



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 224 245**

51 Int. Cl.:
C07K 14/755 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 96 Número de solicitud europea: **97922744 .4**
96 Fecha de presentación : **09.04.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0906340**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.1999**

54 Título: **Purificación del complejo factor VIII mediante cromatografía de inmunoafinidad.**

30 Prioridad: **12.04.1996 AT 667/96**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.03.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.03.2009**

73 Titular/es: **Baxter Aktiengesellschaft**
Industriestrasse 67
1221 Wien, AT

72 Inventor/es: **Schönhofer, Wolfgang;**
Eibl, Johann;
Weber, Alfred y
Linnau, Yendra

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 224 245 T5

DESCRIPCIÓN

Purificación del complejo factor VIII mediante cromatografía de inmunoafinidad.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un complejo altamente purificado formado por los componentes factor VIII (factor VIII: C o FVIII) y factor von Willebrand (FvW), y de una preparación farmacéutica estable que contiene el complejo altamente puro.

10 El factor von Willebrand es una glucoproteína multimérica que está codificada por un gen en el cromosoma 12 y circula en el plasma en concentraciones de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, libremente y como complejo no covalente con el factor de coagulación VIII, proteína que está codificada por un gen en el cromosoma 10 y está ausente o falta en la hemofilia A.

Las dos funciones principales del FvW en la hemostasis son:

- 15 1. La adhesión de los trombocitos al endotelio lesionado, para lo cual el FvW se liga al subendotelio herido y hace posible la formación de un puente entre esta superficie y las plaquetas, así como una agregación de estas últimas entre sí. La primera interacción entre los trombocitos y el subendotelio se realiza mediante la glucoproteína Ib de la membrana de los trombocitos y las fibras de colágeno del endotelio lesionado. El FvW se liga a estas dos proteínas y hace de mediador para la formación de una primera capa de trombocitos, interviniendo en la posterior reticulación de las plaquetas entre sí mediante el enlace al complejo glucoproteína IIb/IIIa. Los responsables de estas tareas en la hemostasis primaria son principalmente multímeros de gran tamaño (Eller; Lab. Med. (1994); 18: 168-176).
- 20 2. Debido a su sitio de unión para FVIII, el FvW influye también en la coagulación plasmática. El FVIII se halla en el plasma casi exclusivamente en forma de complejo no covalente con FvW, llevando aproximadamente una de cada diez moléculas de FvW una molécula de FVIII. Como portadores actúan sobre todo dímeros y multímeros de pequeño tamaño. Gracias a este complejo con FvW, el FVIII está protegido contra una inactivación proteolítica intensificada (por ejemplo por una proteína C activada).

30 Además, el complejo potencia el FVIII en lo que se refiere a su actividad como cofactor en la coagulación intrínseca (Eller; Lab. Med. (1994); 18: 168-176).

35 El FvW se forma en las células del endotelio vascular, que constituyen la fuente principal de esta proteína plasmática, mediante una liberación constitutiva o estimulada, pero también se sintetiza, aunque en menor proporción, en los megacariocitos (PNAS 92 (1995), 2428-2432).

40 El producto primario de la traducción se compone de 2.813 aminoácidos. Una vez dissociado el péptido señal (22 aminoácidos), se realiza la dimerización. El proceso posterior se realiza en el aparato de Golgi, donde los dímeros se polimerizan bajo disociación de los propéptidos (741 aminoácidos). El propéptido desempeña un importante papel en la posterior ligadura de los dímeros, catalizando la formación de enlaces disulfuro en el extremo aminoterminal. De este modo se generan oligómeros de distintos tamaños, que oscilan entre dímeros de 500.000 dalton y multímeros de gran tamaño de hasta 20 millones de dalton. Adicionalmente a los procesos proteolíticos, el FvW está sometido a otras modificaciones postraduccionales, incluidas la glicosilación y la sulfatación (Mancuso y col.: Hämostaseologie (1989); 9: 122-129).

45 Por tanto, la complejidad de la biosíntesis hace que existan numerosas moléculas de FvW distintas con las más diversas funciones y propiedades.

