibronectina y el fibrinógeno en productos finales liofilizados impiden con frecuencia la solubilidad completa de un preparado.

35 Cuando la solución de carga que se pone en contacto con la matriz de hidroxilapatita contiene fibrinógeno y/o fibronectina (por ejemplo porque se trata de una fracción de plasma), puede conseguirse un empobrecimiento considerable de las proteínas contaminantes fibrinógeno y fibronectina. Así, la concentración de fibrinógeno en la fracción de flujo continuo es preferentemente menor del 10 %, más preferentemente menor del 5 %, aún más preferentemente menor del 2,5 % de la concentración de fibrinógeno en la solución de carga (antes de la cromatografía de flujo continuo). La concentración de fibronectina en la fracción de flujo continuo es preferentemente menor del 10 %, más preferentemente menor del 5 %, aún más preferentemente menor del 2,5 % de la concentración de fibronectina en la solución de carga (antes de la cromatografía de flujo continuo).

El rendimiento de la cromatografía de flujo continuo (con respecto al equilibrio de masas) es por regla general mayor del 50 %, preferentemente mayor del 60 %, lo más preferentemente mayor del 75 %.

45 La actividad específica (actividad de cofactor de ristocetina por mg de proteína total) puede elevarse mediante la cromatografía de flujo continuo en al menos el 100 %, preferentemente en al menos el 150 %, lo más preferentemente en al menos el 200 %.

Para una purificación fina puede unirse VWF a una matriz de hidroxilapatita y a continuación eluirse. Esta forma de aplicación se designa como "cromatografía de unión". Habitualmente, la cromatografía de unión comprende que

- 50 (a) VWF se une a la matriz de hidroxilapatita,
 (b) las impurezas se separen por lavado con concentración salina más baja y
 (c) a continuación se eluya la fracción de valor que contiene VWF a concentración salina más alta.

En la etapa (a) se pone en contacto una solución que contiene VWF y una o varias proteínas contaminantes, con la matriz de hidroxilapatita. La concentración total de fosfato de sodio y/o de potasio en esta solución es habitualmente de 0 a 200 mM, preferentemente de 1 a 100 mM, más preferentemente de 1 a 50 mM, lo más preferentemente de 10 a 30 mM.

En la etapa de lavado (b) se lava la matriz de hidroxilapatita con un tampón de baja concentración salina. La concentración total de fosfato de sodio y/o de potasio en este tampón de lavado es por regla general de 100 a 300

mM, preferentemente de 150 a 250 mM, lo más preferentemente de 180 a 240 mM.

En la etapa (c) puede eluirse la fracción de valor que contiene VWF con un tampón de concentración salina más alta. El tampón de elución contiene por regla general fosfato de sodio y/o de potasio de 200 a 500 mM, preferentemente de 250 a 400 mM.

- 5 Mediante desplazamiento de las concentraciones salinas pueden modificarse el rendimiento y la pureza. Cuanto más alta sea la concentración salina en el tampón de lavado, más pura es la fracción de valor obtenida. Sin embargo debido a ello se reduce el rendimiento. Además, el valor de pH seleccionado influye en la concentración salina óptima para el tampón de lavado. Cuanto más bajo sea el valor de pH, más fuerte es la unión de VWF a la matriz de hidroxilapatita. De manera correspondiente, las concentraciones salinas seleccionadas pueden ser más altas con valores de pH bajos, por el contrario pueden ser más bajas con valores de pH más altos.

La cromatografía de unión con hidroxilapatita se realiza con un valor de pH de 5 a 7,5, preferentemente de 5,5 a por debajo de 6,8, lo más preferentemente de 6,0 a 6,5. Habitualmente tienen el mismo valor de pH el tampón de migración, de lavado y de elución, así como la solución de proteínas que va a cargarse. Sin embargo son practicables también variantes en las que estas soluciones presentan distintos valores de pH.

