

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 380**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2014 PCT/AU2014/050340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15066769**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2014 E 14859399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3066119**

54 Título: **Nuevo método para concentrar el factor de von Willebrand o complejos de este**

30 Prioridad:

08.11.2013 EP 13192189

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

11.12.2018

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)
45 Poplar Road
Parkville VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**LIND, HOLGER;
BECKMANN-SCHELD, SONJA y
PROPP, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 693 380 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

Nuevo método para concentrar el factor de von Willebrand o complejos de este

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para concentrar el factor de von Willebrand (VWF) a partir de una solución acuosa que comprende la precipitación del factor VWF proporcionando iones calcio e iones fosfato y la posterior resolubilización del VWF por medio de una solución acuosa que comprende un compuesto que forma complejos con calcio.

Antecedentes de la invención

10 Uno de los trastornos hemorrágicos más frecuentes es la enfermedad de von Willebrand (EvW), que está provocada por la ausencia del factor de von Willebrand (VWF), niveles reducidos de VWF o la expresión de variantes de VWF con defectos funcionales.

15 El VWF es una de las proteínas plasmáticas más conocidas. El VWF es una glicoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de los mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasis primaria, el VWF actúa como un mediador entre receptores específicos sobre la superficie de las plaquetas y componentes de la matriz extracelular tales como el colágeno. Además, el VWF sirve como portador y proteína estabilizante para el Factor VIII procoagulante. El VWF se sintetiza en las células endoteliales y los megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc del VWF de origen natural se describen en Collins *et al.*, 1987, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, consta de un péptido señal de 22 residuos, un propéptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en el VWF plasmático maduro (Fischer *et al.*, *FEBS Lett.* 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplasmático, se forma un puente disulfuro C terminal entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte adicional a través de la ruta de secreción se añaden 12 cadenas laterales de carbohidratos unidas a N y 10 unidas a O. Cabe destacar que los dímeros de VWF se multimerizan mediante puentes disulfuro N terminales y que el propéptido de 741 aminoácidos de longitud es eliminado mediante escisión por la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío. El propéptido, así como los multímeros de VWF de alto peso molecular (VWF-HMWM) se almacenan en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales o en los gránulos α de las plaquetas.

20 Una vez secretada en el plasma, la proteasa ADAMTS13 escinde el VWF dentro del dominio A1 del VWF. Por tanto, el VWF plasmático consta de toda una gama de multímeros que varía desde dímeros únicos de 500 kDa a multímeros que constan de hasta más de 20 dímeros de un peso molecular superior a 10 000 kDa. El VWF-HMWM tiene de este modo la actividad hemostática más intensa, la cual se puede medir en actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo). Cuanto mayor sea la relación de VWF:RCo/antígeno de VWF, mayor será la cantidad relativa de multímeros de alto peso molecular.

25 Los defectos en el VWF provocan la EvW 0, que se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La EvW tipo 3 es la forma más grave en la que el VWF está completamente ausente, la EvW tipo 1 se relaciona con una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La EvW tipo 2 se refiere a defectos cualitativos del VWF y puede ser tan grave como la EvW tipo 3. La EvW tipo 2 tiene muchas subformas, algunas de las cuales están asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. La EvW tipo 2a se caracteriza por una pérdida de multímeros tanto grandes como intermedios. La EvW tipo 2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de más alto peso molecular.

30 La EvW es el trastorno hemorrágico que se hereda de forma más frecuente en seres humanos y se puede tratar mediante terapia de reemplazo con concentrados que contienen VWF de origen plasmático o recombinante. El VWF se puede preparar a partir de plasma humano, por ejemplo, tal como se describe en el documento EP 0503991. El documento EP 0784632 describe un método para aislar VWF recombinante.

35 En el plasma el Factor VIII se une con una gran afinidad al VWF, donde la unión protege al Factor VIII de un catabolismo prematuro y el VWF desempeña, por tanto, además de su función en la hemostasis primaria, una función crucial para regular los niveles plasmáticos de Factor VIII y, en consecuencia, también es un factor central para controlar la hemostasis secundaria.

40 Se utilizan complejos de Factor VIII/VWF o VWF de origen plasmático o recombinante para obtener preparados farmacéuticos con el fin de tratar la EvW y también se han utilizado complejos de Factor VIII/VWF para tratar la indicación médica de la hemofilia A, enfermedad en la que el Factor VIII está ausente o solamente disponible en concentraciones reducidas o como una variante del Factor VIII con funcionalidad reducida.

A fin de obtener dichos preparados farmacéuticos existe una necesidad de métodos de purificación eficaces y que

se puedan escalar para el VWF.

Debido a su enorme tamaño, los multímeros de VWF son especialmente sensibles a la tensión de cizalla. Ya a una tensión de cizalla superior a 2000 s^{-1} , los multímeros de VWF comienzan a desplegarse y el VWF desplegado es entonces proclive a la degradación y la desnaturalización. Los métodos comunes para concentrar proteínas terapéuticas en los procesos de fabricación industriales como la ultrafiltración no son adecuados para concentrar VWF en la fabricación a escala industrial, porque ejercen demasiada tensión de cizalla. El documento WO 2010/025278 ofrece una solución técnica para lograr la concentración del VWF sin comprometer su actividad específica que utiliza membranas de fibra hueca, pero existe la necesidad de identificar tecnologías alternativas para concentrar el VWF a partir de soluciones que comprenden VWF que sean más sencillas, más asequibles y que se puedan escalar, a la vez que preservan la integridad estructural y la actividad biológica de esta macromolécula compleja.

La precipitación de proteínas es una técnica conocida en la técnica anterior. Sin embargo, para cada proteína concreta, se deben identificar el agente de precipitación y los parámetros de precipitación óptimos. Una manera en la que se puede conseguir la precipitación es mediante procedimientos de precipitación salina (por ejemplo, mediante el uso de sulfato amónico), donde los componentes iónicos de la sal utilizada para la precipitación compiten con la proteína diana por las moléculas de agua y si la concentración de los iones salinos es suficientemente elevada, la proteína diana llega a estar insuficientemente hidratada para mantenerse en solución, lo que da lugar a la precipitación de la proteína diana. Sin embargo, los precipitados obtenidos mediante procedimientos de precipitación salina son a menudo difíciles de resolubilizar. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar métodos para precipitar el VWF que permitan una resolubilización fácil y suave, a la vez que preservan la integridad estructural y la actividad biológica del VWF.

La precipitación también se lleva a cabo a menudo como coprecipitación, donde el agente precipitante también precipita con la proteína de interés. Dependiendo de la naturaleza del agente precipitante, la proteína diana se debe purificar posteriormente del agente precipitante, de modo que la proteína diana no esté contaminada con el agente precipitante. Los agentes precipitantes potentes como los polielectrolitos sintéticos pueden ser muy difíciles o lentos de eliminar y liberar de la proteína diana.