50 Como consecuencia, el factor von Willebrand puede presentar actividades de enlace muy diferentes con respecto a sus compañeros de enlace naturales. En particular, se ha comprobado que la fuerza de enlace de diversas moléculas de FvW con la glucoproteína Ib, con el colágeno, con la heparina, con el complejo de glucoproteína IIb/IIIa, con el factor VIII y con el subendotelio puede ser distinta.

55 Por tanto, esto implica que todas las preparaciones de FvW consisten en una mezcla de las citadas diversas proteínas de FvW o bien grupos de FvW y, consecuentemente, son heterogéneas en lo que se refiere a sus propiedades, tales como la fuerza de enlace esencial con respecto al factor VIII.

60 La presencia de diversas formas de FvW es también el motivo de los complejos y distintos fenotipos en la fisiopatología de la enfermedad de von Willebrand, que en ciertos casos puede atribuirse a un déficit de producción del factor de von Willebrand y en otros casos a un exceso de producción del mismo. Por ejemplo, un exceso de producción de FvW conduce a una mayor tendencia a las trombosis, mientras que un déficit en el suministro de FvW tiene como consecuencia una mayor tendencia a las hemorragias o mayor tiempo de coagulación, pero esto no puede aplicarse en ningún caso de modo general, ya que también es decisiva la forma en que se produce, en déficit o en exceso, el factor de von Willebrand.

65 Para distinguir y caracterizar las propiedades del FvW y el síndrome de FvW se emplean diversos métodos de análisis.

Así pues, para el diagnóstico es imprescindible determinar la actividad del cofactor ristocetina. Para ello se estudia la agregación plaquetaria en presencia del antibiótico ristocetina, que en los pacientes con síndrome de FvW se halla reducida o es totalmente inexistente (Macfarlane y col.: *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 1775; 34: 306-308).

Además, la actividad de formación de colágeno del FvW puede aprovecharse para la diferenciación del síndrome de FvW (Thomas y col.: *Hämostaseologie* (1994); 14: 133-139).

La constante de disociación de enlace entre el FvW y el FVIII puede determinarse según el método de Vlot y col. (*Blood* 83 (11) (1995); 3150-3157).

La estructura molecular del FvW se determina mediante el análisis de la estructura multimérica por medio de electroforesis SDS en geles de agarosa al 1,2% (Ruggeri y col.: *Blood* (1981); 57: 1140-1143).

Para determinar la cantidad total de antígeno FvW se utilizan los más diversos kits de ensayo ELISA disponibles en el mercado.

La preparación de un complejo FVIII/FvW óptimo debería tener como objetivo la obtención de un producto estable, pero sobre todo libre de proteínas acompañantes no deseadas, ya que toda carga de proteínas innecesaria implica un riesgo de efectos secundarios no deseados.

Por tanto, toda concentración de FvW no necesaria para la estabilización de FVIII constituye una carga para el hemofílico.

Hasta la fecha, en el curso de los procesos de producción de preparaciones de factor von Willebrand, especialmente a partir de pools plasmáticos, no ha sido posible excluir totalmente el riesgo de heterogeneidad de la composición debido a la presencia de distintas formas del factor von Willebrand, ni ha sido posible, en el estado actual de la técnica, obtener una preparación de FvW con propiedades uniformes, por ejemplo en lo que se refiere a su actividad de enlace con un determinado ligando.

Ya se sabía cómo depurar el complejo factor VIII mediante diversos anticuerpos monoclonales anti-FvW, tanto a partir de plasma como a partir de crioprecipitados (*Thromb. Haemostas.* 57 (1987), 102-105). También se ha ensayado la estabilidad del complejo FVIII/FvW en distintos tampones con un pH 6,5, entre los cuales se incluyen aquellos que contienen glicoles, aminoácidos, agentes caotrópicos, aminos, otras sales o disolventes orgánicos y/o detergentes. La adición de lisina a soluciones tampón junto con sustancias caotrópicas en altas concentraciones, como por ejemplo urea 3M, proporcionaba una protección del factor VIII: C/FvW:Ag contra los efectos de desnaturalización. Las actividades de los factores VIII:C y FvW R.cof. eran, tras una incubación con etilenglicol al 20% en volumen + KI 1M por ejemplo, de un 72% o un 48%, y, en caso de tratamiento con urea 3M, de un 88% o un 77%.