- 15 En esta forma se carga la solución que contiene VWF, por ejemplo una solución de crioprecipitado previamente purificada, con una concentración salina baja, preferentemente fosfato de potasio o de sodio 0 - 100 mM, de manera especialmente preferente a 10 - 30 mM, con un valor de pH de 5,5 - 6,8, preferentemente de 6,0 - 6,5, en una columna de hidroxilapatita, por ejemplo hidroxilapatita cerámica tipo 2. La mayor parte de las moléculas de VWF se une en estas condiciones. Mediante lavado con una solución con concentración salina más alta con por ejemplo fosfato de potasio o de sodio, por ejemplo fosfato de sodio 230 mM pH 6,0, pueden separarse por lavado impurezas, por ejemplo fibronectina. La fracción de valor se eluye a continuación con soluciones salinas muy concentradas, por ejemplo soluciones de fosfato, tales como por ejemplo fosfato de sodio 400 mM pH 6,0.

- 25 Mediante la cromatografía de unión, a partir de las fracciones de VWF purificadas mediante la cromatografía de flujo continuo pueden obtenerse preparaciones de VWF que ya no contienen prácticamente ninguna cantidad detectable de fibrinógeno ni de fibronectina. Cuando la solución de carga que se pone en contacto con la matriz de hidroxilapatita es una fracción de plasma y/o contiene fibrinógeno o fibronectina, puede conseguirse una eliminación prácticamente cuantitativa de las proteínas contaminantes, fibrinógeno y fibronectina, de la solución. Así, la concentración de fibrinógeno en la fracción de elución es preferentemente menor del 25 % de la concentración de fibrinógeno en la solución de carga (antes de la cromatografía de unión). La concentración de fibronectina en la fracción de elución es preferentemente menor del 10 %, más preferentemente menor del 5 % de la concentración de fibronectina en la solución de carga (antes de la cromatografía de unión). Las concentraciones de fibrinógeno o fibronectina en la fracción de elución (fracción de valor) están por regla general por debajo del límite de detección de aproximadamente 1 µg/ml.

- 35 Mediante una cromatografía de unión realizada a continuación de la cromatografía de flujo continuo de acuerdo con la invención pueden obtenerse preparaciones de VWF con alta actividad específica. La actividad específica en la fracción de elución puede ser superior a 50 E/mg de proteína, preferentemente ésta es superior a 75 E/mg de proteína, más preferentemente superior a 85 E/mg de proteína, lo más preferentemente al menos 100 E/mg de proteína. La actividad de VWF se determina con el ensayo de cofactor de ristocetina, que determina la capacidad de unión de VWF al receptor plaquetario glicoproteína Ib/IX bajo la influencia del antibiótico ristocetina. La actividad de VWF específica puede determinarse tal como se describe en los ejemplos.

- 45 Para la preparación de un preparado de VWF especialmente puro pueden combinarse entre sí la cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita de acuerdo con la invención y la cromatografía de unión con hidroxilapatita o con otras técnicas de purificación. Como especialmente adecuado se ha mostrado concretamente realizar en primer lugar, según el procedimiento anteriormente descrito, una cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita para el empobrecimiento de las impurezas principales. A continuación se titula la fracción de valor por ejemplo con HCl 1 M hasta 6,0. La muestra se carga, tal como se describe para la cromatografía de unión, en una columna de hidroxilapatita. Las moléculas de VWF se unen y se eluyen selectivamente.

- 50 En una forma de realización especial se realiza por tanto en primer lugar una cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita, no uniéndose VWF a la matriz de hidroxilapatita y a continuación se cromatografía de nuevo la fracción de flujo continuo en condiciones de unión y se eluye la fracción de VWF.

Los rendimientos de las etapas se encuentran entre el 65 % y el 85 %, lo que es muy bueno en cuanto a la alta efectividad de purificación. Para la cromatografía de flujo continuo es conveniente, sin embargo no necesario, usar iones fosfatos como sustancia tampón. Para la elución de VWF en la cromatografía de unión es fosfato un agente específico.