La precipitación del VWF con una combinación de glicina y cloruro sódico también se ha descrito en la técnica anterior (documento EP1405863). Sin embargo, se requieren cantidades elevadas de sales y es difícil evitar la precipitación no deseada de otros componentes de la solución aparte de la proteína diana. Si, por ejemplo, la solución de VWF contiene aún un tensioactivo como ácido plurónico que se utiliza normalmente en los medios de cultivo celular, las condiciones de precipitación descritas en el documento EP1405863 pueden dar lugar a la coprecipitación de ácido plurónico que puede incluso comprender la precipitación de la proteína diana.

El documento US 5 679 776 describe el uso de cloruro bórico 80 mM para eliminar un complejo de protrombina de una solución de VWF en forma de complejo con el Factor VIII mediante la precipitación del complejo de protrombina, pero no del complejo VWF/Factor VIII. Se ha descubierto recientemente de forma sorprendente que se puede utilizar una combinación de iones calcio, que es, como el bario, un metal alcalinotérreo, con iones fosfato para precipitar el VWF con un rendimiento elevado, donde el precipitado se puede resolubilizar posteriormente en condiciones suaves con un agente de formación de complejos con calcio, a la vez que se mantiene la actividad biológica del VWF.

Descripción de la invención

Es un objetivo de esta invención proporcionar un método para concentrar VWF a partir de una solución acuosa que comprende los pasos de

- (a) precipitar VWF proporcionando de iones calcio e iones fosfato a la solución acuosa,
- (b) separar el precipitado formado en el paso (a) de la solución acuosa,
- (c) resolubilizar el precipitado aislado en el paso (b) por medio de una solución acuosa que comprende un agente de formación de complejos con calcio.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para concentrar VWF mediante la precipitación de VWF a partir de una solución acuosa poniendo en contacto dicha solución acuosa con iones calcio e iones fosfato, lo que da lugar a la precipitación del VWF y el fosfato de calcio. El precipitado que comprende el VWF se separa de la solución acuosa y se resolubiliza en condiciones suaves que mantienen la actividad biológica del VWF mediante la adición de una solución acuosa al precipitado que comprende un agente de formación de complejos con calcio.

En realizaciones preferidas, la invención se refiere a un método para concentrar el Factor de von Willebrand (VWF) a partir de una solución acuosa, que comprende los

pasos de

- (a) precipitar el VWF proporcionando iones calcio e iones fosfato a la solución acuosa,
- (b) separar el precipitado formado en el paso (a) de la solución acuosa,
- (c) resolubilizar el precipitado aislado en el paso (b) por medio de una solución acuosa que comprende un agente de formación de complejos con calcio.

5

En realizaciones preferidas de la invención, se utiliza una concentración de los iones fosfato de entre al menos 1 mM y hasta por debajo de 10 mM y una concentración de los iones calcio de al menos 16 mM.

En otras realizaciones preferidas de la invención, se utiliza una concentración de los iones fosfato de al menos 10 mM y una concentración de los iones calcio de al menos 10 mM.

- 10 En una realización preferida, la concentración de los iones fosfato es de 5 mM y la concentración de los iones calcio se selecciona a partir de un intervalo de entre 50 mM y 60 mM que incluye los extremos de ese intervalo.

Se pueden utilizar múltiples combinaciones de ciertas concentraciones de fosfato junto con una cierta concentración de calcio. Por ejemplo, y sin limitar la invención, se pueden utilizar las siguientes combinaciones de concentraciones.

Una concentración 1 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

- 15 Una concentración 2 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 3 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 4 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 6 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

- 20 Una concentración 7 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 8 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 16 mM/L de iones calcio.

- 25 o

Una concentración 1 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 2 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 3 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 4 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

- 30 Una concentración 5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 6 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 7 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 8 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

- 35 Una concentración 9.5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

o

Una concentración 9.9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 100 mM/L de iones calcio.

o

Una concentración 1 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 2 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

5 Una concentración 3 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 4 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 6 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 7 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

10 Una concentración 8 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

o

15 Una concentración 1 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 2 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 3 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 4 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

20 Una concentración 6 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 7 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 8 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

Una concentración 9.5 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

25 Una concentración 9.9 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

En otras realizaciones de la invención, por ejemplo, y sin limitar la invención, se pueden utilizar las siguientes combinaciones de concentraciones:

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 10 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 15 mM/L de iones calcio.

30 Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 20 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 25 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 30 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 35 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 40 mM/L de iones calcio.

35 Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 45 mM/L de iones calcio.

Una concentración 10 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 50 mM/L de iones calcio.

Una concentración 50 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 200 mM/L de iones calcio.

Una concentración 50 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 300 mM/L de iones calcio.

Una concentración 50 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 400 mM/L de iones calcio.

Una concentración 50 mM/L de iones fosfato se puede combinar con una concentración 500 mM/L de iones calcio.

5 La concentración del agente de formación de complejos con calcio utilizada en el paso (c) es menos crítica. Preferentemente, el intervalo está por encima de 80 mM, o por encima de 100 mM, o por encima de 120 mM, o por encima de 150 mM, o por encima de 200 mM, o por encima de 250 mM, o hasta el límite de solubilidad superior del agente de formación de complejos con calcio.

10 El experto en la técnica optimizará el agente de formación de complejos con calcio deseado de acuerdo con la cantidad de precipitado de fosfato cálcico que comprende VWF formado y aumentará la concentración hasta que el agente de formación de complejos con calcio esté lo suficientemente concentrado como para disolver más o menos por completo el precipitado de fosfato cálcico que comprende VWF. El único límite superior es la solubilidad del agente de formación de complejos con calcio a la temperatura concreta de la solución.

15 La temperatura y el pH a los que se lleva a cabo la precipitación no son críticos. Por ejemplo, la temperatura puede ser de entre 21 °C y 37 °C y el pH de entre 5.3 y 7.5.

20 El término "VWF" o la expresión "factor de von Willebrand" se utilizan indistintamente en la presente invención. El término, tal como utiliza en la presente, incluye también variaciones alélicas naturales que pueden existir y tener lugar de un individuo a otro. El término "VWF" o la expresión "Factor de von Willebrand" dentro de la definición anterior incluye además variantes de VWF. Dichas variantes pueden diferir en uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de origen natural. Los ejemplos de dichas diferencias pueden incluir como sustituciones de aminoácidos conservadoras, es decir, sustituciones dentro de grupos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, (1) aminoácidos de bajo peso molecular, (2) aminoácidos ácidos, (3) aminoácidos polares, (4) aminoácidos básicos, (5) aminoácidos hidrófobos y (6) aminoácidos aromáticos. Algunos ejemplos de dichas sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla. Las variantes de VWF incluyen también proteínas de fusión con VWF, por ejemplo, proteínas de fusión con albúmina o fusiones a fragmentos de anticuerpo que incluyen fusiones a la parte Fc, o fusiones con XTEN. También se engloban VWF conjugados químicamente con otras moléculas como péptidos de unión a albúmina, PEG, HES y otros conjugados que aumentan la semivida. También se engloban cualesquiera de los VWF anteriores en un complejo con FVIII, sea un complejo no covalente o una unión covalente a FVIII.