La actividad específica del factor VIII:C en un producto final, eluido con KI 1M + lisina 1M + imidazol 20 mM + CaCl₂ 5 mM, pH 6,5, era de 45 I.U./mg de proteína total, la del FvW de 60 I.U./mg.

También se tiene información sobre la purificación del complejo factor VIII/FvW por métodos cromatográficos a partir de crioprecipitados tras su adsorción en Al(OH)₃ y sobre la realización de una inactivación vírica utilizando anticuerpos monoclonales anti-FvW (*Biotechnol. Blood Prot.* 227 (1993), 109-114). La elución del complejo adsorbido se realizaba a un pH 6,5 bajo la adición del agente caotrópico KI (1M). La relación factor VIII:C/FvW:Ag era 0,8 y la actividad específica de factor VIII:C 38 i.u./mg.

Por último, por el documento EP-0 295 645-A2 se sabe cómo purificar el complejo factor VIII mediante cromatografía de afinidad utilizando péptidos específicos, dirigidos contra FvW, de líquidos biológicos heterogéneos. Para ello se eluyó el complejo utilizando gradientes de pH o tampones con una gran fuerza iónica (véase el ejemplo 5 del documento EP-0 295 645-A2).

En el documento EP 0 416 983 A1 se describe una preparación con el complejo factor VIII/FvW obtenida mediante cromatografía de intercambio aniónico. Según el documento WO 86/01718 A1 se obtuvo una preparación de complejo factor VIII/FvW mediante cromatografía en un anticuerpo monoclonal.

En el documento JP 01/144991 A se describe la purificación del factor VIII:C o de un complejo factor VIII:C/FvW mediante la adsorción en un portador con un anticuerpo monoclonal, para lo cual el factor VIII:C o el complejo factor VIII:C/FvW se liga con una baja concentración de iones metálicos y se eluye con una alta concentración de iones metálicos.

Todos estos complejos factor VIII/FvW del estado actual de la técnica tienen en común el hecho de que, a pesar de una alta concentración y depuración de los preparados, no han sido capaces de proporcionar un preparado homogéneo en lo que se refiere al FvW, en lo que respecta a su enlace en relación con el factor VIII:C, y por lo tanto no existía ningún complejo factor VIII/FvW nativo con una alta actividad específica.

ES 2 224 245 T5

Por consiguiente, la presente invención se plantea el problema de poner a disposición una preparación de factor VIII/FvW que contenga un complejo factor VIII/FvW y que, en lo que se refiere a las propiedades de enlace del FvW con respecto al factor VIII, presente una estructura uniforme y gracias a ello sea particularmente compatible o estable.

Según la invención, este problema se resuelve mediante el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1-10 para la producción de una preparación que contiene un complejo altamente purificado, formado por los componentes factor VIII y factor von Willebrand, con una actividad específica de como mínimo 70, y preferentemente entre 100 y 300, U de factor VIII:C/mg, que puede obtenerse purificando un material de partida que contiene los factores VIII:C y FvW mediante cromatografía de afinidad, eluyéndose de modo fraccionado el complejo factor VIII:C y FvW, así como el factor VIII:C o el FvW no en complejo. En este proceso, el factor VIII:C o el factor von Willebrand en no complejo, o sea excedente, se separa mediante cromatografía de inmuoafinidad, especialmente mediante elución fraccionada, lo que permite obtener el factor en forma de complejo y de no complejo en fracciones separadas.

Mediante la etapa de separación según la invención del factor VIII:C o del factor von Willebrand no complejo, se separan de forma selectiva especialmente moléculas de factor von Willebrand con afinidad mermada con respecto al factor VIII y, por primera vez, se obtiene un complejo factor VIII/FvW nativo y homogéneo que contiene una fracción de FvW definida en lo que se refiere a su afinidad con respecto al factor VIII.