- 55 En una forma de realización especial, en lugar de hidroxilapatita pura como matriz de cromatografía puede usarse fluoroapatita. La fluoroapatita se prepara mediante reacción de hidroxilapatita con una sustancia que contiene fluoruro. La empresa Bio-Rad (Múnich, Alemania) genera por ejemplo fluoroapatita cerámica mediante una conversión al 90 % de hidroxilapatita cerámica con un reactivo de fluoruro. La fluoroapatita es en comparación con la

hidroxilapatita claramente más estable en condiciones de pH ácidas. Por lo tanto se usa fluoroapatita habitualmente para realizar cromatografías a pH más bajo que para hidroxilapatita técnicamente conveniente. Para una purificación de moléculas de VWF con fluoroapatita puede realizarse la cromatografía de manera similar al procedimiento propuesto para hidroxilapatita. Las concentraciones salinas deben adaptarse al valor de pH seleccionado ($\geq 5,0$).

5 El procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender además una o varias de las siguientes etapas:

- (1) congelación ultrarrápida a una temperatura inferior a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelación próxima a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (crioprecipitación)
- (2) precipitación con etanol o adsorción en hidróxido de aluminio
- 10 (3) inactivación de virus de la composición que contiene VWF mediante tratamiento con disolventes/detergentes
- (4) cromatografía de intercambio de aniones
- (5) precipitación de fibronectina mediante ajuste de un valor de pH inferior a pH 5,4
- (6) cromatografía de afinidad
- (7) diafiltración o ultrafiltración
- (8) intercambio de tampón mediante diálisis o filtración en gel
- 15 (9) esterilización por filtración
- (10) liofilización
- (11) inactivación de virus mediante tratamiento con calor (por ejemplo durante aproximadamente 30 min a aproximadamente $100\text{ }^{\circ}\text{C}$)

20 Las etapas de procedimiento (1) a (5) se realizan preferentemente antes de la cromatografía con hidroxilapatita. Sin embargo pueden realizarse también menos de las 5 etapas de procedimiento. El orden de las etapas no es obligatorio.

Las etapas (6) a (11) pueden realizarse, en caso deseado. En particular la cromatografía de afinidad no es sin embargo necesaria, dado que puede obtenerse ya mediante la cromatografía con hidroxilapatita una alta pureza.

25 Como material de partida para los procedimientos de la presente invención puede usarse por consiguiente una fracción de plasma previamente purificada. Según esto puede tratarse de una solución de crioprecipitado adicionalmente purificada. La solución de crioprecipitado puede hacerse precipitar por ejemplo con hidróxido de aluminio y/o puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía. Así puede hacerse precipitar la solución de crioprecipitado, por ejemplo, con hidróxido de aluminio y a continuación puede purificarse adicionalmente por medio de cromatografía de intercambio de aniones. Es igualmente preferente que la solución de crioprecipitado se someta a una inactivación de virus. Un procedimiento preferente para la inactivación de virus es un tratamiento con disolventes/detergentes, tal como se ha descrito en la patente US n.º 4.540.573.

30 Como material de partida puede usarse igualmente una solución de proteínas que contiene VWF recombinante (rVWF) de sobrenadantes de cultivo celular. La expresión "rVWF" comprende también variantes con una secuencia de aminoácidos modificadas con respecto a VWF de tipo natural, pudiéndose sustituir, deleccionar y/o añadir uno o varios aminoácidos. Las variantes presentan por regla general actividad de VWF. Los procedimientos para la preparación de vectores de expresión adecuados, para la infiltración de los vectores en las células huésped y para el cultivo de las células huésped se conocen en sí por el experto (Fischer *et al.* Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero and homo-dimers. FEBS Lett 1994; 351:345-348. Fischer *et al.* Structural analysis of recombinant von Willebrand factor produced at industrial scale fermentation of transformed CHO cells coexpressing recombinant furin. FEBS Lett 1995; 375:259-262).

35 En particular con el uso de fracciones de plasma puede realizarse antes de la cromatografía con hidroxilapatita una precipitación con pH para la separación de fibronectina. La precipitación con pH para la separación de fibronectina de una fracción de plasma comprende por ejemplo que

- 45 (i) se ajuste el valor de pH de la fracción de plasma hasta por debajo de pH 5,4, de modo que se forme un precipitado y
- (ii) se separe el precipitado formado.