30

Tabla 1:

(1)	Alanina	Glicina		
(2)	Ácido aspártico	Ácido glutámico		
(3)	Asparagina	Glutamina	Serina	Treonina
(4)	Arginina	Histidina	Lisina	
(5)	Isoleucina	Leucina	Metionina	Valina
(6)	Fenilalanina	Tirosina	Triptófano	

Un beneficio potencial adicional de esas realizaciones de la presente invención es que la actividad biológica del VWF se mantiene.

35 La "actividad biológica" del VWF de origen natural puede ser determinada por el experto utilizando métodos para la actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo, Federici AB *et al.*, 2004, *Haematologica* 89:77-85), la unión de VWF a GP Iba del complejo de glicoproteína plaquetaria Ib-V-IX (Sucker *et al.* 2006. *Clin Appl Thromb Hemost.* 12:305-310), o un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. *Annals of Hematology* 80:466-471).

40 La relación de la actividad biológica del VWF sobre el contenido de antígeno del VWF (VWF:RCo/VWF:Ag) que se obtiene de acuerdo con la invención es de al menos un 70%, preferentemente de al menos un 75%, preferentemente de al menos un 80%, preferentemente de al menos un 85%, preferentemente de al menos un 90%, preferentemente de al menos un 98%, más preferentemente de al menos un 98% de la relación correspondiente del material de partida, es decir, en la solución acuosa utilizada en el paso (a) del método reivindicado. En el plasma, la relación de VWF:RCo/VWF:Ag es de 1.0, sin embargo, el VWF recombinante puede tener también valores de 1.2 en el material

de partida.

El rendimiento de VWF:RCo de acuerdo con el método de la invención es de al menos un 50%, preferentemente de al menos un 60%, preferentemente de al menos un 70%, preferentemente de al menos un 75%, preferentemente de al menos un 80%, preferentemente de al menos un 85%, preferentemente de al menos un 90%, de la manera más preferente de al menos un 95%.

La expresión "separar el precipitado" en el sentido de la invención es cualquier medio para separar el precipitado de la solución de precipitación, es decir, la solución acuosa utilizada en el paso (a) del método reivindicado, que engloba, por ejemplo, el uso de separadores o el uso de centrifugas. Si se utiliza un paso de centrifugación, se elimina el sobrenadante y se mezcla el precipitado restante con una solución acuosa que comprenda un agente de formación de complejos con calcio.

La solución acuosa utilizada en el paso (c) que comprende el agente de formación de complejos con calcio es preferentemente un tampón, es decir, una solución acuosa que comprende uno o más agentes tamponantes que mantienen el pH a un nivel determinado.

En el sentido de la presente invención, la expresión "agente de formación de complejos con calcio" se refiere a un agente con la capacidad de formar un complejo entre el calcio y el agente de formación de complejos. La formación de un complejo engloba la formación de dos o más uniones separadas entre un ligando polidentado, es decir, el compuesto químico o el polipéptido de interés y un único átomo central. Normalmente dichos compuestos químicos son compuestos químicos orgánicos y se denominan quelantes, quelatantes, agentes quelantes o agentes secuestrantes. El compuesto químico forma un complejo quelato con el único ión de calcio central. Los complejos quelatos constrostran con los complejos de coordinación con ligandos monodentados, los cuales forman solamente un enlace con un calcio central. A modo de ejemplos no limitantes, los siguientes agentes son compuestos químicos con la capacidad de formar complejos con calcio de acuerdo con la invención:

a) compuestos químicos que comprenden un grupo pentaacético y sus diversas sales, como ácido dietilentiainopentaacético (DTPA o ácido pentético), Pentetide, Indo-1 y Fura-2;

b) compuestos químicos que comprenden un grupo tetraacético y sus diversas sales, como ácido 1,2-bis(o-etano-*N,N,N'*-tetraacético (BAPTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus diversas sales (como EDTA diamónico, EDTA dipotásico dihidratado: EDTA disódico; EDTA trisódico; EDTA tetrasódico y EDTA tetraamónico) y ácido etilenglicoltetraacético (EGTA);

c) compuestos químicos que comprenden un grupo triacético y sus diversas sales, como ácido *N*-(hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y ácido nitrilotriacético (NTA);

c) compuestos químicos que comprenden un grupo triacético y sus diversas sales, como ácido *N*-(hidroxietil)etilendiaminotriacético (HEDTA) y ácido nitrilotriacético (NTA);

d) compuestos químicos que comprenden un grupo diacético y sus diversas sales, como ácido Iminodiacético (IDA), iminodisuccinato tetrasódico, citrato trisódico y

e) compuestos químicos que comprenden múltiples grupos amino, como aminoetiletanolamina (AEEA), 2,3-difeniletildiamina, etilendiamina, ácido etilendiamino-*N,N'*-bis(2-hidroxifenilacético), ácido etilendiamino-*N,N'*-disuccínico, tetrahidroxipropiletildiamina, trietilentetramina y ácido poliaminocarboxílico

f) compuestos químicos que comprenden múltiples grupos tioles, como dimeracprol, ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ácido dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), dietilditiocarbamato sódico

g) ácido fosfónico y derivados de este y sus diversas sales, como ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP), ácido dietlentiainopenta(metilenfosfónico), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP), ácido etidróico o ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP).

Se ha de sobreentender que el hecho de enumerar un agente de formación de complejos con calcio como un ión o una sal determinada engloba asimismo el ión en sales diferentes.

Los siguientes agentes de formación de complejos también son compuestos químicos con la capacidad de formar complejos con calcio en el sentido de la invención. Ácido acetilacetónico, acetilacetona, benzotriazol, 2,2'-bipiridina, 4,4'-bipiridina, 1,2-bis(dimetilarsino)benzeno, 1,2-bis(dimetilfosfino)etano, 1,2-bis(difenilfosfino)etano, benzotriazoles, clatroquelato, 2.2.2-criptando, catecol, corrol, éter corona, 18-corona-6, criptando, cicleno, ciclodextrinas, deferasirox, deferiprona, deferoxamina, dexrazoxano, diglima, dimetilglioxima, ditioleno, etanodiol, ácido etidróico, ferricromo, ácido glucónico, metalocorona, caseína hidrolizada, hexafluoroacetilacetona, penicilamina, fenantrolina, fosfonato, fitoquelatina, porfina, porfirina, pirofosfato, ligando escorpionato, poli(aspartato) sódico. Terpiridina,

tetrafenilporfirina, 1,4,7-triazaciclononano, trimetafosfatos Triphos y 1,4,7-tritiaciclononano.