Sorprendentemente, el complejo obtenido según la invención es estable en cromatografía de inmuoafinidad en un medio caotrópico. Ni siquiera en un medio con una conductividad de hasta 30 mS, preferentemente de hasta 40 mS, puede detectarse disociación alguna del complejo. Así pues, el complejo estable factor VIII y FvW puede eluirse y obtenerse de la columna anti-FvW incluso con una fuerza iónica relativamente alta correspondiente a una solución doble o triplemente isotónica.

En el complejo obtenido según la invención, el FvW presenta preferentemente una actividad de enlace de colágeno en un rango de 0,2 a 0,6, en relación con el antígeno de FvW (unidad de plasma/unidad de plasma).

El complejo obtenido según la invención puede obtenerse preferentemente mediante la purificación de un material de partida que contenga los dos componentes, eluyéndose de forma fraccionada el complejo y el factor VIII:C o FvW del portador de inmuoafinidad.

Los eluyentes pueden contener también concentraciones relativamente altas de agentes caotrópicos o sales de acción caotrópica, ya que la cromatografía de inmuoafinidad se realiza preferentemente en anticuerpos que conservan su afinidad o avidez con relación al factor VIII o al FvW incluso en condiciones estrictas y el complejo factor VIII/FvW obtenido permanece estable también bajo dichas condiciones.

Por ejemplo, se eligen anticuerpos que ligen el antígeno sin perjudicar las propiedades de enlace hasta una concentración de NaSCN 1M o clorhidrato de guanidina 0,5M, o incluso de sulfato amónico saturado al 100%. En cada caso un 50% del antígeno se liga hasta una concentración de NaSCN 1,5M ó de clorhidrato de guanidina 0,75M, de etilenglicol al 80% o de urea 0,75M. Los anticuerpos utilizados para la cromatografía de inmuoafinidad son preferentemente anticuerpos fuertes que, en un ensayo de enlace, se ligan al antígeno inmovilizado también en diluciones diluidas a un máximo de 30 ng/ml, preferentemente un máximo de 15 ng/ml, lo que corresponde a una relación anticuerpo/antígeno de 1:5 a 1:20.

Debido a las excelentes propiedades del complejo obtenido según la invención en lo que se refiere a su homogeneidad, especialmente en lo que respecta a las propiedades de enlace factor VIII del FvW obtenido, dicho complejo es especialmente adecuado para la obtención de preparaciones farmacéuticas para la administración de factor VIII y/o FvW. Se ha comprobado que es posible obtener este complejo en una concentración como mínimo 5.000 veces mayor, preferentemente entre 7.100 y 21.400 veces mayor, que en el plasma. Por lo tanto, una forma de realización especial de la presente invención es la producción de una preparación farmacéutica estable que contiene el complejo altamente purificado en una concentración como mínimo 5.000 veces mayor, preferentemente entre 7.100 y 21.400 veces mayor, que en el plasma, en la que el complejo presenta una gran fuerza de enlace de complejo y está esencialmente libre de FvW o factor VIII:C no complejo. De este modo se garantiza que no se perjudica al paciente debido a FvW excedente y a otras proteínas, conservándose la actividad fisiológica del complejo factor VIII/FvW. Así pues, el preparado obtenido según la invención se distingue por su extraordinaria aceptación fisiológica.

La ausencia de FvW y/o factor VIII:C no complejo significa que la preparación farmacéutica presenta menos de un 5%, preferentemente menos de un 1%, de FvW o factor VIII:C libre, con respecto al contenido total de proteína. Se prefieren especialmente las preparaciones en las que no es posible detectar FvW:Ag o factor VIII:C no complejo.