La expresión "fracción de plasma" designa en este contexto una composición que se obtuvo del plasma y contiene distintas proteínas plasmáticas. La fracción de plasma que se usa como composición de partida en la etapa (i) es una composición líquida. Preferentemente, la composición líquida es una solución o una suspensión, lo más preferentemente la composición es una solución. En una forma de realización especial, la fracción de plasma es crioprecipitado disuelto. Este crioprecipitado disuelto puede estar previamente purificado mediante distintos procedimientos. Los ejemplos son tratamiento con hidróxido de aluminio, tratamiento con disolventes/detergentes y/o cromatografía de intercambio de aniones. La concentración de cloruro de sodio o cloruro de potasio en la fracción de plasma es preferentemente de 50 a 250 mM, más preferentemente de 100 a 200 mM, lo más preferentemente de 120 a 150 mM. La fracción de plasma puede contener por ejemplo las siguientes sustancias tampón: iones citrato, iones acetato, iones fosfato y/o aminoácidos.

55 La concentración de fibronectina en la fracción de plasma que se somete a la etapa (i) es por regla general al menos 0,05 g/l, preferentemente al menos 0,1 g/l, aún más preferentemente al menos 0,25 g/l, lo más preferentemente al

menos 0,5 g/l. La concentración de fibronectina en la fracción de plasma puede ser por ejemplo de 0,1 a 5 g/l, preferentemente de 0,1 a 2 g/l.

5 Para la separación de fibronectina de la fracción de plasma se ajusta el valor de pH de la fracción de plasma hasta por debajo de pH 5,4. A este respecto se forma un precipitado que contiene fibronectina. Preferentemente se ajusta el valor de pH hasta por debajo de pH 5,3, aún más preferentemente hasta por debajo de pH 5,2. El valor de pH ajustado se encuentra por consiguiente preferentemente en un intervalo de pH 4,5 hasta por debajo de 5,4, preferentemente en un intervalo de pH 4,7 a 5,3, más preferentemente en un intervalo de pH 4,8 a 5,2, aún más preferentemente en un intervalo de pH 4,9 a 5,1. Por regla general se consigue el ajuste del valor de pH mediante adición de un componente ácido. Como componente ácido pueden usarse distintos ácidos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido acético. El componente ácido se añade habitualmente durante un determinado espacio de tiempo, por ejemplo gota a gota. Por consiguiente se ajusta ("se titula") paulatinamente un valor de pH en el intervalo definido en más detalle anteriormente.

15 Durante y tras el ajuste del valor de pH se mantiene la fracción de plasma preferentemente en movimiento o se mezcla, por ejemplo mediante agitación. Se prefiere además que tras el ajuste del valor de pH se mezcle adicionalmente la fracción de plasma durante un determinado espacio de tiempo (por ejemplo mediante agitación), en general durante al menos 10 minutos, preferentemente durante al menos 20 minutos, lo más preferentemente durante un espacio de tiempo de 30 a 90 minutos. En este espacio de tiempo se forman agregados pegajosos que conservan fibronectina en una proporción considerable. Por tanto está previsto de acuerdo con una forma de realización preferente que se use un agitador adecuado, por ejemplo un agitador de anclas cruzadas o agitador de paletas, en cuya pala agitadora se pega el precipitado. La fibronectina precipitada puede extraerse por consiguiente fácilmente de la solución.

20 La precipitación con pH para la separación de fibronectina puede realizarse en un amplio espectro de temperatura, por ejemplo de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 37 °C. Los intervalos de temperatura preferentes son de 4 °C a 35 °C, más preferentemente de 10 °C a 30 °C, de la manera más preferentemente se realiza el procedimiento a de 20 °C a 25 °C.

25 Mediante la precipitación con pH para la separación de fibronectina de fracciones de plasma puede reducirse la concentración de fibronectina en la fracción de plasma en al menos el 50 %. Preferentemente se reduce la concentración de fibronectina en la fracción de plasma en del 70 % al 99 %, más preferentemente en del 80 % al 99 %, lo más preferentemente en del 90 % al 98 % o en del 95 % al 98 %. En una forma de realización especial se encuentra la pérdida de VWF en la etapa de precipitación en como máximo el 50 %, preferentemente en como máximo el 40 %, más preferentemente en como máximo el 30 %, aún más preferentemente en como máximo el 20 %, lo más preferentemente en como máximo el 10 %.