Una realización especialmente preferida de la invención son procesos que utilizan ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como el agente de formación de complejos con calcio en el sentido de la invención. El EDTA es un ácido carboxílico poliamínico con la fórmula $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$. Su utilidad surge debido a su función como agente quelante, es decir, su capacidad para "secuestrar" iones metálicos tales como Ca^{2+} y Fe^{3+} . Después de unirse al EDTA, los iones metálicos permanecen en solución, pero muestran una reactividad reducida. El EDTA se produce en forma de varias sales, en especial EDTA disódico y EDTA disódico de calcio. El peso molecular es de 292.24 Da. En la química de coordinación, el EDTA^{4-} es un miembro de la familia de ligandos ácidos carboxílicos poliamínicos. El EDTA^{4-} normalmente se une a un catión metálico a través de sus dos aminas y cuatro carboxilatos. Muchos de los compuestos químicos de coordinación resultantes adoptan una geometría octaédrica. El EDTA también puede unirse a cargas catiónicas de matrices de AEX.

También son realizaciones especialmente preferidas de la invención procesos que utilizan ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) como el compuesto químico.

El VWF, las proteínas de VWF o un complejo de VWF y el Factor VIII tal como se describen en esta invención se pueden formular en forma de preparados farmacéuticos para uso terapéutico. La proteína o proteínas purificadas se pueden disolver en soluciones tampón acuosas fisiológicamente compatibles convencionales a las que se pueden añadir, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para obtener preparados farmacéuticos.

Dichos portadores y excipientes farmacéuticos, así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas son muy conocidos en la técnica (remítase, por ejemplo, a "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer *et al.*, Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3.ª edición, Kibbe *et al.*, *Pharmaceutical press* (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante del polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o líquida estable. La variante del polipéptido se puede liofilizar mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se suministran al individuo mediante cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. Preferencialmente, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para el uso sistémico, las proteínas de inserción de la invención se formulan para suministro parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmico) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con métodos convencionales. Las vías de administración más preferenciales son la administración intravenosa y la subcutánea. Las formulaciones se pueden administrar de forma continua mediante infusión o inyección en bolo. Algunas formulaciones engloban sistemas de liberación lenta.

Los preparados farmacéuticos preparados mediante la invención se administran a pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que se refiere a una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o extensión de la afección o indicación que se está tratando sin alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como, por ejemplo, la indicación, formulación, modo de administración y se ha de determinar en ensayos preclínicos y clínicos para cada respectiva indicación.

La composición farmacéutica preparada mediante el método de la invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo producto farmacéutico. Un ejemplo de dicho agente es la combinación de Factor VIII modificado con VWF no modificado o la combinación de Factor VIII no modificado con VWF modificado o la combinación de Factor VIII modificado con VWF modificado.

Todos los ejemplos se evaluaron utilizando el coagulómetro de Behring (BCT, por sus siglas en inglés) y los kits de reactivos de Siemens HealthCare Diagnostics para VWF:Ag (antígeno) y VWF:RCo (actividad). La relación calculada de RCo/Ag es un indicador de la calidad del VWF. Un descenso de ese valor durante el proceso indicaría una pérdida de calidad del VWF, lo que implica una pérdida de actividad biológica del VWF purificado en relación con la cantidad de antígeno de VWF purificado.

El material de partida para los Ejemplos 1 a 11 fue proteína de fusión de albúmina y VWF recombinante tal como se describe en el documento WO 2009/156137 en células CHO, pero producida en medio PowerCHO-3CD sintético (N.º de cat. de Lonza BESP1073Q). El sobrenadante del cultivo celular se recogió de un fermentador de perfusión de 5 litros, que estuvo en funcionamiento hasta 26 días con un factor de perfusión de 1.5 (se recogieron aproximadamente 10 litros de sobrenadante por recolección cada dos días comenzando el día seis). Las recolecciones filtradas se dividieron en alícuotas y se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Una solución patrón de 250 mM/L de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se preparó disolviendo un sobre de PBS listo para su uso (Sigma; P-5368) en 40 mL de H_2O . El EDTA utilizado en todos los experimentos fue EDTA disódico dihidratado, pero

posteriormente denominado solo EDTA. El CaCl₂ utilizado fue CaCl₂ dihidratado.

Ejemplo 1: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo utilizando diferentes concentraciones de fosfato

5 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y se añadió solución patrón de fosfato tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2:

	concentración de fosfato final (mM/L)	μL
preparado 1	1.0	160
preparado 2	2.5	400
preparado 3	5.0	800
preparado 4	7.5	1200

10 Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L CaCl₂*2H₂O al preparado con agitación a una temperatura de 30 °C a 37 °C en un baño de agua. Por consiguiente, la concentración final de calcio fue de aproximadamente 40 mM/L. Se añadió el calcio en dos minutos con mezclado y después un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado resultante se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L + EDTA 120 mM/L a pH 7.2 y a 37 °C.

15 Los datos en la Tabla 3 muestran que el fosfato 5 mM proporcionó el mejor rendimiento en el pellet disuelto. Al parecer, la concentración total de fosfato que se evaluó también funcionaba y no tenía influencia negativa sobre la relación de VWF:RCo/VWF:Ag.

Tabla 3:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	40	4.5	180	100%	4.9	197	100%	1.09
pellet disuelto 1.0 mM	3	17.9	54	30%	21.1	63	32%	1.18
pellet disuelto 2.5 mM	3	37.2	112	62%	41.9	126	64%	1.13
pellet disuelto 5.0 mM	3	49.5	149	83%	57.4	172	87%	1.16
pellet disuelto 7.5 mM	3	45.9	138	77%	46.5	140	71%	1.01

20 **Ejemplo 2:** Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con diferentes concentraciones de calcio

25 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y en cada caso se añadieron 800 μL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM. Después de preparar una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O, se añadieron diferentes cantidades de esta solución al preparado con agitación a una temperatura de 30 °C a 37 °C en un baño de agua para obtener cuatro concentraciones diferentes tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4:

	concentración final de calcio mM/L	mL
preparado 1	20	0.730
preparado 2	40	1.487
preparado 3	60	2.280

preparado 4	80	3.105
-------------	----	-------

5 La adición de la solución de calcio llevó dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado resultante se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L + EDTA 120 mM/L a pH 7.2 y a 37 °C.

Los datos en la Tabla 5 muestran que una concentración de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mM proporcionó el mejor rendimiento. No existe diferencia real en la relación de VWF:RCo/VWF:Ag para todos los preparados y solamente un ligero descenso después de la precipitación.

Tabla 5:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	con c. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	35	3.6	127	100%	49	170	100%	1.34
pellet disuelto 20 mM	2.3	38.4	88	70%	47.7	110	65%	1.24
pellet disuelto 40 mM	2.3	43.2	99	78%	54.9	126	74%	1.27
pellet disuelto 60 mM	2.3	47.1	108	85%	60.4	139	82%	1.28
pellet disuelto 80 mM	2.3	47.4	109	86%	57.6	132	78%	1.21

10

Ejemplo 3: Preparación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular a diferentes valores de pH

15 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y en cada caso se añadieron 800 μL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM. Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a diferentes valores de pH a los diferentes sobrenadantes, lo que portó las soluciones a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio a los diferentes valores de pH mostrados en la Tabla 6 a continuación con agitación a una temperatura de 30 °C a 37 °C en un baño de agua.