La detección de FvW o factor VIII no complejo se realiza mediante recromatografía del complejo obtenido según la invención en material de inmuoafinidad, para lo cual se carga dicho material con una determinada cantidad de FvW o factor VIII libre, se adsorbe de nuevo el complejo y se eluye en la forma arriba indicada. El material obtenido tras la recromatografía contiene la misma relación factor VIII:C y FvW:Ag que el material de partida y, por lo tanto, no presenta pérdidas relativas. Otro ensayo para la detección de factor VIII y FvW no ligado en complejo es el enlace del complejo a anticuerpos de factor VIII:C o anticuerpos de FvW inmovilizados, no pudiendo detectarse tras la adsorción ninguna proporción esencial, es decir menos de un 5%, de FvW o factor VIII:C no enlazado en el residuo.

La preparación farmacéutica obtenida según la invención se distingue por una gran fiabilidad en lo que se refiere a su espectro de acción, siendo el riesgo de descomposición o activación de factor VIII debido a la pequeña proporción de factor VIII:C libre o factor VIII:C fácilmente dissociable considerablemente menor con relación a las preparaciones de complejo de factor VIII:C/FvW ya conocidas.

Se sobrentiende que la preparación farmacéutica que contiene el complejo obtenido según la invención puede presentar principios activos, sustancias tampón, sustancias auxiliares o aditivos farmacéuticos adecuados, utilizados para preparados factor VIII/FvW. Sin embargo, gracias a la excelente estabilidad del complejo factor VIII/FvW, éste permite también elaborar un preparado farmacéutico estable sin necesidad de utilizar adicionalmente los estabilizantes usuales, tales como albúmina, azúcares, especialmente trealosa o sacarosa.

El preparado farmacéutico obtenido según la invención también es lo suficientemente estable en una solución con pH neutro como para poder proporcionarse en forma de preparado líquido o de preparado líquido congelado. Tras la reconstitución del preparado liofilizado correspondiente se observa también una composición del complejo prácticamente invariable.

El técnico en la materia puede determinar también fácilmente la dosis a administrar o las concentraciones del complejo en el preparado de acuerdo con los regímenes de administración conocidos en el estado actual de la técnica para los preparados de factor VIII/FvW.

El factor VIII y/o FvW puede estar contenido en el preparado obtenido según la invención en forma de proteína nativa o de un derivado, por ejemplo en forma de proteína mutada mediante delección, sustitución o inserción o en forma de derivado químico o como fragmento, en tanto se mantenga la gran afinidad de enlace del factor VIII con respecto al FvW en el complejo.

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para la purificación por cromatografía de inmunoafinidad de un material de partida que contiene factor VIII:C y FvW, caracterizado por las siguientes etapas:

- puesta en contacto del material de partida con un material de cromatografía de inmunoafinidad,
- elución del complejo factor VIII/FvW con un tampón de elución y
- posterior elución de factor VIII:C o FvW en no complejo con otro tampón de elución que presenta una concentración o conductividad elevada con relación al tampón de elución anterior.

Mediante la elución fraccionada selectiva de los factores en forma de no complejos del complejo se ha logrado obtener por vez primera una preparación de factor von Willebrand, o un complejo de factor VIII/FvW, uniforme en lo que se refiere a una determinada fuerza de enlace.

Para la cromatografía de inmunoafinidad se emplean preferentemente anticuerpos dirigidos contra el FvW. De este modo es posible ajustar aun más el procedimiento de purificación, cuyo objetivo esencial es el fraccionamiento de distintas moléculas o unidades de FvW, a la distinta naturaleza de la molécula de von Willebrand.

De acuerdo con una forma de realización especial del procedimiento según la invención, se utilizan como anticuerpos anticuerpos monoclonales. Éstos son preferibles a un antisuero policlonal en lo que respecta a su homogeneidad.

Un tampón de elución preferente para el complejo obtenido según la invención en la cromatografía de afinidad es aquel que contiene un tiocianato y/o una sal de amonio, preferentemente en una concentración no superior a 2M, y en la mayoría de los casos preferentemente entre 0,05M y 1,5M. Este primer tampón de elución contiene preferentemente etilenglicol, glicerina o un polialquilenglicol.