30 Otro aspecto de la presente divulgación es una composición que contiene VWF, que puede obtenerse mediante un procedimiento de acuerdo con la invención, tal como se ha descrito en esta solicitud. Preferentemente se trata de una preparación de VWF esencialmente pura. "Esencialmente pura" significa que la proporción de proteínas de la composición contiene al menos el 70 % de moléculas de VWF.

35 Mediante el procedimiento de acuerdo con la invención pueden conseguirse sin purificación fina actividades específicas de > 60 E por mg de proteína y con purificación fina de >100 E por mg de proteína. La solución de proteínas puede someterse a continuación a un cambio de tampón y liofilizarse. Opcionalmente son posibles también otras etapas de inactivación de virus, tal como por ejemplo la incubación del liofilizado a 100 °C durante 30 minutos.

40 La hidroxilapatita, en particular en su forma estabilizada de manera cerámica es extraordinariamente adecuada para realizar procesos a escala industrial. Puede usarse por ejemplo para la separación de fibronectina de fracciones de plasma que contienen VWF de manera esencialmente más económica y más reproducible que por ejemplo gelatina-sefarosa u otros medios de cromatografía de afinidad. Debido a sus propiedades de separación, la hidroxilapatita ofrece una mejor resolución que los medios de cromatografía de intercambio de iones descritos de manera reiterada. En el procedimiento de purificación con hidroxilapatita no deben añadirse a los tampones ni calcio ni aminoácidos.

45 Dado que hidroxilapatita permite esencialmente velocidades de flujo más altas y tiempos de permanencia más largos que los medios de cromatografía de afinidad usados con frecuencia, se pone a disposición con este procedimiento un procedimiento de preparación extraordinariamente económico para un preparado de VWF muy puro. La excelente capacidad de higienización del material con por ejemplo NaOH 1 M conduce además a una seguridad del producto óptima.

50 Las diversas formas de realización descritas en esta solicitud pueden combinarse entre sí.

Los siguientes ejemplos explican en más detalle la invención.

Ejemplo 1: purificación de una fracción de plasma que contiene VWF por medio de cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita

La solución de proteínas que contiene VWF recorrió las siguientes etapas de purificación previa, tal como se describen por ejemplo en el documento WO 9315105 A1: una solución de crioprecipitado se sometió a una precipitación de hidróxido de aluminio. A continuación se realizó una inactivación de virus por medio de tratamiento con disolventes/detergentes. Durante la siguiente cromatografía de intercambio de aniones se produjo una fracción de lavado que contenía VWF, que estaba impurificada sobre todo con fibrinógeno y fibronectina. La solución de proteínas se sometió mediante titulación hasta pH 5,2 a una etapa de precipitación, en la que se separó una gran parte de la fibronectina y del fibrinógeno. A continuación se realizó una ultrafiltración y diafiltración, concentrándose la solución de proteínas aproximadamente 7 veces y diafiltrándose frente al tampón de migración de la siguiente cromatografía. La solución de proteínas así obtenida contenía aproximadamente 930 µg/ml de antígeno de VWF, 270 µg/ml de antígeno de fibrinógeno y 2400 µg/ml de antígeno de fibronectina. La solución de proteínas se cargó en una columna de hidroxilapatita equilibrada en fosfato de Na 10 mM pH 7,0 (CHT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania). La fracción de flujo continuo contenía aproximadamente 560 µg/ml de antígeno de VWF, 5 µg/ml de antígeno de fibrinógeno y 50 µg/ml de antígeno de fibronectina. El equilibrio de masas da como resultado un rendimiento de etapas del 78 % para el antígeno de VWF. Debido a la muy buena efectividad de purificación puede considerarse el rendimiento como excelente.

Tabla 2: purificación de una fracción de plasma que contiene VWF por medio de cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita

	Antígeno de VWF	Antígeno de fibrinógeno	Antígeno de fibronectina	Rendimiento
Salida	930 µg/ml	270 µg/ml	2400 µg/ml	
fracción de flujo continuo	560 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	78 %

La concentración de antígeno de VWF se determinó con ayuda de STA® Compact de la empresa Diagnostica Stago (Roche Diagnostics, Mannheim) y sus reactivos de ensayo (STA LIA vWF).