Tabla 6:

	pH
preparado 1	5.3
preparado 2	6.5
preparado 3	7.0
preparado 4	7.5

20 La adición tuvo lugar durante dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L + EDTA 120 mM/L a pH 7.2 y a 37 °C.

25 Los datos en la Tabla 7 muestran que el pH del $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no tuvo influencia en el resultado de la precipitación. Lo más probable es que las ligeras diferencias se deban a la variabilidad de la prueba. El pH 5.3 representa una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que no tenía el pH ajustado y por tanto, se mantuvo el pH 5.3 durante los siguientes Ejemplos.

Tabla 7:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	40	4.5	180	100%	4.9	197	100%	1.09
pellet disuelto a pH 5.3	3	51.0	153	85%	54.2	163	83%	1.06
pellet disuelto a pH 6.0	3	48.3	145	81%	52.3	157	80%	1.08
pellet disuelto a pH 6.5	3	51.3	154	86%	53.0	159	81%	1.03
pellet disuelto a pH 7.0	3	52.2	157	87%	56.8	170	87%	1.09

Ejemplo 4: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular y redisolución con tampones de diferentes valores de pH

- 5 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y en cada caso se añadieron 800 µL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM. Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al preparado con agitación a una temperatura de 30 °C - 37 °C en un baño de agua, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó entonces mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg.

El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L + EDTA 120 mM/L a 37 °C y a diferentes valores de pH tal como se muestra en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8:

	pH
preparado 1	6.4
preparado 2	6.8
preparado 3	7.2
preparado 4	7.6

- 15 Los datos en la Tabla 9 muestran que el pH del tampón en solución no tuvo influencia en el resultado de la precipitación. Lo más probable es que las ligeras diferencias se deban a la variabilidad de la prueba. Para experimentos futuros se seleccionó un pH de 7.2.

Tabla 9:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	40	4.5	179	100%	4.5	178	100%	0.99
pellet disuelto a pH 6.4	3	48.9	147	82%	49.8	149	84%	1.02

pellet disuelto a pH 6.8	3	44.1	132	74%	42.7	128	72%	0.97
pellet disuelto a pH 7.2	3	48.6	146	81%	53.5	161	90%	1.10
pellet disuelto a pH 7.6	3	51.9	156	87%	52.1	156	88%	1.00

Ejemplo 5: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular y redisolución con diferente concentración de EDTA del tampón en solución

- 5 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y en cada caso se añadieron 800 µL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM. Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O al preparado con agitación a una temperatura de 30 - 37 °C en un baño de agua, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó entonces mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg.

El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L a un pH de 7.2 a 37 °C y a diferentes concentraciones de EDTA tal como se muestra en la Tabla 10 a continuación.

15

Tabla 10:

	mM/L de EDTA
preparado 1	80
preparado 2	120
preparado 3	160
preparado 4	200

Los datos en la Tabla 11 muestran que una concentración de EDTA 120 mM proporcionó el mejor rendimiento, aunque todas las demás concentraciones evaluadas funcionaron prácticamente igual de bien. No hubo ninguna diferencia real en la relación entre todos los preparados.

20

Tabla 11:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	40	4.6	185	100%	4.5	178	100%	0.96
pellet disuelto 80 mM	3	41.2	124	67%	44.8	135	76%	1.09
pellet disuelto 120 mM	3	48.3	145	78%	52.8	158	89%	1.09
pellet disuelto 160 mM	3	47.1	141	76%	49.1	147	83%	1.04

pellet disuelto 200 mM	3	46.8	140	76%	47.0	141	79%	1.01
------------------------	---	------	-----	-----	------	-----	-----	------

Ejemplo 6: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular a diferentes temperaturas

5 Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 40 mL y en cada caso se añadieron 800 µL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM. Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O al preparado, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio con agitación a cuatro temperaturas diferentes tal como se muestra en la Tabla 12 en un baño de agua.

10

Tabla 12:

	temperatura
preparado 1	21 °C
preparado 2	25 °C
preparado 3	30 °C
preparado 4	37 °C

La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó entonces mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg.

15 El precipitado separado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EDTA 120 mM a un pH de 7.2 a 37 °C.

Los datos en la Tabla 13 muestran que se pudo conseguir un ligero aumento en el rendimiento y la relación precipitando a una temperatura de 37 °C.

20

Tabla 13:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU=mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
solución inicial	40	4.6	185	100%	4.8	190	100%	1.03
pellet disuelto a 21 °C	3	50.7	152	82%	50.6	152	80%	1.00
pellet disuelto a 25 °C	3	51.6	155	84%	51.6	155	81%	1.00
pellet disuelto a 30 °C	3	52.2	157	85%	54.4	163	86%	1.04
pellet disuelto a 37 °C	3	52.5	158	85%	56.3	169	89%	1.07

Ejemplo 7: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con centrifugación de diferente extensión

25

Se prepararon cuatro preparados de un sobrenadante de 35 mL y en cada caso se añadieron 800 µL de solución patrón de fosfato, lo que dio lugar a una concentración de fosfato de 5 mM.

30

Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O al preparado con agitación a 37 °C en un baño de agua, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó entonces mediante centrifugación a 3000 xg durante varias extensiones de tiempo tal como se indica en la Tabla 14.

35

Tabla 14:

	tiempo de centrifugación (minutos)
preparado 1	10
preparado 2	20
preparado 3	30
preparado 4	40

El precipitado aislado se redisolvió en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EDTA 120 mM a un pH de 7.2 a 37 °C.

5 Los datos en la Tabla 15 muestran que el tiempo de centrifugación no tiene influencia en el resultado de la precipitación. Lo más probable es que las ligeras diferencias se deban a la variabilidad de la prueba. No obstante, un tiempo de centrifugación más corto podría ser de interés para reducir el tiempo del proceso global.

10 **Tabla 15:**

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	
solución inicial	35	3.6	127	100%	5.0	173	100%	1.36
pellet disuelto 10 min	2.3	48.0	110	87%	65.7	151	87%	1.37
pellet disuelto 20 min	2.3	48.9	112	89%	69.3	159	92%	1.42
pellet disuelto 30 min	2.3	47.7	110	86%	62.9	145	83%	1.32
pellet disuelto 40 min	2.3	47.4	109	86%	61.6	142	82%	1.30

Ejemplo 8: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con diferente fosfato y redisolución del precipitado con diferentes concentraciones de EDTA

15 Se prepararon seis preparados de un sobrenadante de 40 mL y se añadió solución patrón de fosfato para obtener una concentración de fosfato final tal como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16:

	conc. de fosfato final mM/L	µL
preparado 1	5.0	800
preparado 2	5.0	800
preparado 3	7.5	1200
preparado 4	7.5	1200
preparado 5	10	1600
preparado 6	10	1600

20 Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O al preparado con agitación a 37 °C en un baño de agua, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de calcio. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado.