El factor VIII:C o el FvW en no complejos se eluyen preferentemente con un tampón que contiene un agente caotrópico, especialmente tiocianato, y/o sal de amonio, y/o sales alcalinas y/o etilenglicol, glicerina o un polialquilenglicol y se obtienen también en forma de preparaciones homogéneas. El tampón presenta una concentración o conductividad elevada en relación con el primer tampón de elución, especialmente una concentración o conductividad más de un 20% mayor, preferentemente más de un 50% a un 100% mayor.

Con el procedimiento según la invención también se obtiene una preparación de von Willebrand que presenta una capacidad de enlace o de formación de complejo reducida con respecto al factor VIII:C.

El complejo altamente purificado, pero también las preparaciones de factor VIII:C o FvW no complejo, pueden, en caso dado, purificarse en mayor medida mediante etapas cromatográficas adicionales, preferentemente mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, especialmente en heparina inmovilizada, o cromatografía de iones metálicos quelantes, y elaborarse de forma ya conocida y adecuada para obtener preparados farmacéuticos o de diagnóstico.

ES 2 224 245 T5

Para la obtención de preparados farmacéuticos es necesario, por regla general, prever un tratamiento para la inactivación o desenriquecimiento de virus, preferentemente un tratamiento térmico y/o un tratamiento físico o químico. En los documentos EP-0 159 311, EP-0 519 901 y WO 94/13329 se describen procedimientos de tratamiento adecuados. Dado que el complejo presenta una gran estabilidad, dicho tratamiento de inactivación vírica se realiza preferentemente en el complejo altamente purificado.

Según una forma de realización preferente del procedimiento según la invención, el material de partida se selecciona del grupo compuesto por plasma, fracciones plasmáticas, por ejemplo crioprecipitados o precipitados alcohólicos, residuos de cultivos celulares o preparados farmacéuticos.

La invención se explica más detalladamente en base a los ejemplos siguientes, a los que sin embargo no está limitada.

Ejemplo 1

(Actualmente, según la opinión del solicitante, el mejor modo de realizar la invención reivindicada)

Se disuelven 500 gr de crioprecipitado en una disolución tampón 1 + 4 a 30°C. Después se clarifica la solución a través de un filtro de 0,45 μm (por ejemplo Millipore Durapore). Una columna llena con 0,5 l de gel anti-FvW (firma IMMUNOTECH, Francia) se prepara con aprox. 10 volúmenes de columna (= VC) de equitampón y a continuación se aplica la solución de crioprecipitado clarificada a 0,5 cm/min. Después se eliminan las impurezas no deseadas mediante lavado con 5 a 10 VC de equitampón (eventualmente con una concentración elevada de NaCl > 250 mM), a una velocidad de flujo de 1 cm/min. Acto seguido se eluye el complejo factor VIII/FvW con el tampón de elución 1 en una relación aproximada 1:1. La elución con el tampón de elución 2 proporciona FvW casi completamente libre de factor VIII. La segunda etapa de elución sirve al mismo tiempo para limpiar la columna, con lo que es posible equilibrarla de nuevo inmediatamente después.

30	Disolución tampón:	Tris 7,5 mM	
		NaCl 60 mM	
		Lisina 100 mM	
		Acetato de Na 100 mM	pH 6,8
		25 U/ml de heparina	
45	Equitampón:	Tris 10 mM	
		NaCl 100 mM	
		Lisina 100 mM	
		CaCl ₂ 3,25 mM	pH 6,8
60	Tampón de elución 1:	Tris 10 mM	
		Glicina 100 mM	
		NaCl 250 mM	
		AMS 300 mM	
		CaCl ₂ 3 mM	
65		Etilenglicol al 40%	pH 6,5

ES 2 224 245 T5

Tampón de elución 2:

Tris 10 mM

Glicina 100 mM

NaCl 1,25 M

NaSCN 1,25 M

CaCl₂ 3 mM

Etilenglicol al 40%

pH 7,0

Resultados

Ensayo	U/ml FVIII:C	% Rend. FVIII:C	U/mg FVIII:C	U/ml FvW	% Rend. FvW	U/mg FvW	FVIII:C Resp. a FvW	Colág. B ó FvW
Inicio	11,0	100,0%	0,4	16,3	100,0%	0,6	1 : 1,48	0,7
FVIII/FvW	12,7	50,9%	133,7	14,7	39,8%		1 : 1,16	0,3
FvW	0,2	0,5%		23,4	37,2%	236,4		0,7