Para la determinación de la cantidad de antígeno de fibrinógeno y antígeno de fibronectina se usaron procedimientos nefelométricos para la determinación cuantitativa de la concentración de antígeno de fibrinógeno y de antígeno de fibrinógeno en Beckman-Array® 360 (Beckman Coulter, Monheim).

Ejemplo 2: purificación fina usando una cromatografía de unión con hidroxilapatita

Una solución de proteínas preparada según el ejemplo 1 se tituló para la purificación adicional hasta pH 6,0. A continuación se cargó la solución en una columna de hidroxilapatita (CHT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania), que se había equilibrado en el tampón de migración (fosfato de sodio 20 mM pH 6,0). El VWF se unió cuantitativamente. Una primera elución se realizó con fosfato de sodio 230 mM pH 6,0, la segunda con fosfato de sodio 400 mM pH 6,0. La solución de proteínas cargada contenía 540 µg/ml de antígeno de VWF, 4 µg/ml de fibrinógeno y 48 µg/ml de fibronectina. La primera fracción de elución contenía 38 µg/ml de antígeno de VWF, 2 µg/ml de antígeno de fibronectina. La concentración de antígeno de fibrinógeno se encontraba por debajo del límite de detección de 1 µg/ml. La fracción de valor (2ª fracción de elución) presentaba una concentración de antígeno de VWF de 173 µg/ml. No pudo detectarse ni antígeno de fibrinógeno, ni antígeno de fibronectina. La actividad de VWF ascendía a 23 E/ml, la concentración de proteína total (DO_{280nm}) a 0,23 mg/ml. Se consiguió una actividad específica de 100 E / mg de proteína.

Tabla 3: purificación fina usando una cromatografía de unión con hidroxilapatita

	Antígeno de VWF	Antígeno de fibrinógeno	Antígeno de fibronectina	Actividad específica
Salida	540 mg/ml	4 mg/ml	48 mg/ml	56 E/mg
Fracción de elución 1	38 mg/ml	n.d.	2 mg/ml	12 E/mg
Fracción de elución 2	173 mg/ml	n.d.	n.d.	100 E/mg

La actividad de VWF se determinó como actividad de cofactor de ristocetina por medio de la aglutinación de plaquetas con el BCT®-Analyser (Behring Coagulation Timer, Dade Behring, Schwalbach).

La determinación de proteínas se realizó según la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$), en la que

- 5 A= absorción a 280 nm
 ε= coeficiente de absorción (en este caso coeficiente de absorción teórico 0,75 cm²/mg)
 c= concentración de proteínas en mg/ml
 d= espesor de capa en cm.

Ejemplo 3: aumento de la actividad específica de una fracción de plasma que contiene VWF previamente purificada por medio de cromatografía de unión con fluoroapatita

- 10 La solución de partida se preparó de manera correspondiente al ejemplo 1. La solución de proteínas contenía con una concentración de proteínas de 0,83 mg/ml una actividad específica de 64,8 E/mg. Mediante adición de HCl se tituló la solución de proteína hasta un valor de pH de 6,0. A continuación se cargó la solución en una columna de fluoroapatita (CFT tipo 1, Bio-Rad, Múnich, Alemania) con un volumen de lecho de gel de 13,2 ml, que se había equilibrado en el tampón de migración (fosfato de Na 20 mM pH 6,0). Una parte del VWF se unió. Una separación de impurezas se consiguió mediante una primera elución con un tampón que contenía fosfato de Na 241 mM pH 6,0 (fracción de elución 1). La fracción de valor se eluyó a continuación con fosfato de Na 400 mM pH 6,0. Mediante esta etapa cromatográfica pudo elevarse la actividad específica hasta 77,0 E / mg de proteína. Debido a la unión más débil de VWF en las condiciones de pH seleccionadas no tiene lugar ninguna unión completa del VWF, de modo que se encuentra una parte en la fracción de flujo continuo.