25 Los precipitados aislados de los preparados 1/3/5 se redisolvieron a 37 °C en tampón de HEPES 20 mM/L + EDTA 120 mM/L a pH 7.2 y los preparados 2/4/6 se redisolvieron a 37 °C en tampón de HEPES 20 mM/L + EDTA 160 mM/L a pH 7.2.

30 Los datos en la Tabla 17 muestran que el fosfato 5 mM proporciona el mejor rendimiento con ambas concentraciones de EDTA en el pellet disuelto. Los rendimientos de la otra combinación de tampón disminuyen, aunque aún proporcionan rendimientos satisfactorios.

Tabla 17:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	
solución inicial	40	4.4	176	100%	4.8	193	100%	1.10
pellet disuelto 5.0/120 mM	3	54.0	162	92%	55.4	166	86%	1.03
pellet disuelto 5.0/160 mM	3	54.0	162	92%	56.6	170	88%	1.05
pellet disuelto 7.5/120 mM	3	43.2	130	74%	46.9	141	73%	1.09
pellet disuelto 7.5/160 mM	3	48.0	144	82%	52.1	156	81%	1.09
pellet disuelto 10/120 mM	3	36.0	108	61%	36.3	109	56%	1.01
pellet disuelto 10/160 mM	3	41.7	125	71%	48.8	147	76%	1.17

Ejemplo 9: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular y disolución con tampón que contiene EGTA

5

Se añadieron 800 µL de solución patrón de fosfato a un sobrenadante de 40 mL, lo que portó la solución a una concentración de fosfato 5 mM. Después de mezclar, se añadieron 1.663 mL de solución de 1 mol/L de CaCl₂ + 2H₂O al preparado con agitación a 37 °C en un baño de agua, lo que portó la solución a una concentración de aproximadamente 40 mM/L de CaCl₂ *2H₂O. La adición tuvo lugar durante dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se aisló mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado aislado se redisolvió a 37 °C con un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EGTA 120 mM/L a pH 7.2.

10

Los datos en la Tabla 18 muestran que se puede utilizar EGTA en lugar de EDTA para redissolver el pellet con un rendimiento comparable.

15

Tabla 18:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	
solución inicial	40	3.9	156	100%	3.8	152	100%	0.98
pellet disuelto	3	36.0	108	69%	40.2	121	79%	1.12

Ejemplo 10: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con diferente concentración de fosfato, calcio, y redisolución del precipitado con diferentes concentraciones de EDTA

20

Este ejemplo debería evaluar si una concentración aumentada 4 o 10 veces de los tres componentes del tampón funciona aún y si un aumento de 4 o 10 veces de la concentración de fosfato sola tiene algún impacto sobre la precipitación. Como control se evaluaron también las concentraciones estándar (preparado 1).

25

Se prepararon cinco preparados de un sobrenadante de 35 mL y se añadió solución patrón de fosfato para obtener una concentración de fosfato final tal como se muestra en la Tabla 19. Se añadieron diferentes cantidades de esa disolución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O tal como se muestra en la Tabla 19 al preparado con agitación a 37 °C en un baño de agua. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos

adicionales sin mezclado. El precipitado se aisló mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado aislado se redisolvió a 37 °C con un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y diferente concentración de EDTA tal como se muestra en la Tabla 19 a pH 7.2.

5

Tabla 19:

	fosfato mM/L	calcio mM/L	EDTA mM/L
preparado 1	5	50	120
preparado 2	20	200	480
preparado 3	50	500	667

10

Los datos en la Tabla 20 muestran que un aumento de 4 veces en la concentración de tampón (preparado 2) proporciona aún buenos resultados, pero el aumento de 10 veces (preparado 3) no funcionó a causa del hecho de que la concentración de EDTA 667 mM (en lugar de la concentración de 1200 mM deseada) es el límite de solubilidad superior y parece ser que la cantidad no es suficientemente elevada para conseguir disolver el pellet. El hecho de aumentar solamente la concentración de fosfato en 4 o 10 veces no funcionó. La precipitación sí funcionó, lo que se muestra por el peso de pellet mayor, pero la redisolución no funcionó. La concentración estándar del preparado 1 daba los buenos resultados esperados.

15

Tabla 20:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)	pellet peso gramos
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)		
solución inicial	35	0.71	25	100%	0.85	30	100%	1.20	
pellet disuelto 1 5/50/120	3.5	7.7	27	108%	7.7	27	91%	1.00	0.43
pellet disuelto 2 20/200/480	6.0	4.1	25	100%	4.2	25	85%	1.02	2.95
pellet disuelto 3 50/500/667	6.0	0.47	3	11%	< 0.099				3.85

Ejemplo 11: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con diferente concentración de fosfato, calcio, y redisolución del precipitado con diferentes concentraciones de EDTA.

20 Este ejemplo evaluó si las concentraciones de calcio o EDTA solos aumentadas 4 o 10 veces aún funcionan y si la concentración disminuida 1/5 de los tres componentes del tampón aún funciona. Como control, se evaluaron también las concentraciones estándar (preparado 1).

25 Se prepararon seis preparados de un sobrenadante de 35 mL y se añadió solución patrón de fosfato para obtener una concentración de fosfato final tal como se muestra en la Tabla 21. Se añadieron al preparado diferentes cantidades de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O tal como se muestra en la Tabla 21 con agitación a 37 °C en un baño de agua. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se aisló mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado aislado se redisolvió a 37 °C con un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y diferente concentración de EDTA tal como se muestra en la Tabla 21 a pH 7.2.

30

Tabla 21:

	fosfato mM/L	calcio mM/L	EDTA mM/L
preparado 1	5	50	120
preparado 2	5	200	120
preparado 3	5	500	120
preparado 4	5	50	667
preparado 5	5	50	120
preparado 6	1	10	24

35

Los datos en la Tabla 22 muestran que aumentar la concentración de calcio 4 y 10 veces tiene prácticamente un impacto nulo sobre el tamaño de pellet, pero el rendimiento disminuye claramente en función de la concentración de calcio. El aumento solamente de la concentración de EDTA en 4 o 10 veces funcionó muy bien. El rendimiento fue el mismo que con la concentración estándar, pero la calidad mejoraba. Desafortunadamente, una concentración de EDTA elevada que da como resultado una conductividad elevada no es preferible para el pellet disuelto, de modo

que estas concentraciones de EDTA elevadas se prefieren menos. La disminución de la concentración de sales en 1/5 veces no funcionó. Prácticamente todo el material se encontraba en el sobrenadante del preparado 6 y el pellet era muy pequeño. La concentración estándar del preparado 1 daba los buenos resultados esperados.