Ejemplo 2

Se descongela 1 l de plasma congelado a una T>25°C y después se diluye 1 + 2 con equitampón. La solución se clarifica a través de un filtro de 0,45 µm. Una columna llena con 50 ml de gel anti-FvW (firma IMMUNOTECH) se prepara con aprox. 5 VC de equitampón y a continuación se aplica la solución de plasma clarificada con un flujo de 1 cm/min. Las impurezas no deseadas se eliminan mediante lavado con 10 a 20 VC de equitampón + NaCl 250 mM. La primera elución proporciona complejo factor VIII/FvW; la segunda elución FvW libre de actividad de factor VIII. Inmediatamente después puede equilibrarse la columna de nuevo.

Equitampón:

5 gr/l de citrato de Na

2 U/ml de heparina

pH 7,0

Tampón de elución 1:

5 gr/l de citrato de Na

30 gr/l de AMS

20 gr/l de NaSCN

75 gr/l de histidina

5 gr/l de NaCl

0,4 gr/l de CaCl₂

pH 7,0

ES 2 224 245 T5

Tampón de elución 2:

5 gr/l de citrato de Na

50 gr/l de AMS

50 gr/l de NaSCN

75 gr/l de histidina

25 gr/l de NaCl

0,4 gr/l de CaCl₂

pH 7,0

15 Resultados

Ensayo	U/ml FVIII:C	% Rend. FVIII:C	U/mg FVIII	U/ml FvW	% Rend. FvW	U/mg FvW	FVIII:C resp. a FvW	Colág. B ó FvW
Inicio	0,3	100,0%	0,01	0,3	100,0%	0,01	1 : 1	1,0
FVIII/FvW	2,4	33,3%	42,86	1,8	24,3%		1 : 0,75	0,5
FvW	0,0	0,2%		4,5	76,0%	112,50		0,8

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación por cromatografía de inmunoafinidad de un material de partida que contiene factor VIII:C y factor von Willebrand (FvW), **caracterizado** por las siguientes etapas:
 - puesta en contacto del material de partida con un material de cromatografía de inmunoafinidad,
 - elución del complejo factor VIII/FvW con un tampón de elución y
 - posterior elución de factor VIII:C o FvW no complejo con otro tampón de elución que presenta una concentración o conductividad elevada con relación al tampón de elución anterior.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la cromatografía de inmunoafinidad se emplean anticuerpos dirigidos contra el FvW.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque como anticuerpos se emplean anticuerpos monoclonales.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se emplean anticuerpos de alta afinidad con respecto al FvW, que pueden ligar el FvW también en un medio con tiocianato 1M.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el complejo altamente purificado se eluye con un tampón que contiene un tiocianato y/o una sal de amonio, preferentemente en una concentración máxima de 2M, especialmente entre 0,05M - 1,5M.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el complejo altamente purificado se eluye con un tampón que contiene etilenglicol, glicerina o un polialquilenglicol.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se eluye y obtiene factor VIII:C o FvW con un tampón que contiene un agente caotrópico, especialmente tiocianato y/o sal de amonio, y/o sales alcalinas y/o glicoles, como etilenglicol, glicerina o un polialquilenglicol, presentando el tampón una concentración o conductividad elevada con relación al tampón de la reivindicación 5 ó 6.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el complejo altamente purificado se purifica mediante etapas cromatográficas adicionales, preferentemente cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad o cromatografía de iones metálicos quelantes.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se prevé una etapa de tratamiento para la inactivación o el disenriquecimiento viral, preferentemente un tratamiento térmico, que preferentemente se realiza en el complejo altamente purificado.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque como material de partida se utiliza un miembro del grupo compuesto por plasma, una fracción plasmática, un residuo de cultivo celular y un preparado farmacéutico.