- 20 Tabla 4: aumento de la actividad de VWF específica de una fracción de plasma que contiene VWF previamente purificada por medio de cromatografía con fluoroapatita

	Actividad específica [E por mg de proteína]
Salida	64,8
flujo continuo	47,1
fracción de elución 1	39,3
fracción de valor	77,0

Bibliografía complementaria

- 25 Las siguientes citas bibliográficas con respecto a distintos procedimientos analíticos se mencionan de manera complementaria:

Actividad de VWF:

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

Antígeno de VWF:

- 30 Budde U, *et al.* (1984): Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 64 (5): 981-985.

Newman DJ, Henneberry H, Price CP (1992): Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem* 29 (Pt1): 22-42.

Antígeno de fibronectina:

- 35 Sandberg L, *et al.* (1985): Plasma fibronectin levels in acute and recovering malnourished children. *Clin Physiol Biochem.* 3(5):257-264.

Colli A, *et al.* (1986): Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. *Cancer.*: 58(11):2489-2493.

Antígeno de fibrinógeno:

- 40 Ernst E, Resch KL (1993): Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med.*: 118(12):956-963.

Jelic-Ivanovic Z, Pevcevic N (1990): Fibrinogen determination by five methods in patients receiving streptokinase therapy. Clin Chem.: 36(4):698-699.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de VWF, **caracterizado porque**
 - (i) una composición que contiene VWF y una o varias proteínas contaminantes se pone en contacto con una matriz de hidroxilapatita de modo que al menos una proteína contaminante se une a la matriz de hidroxilapatita, mientras que VWF esencialmente no se une a la matriz de hidroxilapatita, y dado el caso
 - (ii) se separa VWF no unido de la matriz de hidroxilapatita.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** VWF se encuentra en el flujo continuo y al menos una proteína contaminante se une a la hidroxilapatita.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** la proteína contaminante es fibronectina o fibrinógeno.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la cromatografía con hidroxilapatita se realiza con un valor de pH de 6,5 a 8,0, preferentemente de 6,8 a 7,5.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** como tampón de migración se usa una solución que contiene fosfato de sodio y/o fosfato de potasio.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** VWF en otra etapa cromatográfica se une a una matriz de hidroxilapatita y a continuación se eluye.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** en la otra etapa cromatográfica
 - (a) VWF se une a la matriz de hidroxilapatita,
 - (b) las impurezas se separan por lavado y
 - (c) a continuación la fracción de valor que contiene VWF se eluye a concentración salina más alta.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado porque** en la etapa (a) se pone en contacto una composición que contiene VWF, una o varias proteínas contaminantes y fosfato de sodio y/o de potasio de 1 a 200 mM, preferentemente de 1 a 50 mM, con la matriz de hidroxilapatita.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado porque** en la etapa (b) se lava la matriz de hidroxilapatita con un tampón que contiene fosfato de sodio y/o de potasio de 100 a 300 mM, preferentemente de 150 a 250 mM.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado porque** en la etapa (c) se eluye la fracción de valor que contiene VWF con un tampón que contiene fosfato de sodio y/o de potasio de 200 a 500 mM, preferentemente de 250 a 400 mM.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado porque** la cromatografía con hidroxilapatita se realiza con un valor de pH de 5 a 7,5, preferentemente de 5,5 a por debajo de 6,8.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** en primer lugar se realiza una cromatografía de flujo continuo con hidroxilapatita, no uniéndose VWF a la matriz de hidroxilapatita, y a continuación se cromatografía de nuevo la fracción de flujo continuo en condiciones de unión y se eluye la fracción de VWF.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** como material de partida se usa una fracción de plasma previamente purificada.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** como material de partida se usa una solución de crioprecipitado purificada adicionalmente.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** como material de partida se usa una solución de crioprecipitado precipitada con hidróxido de aluminio.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** como material de partida se usa una solución de crioprecipitado precipitada con hidróxido de aluminio, previamente purificada mediante cromatografía.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** antes de la cromatografía con hidroxilapatita se realiza una precipitación con pH para la separación de fibronectina.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado porque** como material de partida se usa una solución de proteínas que contiene VWF de sobrenadantes de cultivo celular.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** se usa hidroxilapatita que contiene iones fluoruro.