5

Tabla 22:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)	pellet peso gramos
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)		
solución inicial	35	1.87	65	100%	2.17	76	100%	1.16	
sobrenadante 1 5/50/120 mM	37	<0.09							
sobrenadante 2 5/200/120	44	<0.09							
sobrenadante 3 5/500/120	70	<0.09							
sobrenadante 4 5/50/480	37	<0.09							
sobrenadante 5 5/50/667	37	<0.09							
sobrenadante 6 1/10/24	36	1.66	59	90%					
pellet disuelto 1	2.7	24.0	64	97%	22.9	61	80%	0.95	0.50
pellet disuelto 2	2.5	18.6	47	71%	18.0	45	59%	0.97	0.52
pellet disuelto 3	2.3	13.8	32	49%	11.4	26	35%	0.83	0.53
pellet disuelto 4	2.6	24.6	64	98%	25.0	65	86%	1.02	0.43
pellet disuelto 5	2.6	24.4	63	97%	25.1	65	86%	1.03	0.43
pellet disuelto 6	2.4	2.7	6	10%	2.8	7	9%	1.04	0.08

Ejemplo 12: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con diferente concentración de fosfato, calcio y redisolución del precipitado con diferentes concentraciones de EDTA.

10 Este ejemplo evaluó si el hecho de aumentar las concentraciones de fosfato y calcio con la misma relación de 1:1 aún funciona. La concentración de EDTA solamente se aumentó para garantizar que el precipitado se pudiese redissolver. Como control, se evaluaron también las concentraciones estándar (preparado 1).

15 Se prepararon seis preparados de un sobrenadante de 30 mL y se añadió solución patrón de fosfato para obtener una concentración de fosfato final tal como se muestra en la Tabla 23. Se añadieron al preparado diferentes cantidades de una solución de 1 mol/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tal como se muestran en la Tabla 23 con agitación a 37 °C en un baño de agua. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se aisló mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado aislado se redisolvió a 37 °C con un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y diferente concentración de EDTA tal como se muestra en la Tabla 23 a pH 7.2.

20

Tabla 23:

	fosfato mM/L	calcio mM/L	EDTA mM/L
preparado 1	5	50	120
preparado 2	2	2	120
preparado 3	5	5	120
preparado 4	10	10	480

ES 2 693 380 T3

preparado 5	25	25	667
preparado 6	50	50	667

Los datos en la Tabla 24 muestran que al aumentar la concentración de calcio y fosfato en 5 (preparado 5) o 10 (preparado 6) veces la concentración de fosfato estándar, el rendimiento es comparable al preparado estándar, pero el tamaño de pellet precipitado sea aumenta significativamente. El preparado 4 con dos veces la cantidad de fosfato proporciona un rendimiento ligeramente reducido, pero el pellet precipitado es de un tamaño cercano al doble del preparado estándar. Los preparados 2 y 3 acabaron teniendo prácticamente todo el VWF aún en el sobrenadante y, por lo tanto, un rendimiento muy insatisfactorio. La concentración estándar del preparado 1 daba los buenos resultados esperados.

Tabla 24:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)	pellet peso gramos
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)		
solución inicial	30	3.96	119	100%	5.58	167	100%	1.41	
sobrenadante 1 5/50/120 mM	31	<0.09							
sobrenadante 2 2/2/120	30	3.52	104	87%					
sobrenadante 3 5/5/120	30	3.04	91	77%					
sobrenadante 4 10/10/480	30	0.59	18	15%					
sobrenadante 5 25/25/667	30	<0.09							
sobrenadante 6 50/50/667	30	<0.09							
pellet disuelto 1	2.4	44.7	107	90%	57.2	137	82%	1.28	0.42
pellet disuelto 2	2.0	1.3	3	2%	1.8	4	2%	1.41	0.03
pellet disuelto 3	2.3	8.4	19	16%	9.9	23	14%	1.18	0.17
pellet disuelto 4	2.9	34.5	100	84%	43.8	127	76%	1.27	0.90
pellet disuelto 5	4.6	24.6	113	95%	29.9	138	82%	1.22	2.80
pellet disuelto 6	4.9	23.0	112	95%	28.8	141	84%	1.25	3.18

Ejemplo 13: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante de cultivo celular con concentración de fosfato baja fija, diferentes concentraciones con calcio y redisolución del precipitado con EDTA 120 mM.

Este ejemplo evaluó si el hecho de aumentar las concentraciones de calcio por concentración de fosfato constante baja puede funcionar. Como control, se evaluaron también la concentración estándar (preparado 1).

Se prepararon seis preparados de un sobrenadante de 30 mL y se añadió solución patrón de fosfato para obtener una concentración de fosfato final de 2 mM/L. Se añadieron diferentes cantidades de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O tal como se muestra en la Tabla 25 al preparado con agitación a 37 °C en un baño de agua. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se aisló mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado aislado se redisolvió a 37 °C con un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EDTA 120 mM/L tal como se muestra en la Tabla 25 a pH 7.2.

Tabla 25:

	fosfato mM/L	calcio mM/L	EDTA mM/L
preparado 1	5	50	120
preparado 2	2	2	120
preparado 3	2	4	120
preparado 4	2	8	120
preparado 5	2	16	120
preparado 6	2	32	120

5 Los datos en la Tabla 26 muestran que el hecho de aumentar la concentración de calcio doblando la concentración de calcio cada experimento consecutivo puede dar como resultado un rendimiento bueno comparable con el preparado estándar (preparado 6, 32 mM/L de calcio) incluso con una concentración de fosfato baja que no funcione con una relación 1:1 respecto a la concentración de calcio (como en el Ejemplo 12 también). Una concentración de calcio baja, inferior a 16 mM/L como en el preparado 2, 3 y 4 que contiene prácticamente todo el VWF en el sobrenadante y el tamaño de pellet es muy pequeño. El preparado 5 con una concentración de 16 mM/L de calcio proporciona un rendimiento aceptable que es mucho más bajo que el preparado estándar. La concentración

10 estándar del preparado 1 daba los buenos resultados esperados.

Tabla 26:

descripción	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)	pellet peso gramos
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)		
solución inicial	30	3.87	116	100%	5.61	168	100%	1.45	
sobrenadante 1 5/50//120 mM	32	<0.09							
sobrenadante 2 2/2/120	31	3.70	115	99%					
sobrenadante 3 2/4/120	30	3.60	108	93%					
sobrenadante 4 2/8/120	30	3.03	91	78%					
sobrenadante 5 2/16/120	31	1.51	47	40%					
sobrenadante 6 2/32/120	31	0.22	7	6%					
pellet disuelto 1	2.4	45.50	109	94%	58.8	141	84%	1.29	0.46
pellet disuelto 2	2.1	1.10	2	2%	1.7	3	2%	1.52	0.03
pellet disuelto 3	2.1	3.14	7	6%	4.4	9	5%	1.39	0.04
pellet disuelto 4	2.1	10.70	22	19%	15.6	33	19%	1.46	0.11
pellet disuelto 5	2.2	30.75	68	58%	42.4	93	55%	1.38	0.17
pellet disuelto 6	2.2	50.05	110	95%	64.7	142	85%	1.29	0.19

Ejemplo 14: Precipitación de rVWF-FP a partir de sobrenadante a una escala mayor

15 Se produjo una proteína de fusión de albúmina y factor de von Willebrand recombinante en un medio de CD-CHO sintético que contenía fosfato con células CHO tal como se describe en el documento WO 2009/156137. Se estimó que la concentración de fosfato era de aproximadamente 4 mM/L.

20 Se añadieron 440 mL de una solución de 1 mol/L de $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ a 10 500 mL de sobrenadante exento de células

con agitación a una temperatura de 25 °C – 30 °C en un baño de agua. Por consiguiente, la concentración de calcio final fue de aproximadamente 40 mM/L. La adición tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg.

5 El precipitado separado se redisolvió a 37 °C en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L + EDTA 100 mM/L. La solución resultante de 800 mL se diluyó con una solución de HEPES 10 mM/L + EDTA 3 mM/L para alcanzar una conductividad de 8 mS/cm para la cromatografía posterior.

10 Sorprendentemente, los resultados en la Tabla 27 muestran que los rendimientos de esa purificación son muy elevados con un 96% tanto en antígeno como en actividad y mantiene la relación VWF:RCo/VWF:Ag durante la precipitación. La rVWF-FP final tiene aún muy buena calidad.

Tabla 27:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	
solución inicial	10500	2.5	26250	100%	2.75	28875	100%	1.10
pellet disuelto, diluido	2140	11.8	25252	96%	12.95	27713	96%	1.10

15 **Ejemplo 15:** Precipitación de vWF de origen natural a partir de sobrenadante a mayor escala

Se produjo factor de von Willebrand recombinante de origen natural en un medio de CD-CHO sintético que contenía fosfato con células CHO tal como se describe en el documento WO 2009/156137. Se estimó que la concentración de fosfato era de aproximadamente 4 mM/L.

20 Se añadieron 380 mL de una solución de 1 mol/L de CaCl₂*2H₂O a 9000 mL de sobrenadante exento de células con agitación a una temperatura de 25 °C – 30 °C en un baño de agua. Por consiguiente, la concentración de calcio final fue de aproximadamente 40 mM/L. La adición de calcio tuvo lugar en dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg.

25 El precipitado separado se disolvió a 37 °C en un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EDTA 120 mM/L. La solución resultante de 630 mL se diluyó con una solución de HEPES 10 mM/L + EDTA 3 mM/L para llegar a una conductividad de 8 mS/cm para la cromatografía posterior.

30 Sorprendentemente, los datos en la Tabla 28 muestran que los rendimientos de antígeno de esa purificación son muy elevados con un 98% y el rendimiento de actividad es aún elevado con un 91%. La relación de VWF:RCo/VWF:Ag disminuyó ligeramente durante la precipitación. La rVWF-WT tiene aún buena calidad.

35 El Ejemplo 15 también muestra que la invención funciona para ambas proteínas de fusión de VWF así como para el VWF de origen natural.

Tabla 28:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación RCo/Ag (IU/IU)
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	
solución inicial	9000	1.8	15840	100%	1.60	14400	100%	0.91
pellet disuelto, diluido	2000	7.7	15460	98%	6.6	13140	91%	0.85

40 **Ejemplo 16:** Precipitación de VWF procedente del plasma

Se disuelve VWF plasmático en forma de precipitado con NaCl de 300 mg en 300 mL de PBS a pH 7.2 que contiene una concentración de 10 mM/L de fosfato. El precipitado con NaCl se obtuvo mediante crioprecipitación de plasma humano. Tras disolver el crioprecipitado, se llevó a cabo un paso de adsorción a hidróxido de aluminio para eliminar eficazmente la protrombina y cualesquiera otros factores de complejos de protrombina. Tras ello, la impureza

principal, fibrinógeno, se eliminó mediante precipitación con glicina. El sobrenadante resultante se precipita con cloruro sódico y ese precipitado se utilizó para este ejemplo.

5 Se añadieron 12.5 mL de una solución de 1 mol/L de $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ a los 300 mL de solución de VWF con agitación a una temperatura de 25 °C – 30 °C en un baño de agua. Por consiguiente, la concentración de calcio final fue de aproximadamente 40 mM/L. La adición de calcio llevó aproximadamente dos minutos con mezclado seguidos de un tiempo de espera de seis minutos adicionales sin mezclado. El precipitado se separó mediante una centrifugación de 30 minutos a 3000 xg. El precipitado separado se redisolvió con 30 mL de un tampón compuesto por HEPES 20 mM/L y EDTA 80 mM/L a 37 °C.

10 Sorprendentemente, los resultados en la Tabla 29 muestran que el rendimiento de esa purificación es muy elevado con un 95% para el antígeno y un 93% para la actividad. La relación de VWF:RCo/VWF:Ag durante la precipitación disminuyó muy ligeramente. El pVWF final tiene aún la misma calidad.

15

Tabla 29:

	volumen (mL)	VWF:Ag			VWF:RCo			relación
		conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	conc. (IU/mL)	total (IU)	rendimiento (%)	RCo/Ag (IU/IU)
materia l inicial	300	4.3	1.284	100%	3.61	1.084	100%	0.84
pellet disuelto	34	35.9	1.221	95%	29.7	1.008	93%	0.83

El Ejemplo 16 muestra asimismo que la invención funciona también para un VWF plasmático que aún comprende FVIII en forma de complejo con VWF en cuanto a ambas proteínas de fusión de VWF y a VWF de origen natural.

REIVINDICACIONES

1. Un método para concentrar el Factor de von Willebrand (VWF) a partir de una solución acuosa que comprende los pasos de
 - 5 (a) precipitar el VWF proporcionando iones calcio e iones fosfato a la solución acuosa,
 - (b) separar el precipitado formado en el paso (a) de la solución acuosa,
 - (c) resolubilizar el precipitado aislado en el paso (b) por medio de una solución acuosa que comprende un agente de formación de complejos con calcio.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde
 - 10 (i) a una concentración de los iones fosfato de entre al menos 1 mM y hasta por debajo de 10 mM, la concentración de los iones calcio es de al menos 16 mM,
 - (ii) a una concentración de iones fosfato de al menos 10 mM, la concentración de los iones calcio es de al menos 10 mM.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde la concentración de los iones fosfato es como máximo 50 mM.
4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde la concentración de los iones fosfato es 5 mM y la concentración de los iones calcio se selecciona a partir de un intervalo de entre 50 mM y 60 mM que incluye los extremos de ese intervalo.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde la concentración del agente de formación de complejos con calcio es de al menos 120 mM hasta el límite de solubilidad del agente de formación de complejos con calcio.
6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto de formación de complejos con calcio es EDTA o EGTA.
7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, donde la solución acuosa utilizada en el paso (c) es un tampón.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura del paso de precipitación se selecciona de un intervalo de 21 °C a 37 °C.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación de VWF:RCo/VWF:Ag en el precipitado resolubilizado es superior a un 80% de la relación VWF:RCo/VWF:Ag en la solución de partida acuosa en el paso (a).
- 30 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el rendimiento de VWF:RCo en el precipitado resolubilizado es de al menos un 75%.