



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação: PT 93128 B*

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 5)*

C07K001/36 A	A61K002/04 B
C07K014/47 B	A61K038/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1990.02.13

(30) *Prioridade:* 1989.02.14 DE 3904354

(43) *Data de publicação do pedido:*

1990.08.31

(45) *Data e BPI da concessão:*

09/95 1995.09.08

(73) *Titular(es):*

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT
- D-3550 MARBURG/LAHN DE

(72) *Inventor(es):*

NORBERT HEIMBURGER DE
KLAUS WELLNER DE
GERHARDT KUMPE DE

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE FACTOR DE VON WILLEBRAND
PURIFICADO E PASTEURIZADO

(57) *Resumo:*

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRIPTIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 93 128

NOME: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

EPÍGRAFE: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM CONCENTRADO
DE FACTOR DE VON WILLEBRAND PURIFICADO E PAS-
TEURIZADO

INVENTORES: Pros. Dr. NORBERT HEIMBURGER GERHARD KUMPE
E KALUS WELLNER, RESIDENTES NA ALEMANHA
OCIDENTAL

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo
4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883.
ALEMANHA OCIDENTAL, EM 14 DE FEVEREIRO DE 1989 SOB O
Nº. P 39 04 354.1.

Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental, (inventores: Prof. Dr. Norbert Heimburger Gerhard Kumpe e Klaus Wellner, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE FACTOR DE VON WILLEBRAND PURIFICADO E PASTEURIZADO"

DESCRIÇÃO

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um concentrado de factor de von Willebrand purificado e pasteurizado, bem como a um tal concentrado preparado de acordo com este processo, que é adequado para o tratamento do sindroma de von Willebrand.

Este estado clínico caracteriza-se por uma deficiência congénita e/ou uma falta da proteína de von Willbrand.

É necessário um concentrado de factor de von Willebrand puro e isento de virus, pois que se utilizam para o tratamento da hemofilia A concentrados de factor VIII: C cada vez mais purificados, que só contem vestígios de factor de von Willebrand.

Uma vez que os doentes do sindroma de von Willebrand têm de ser tratados durante toda a vida e por vezes

com doses elevadas, é necessário uma elevada pureza e segurança do preparado. Têm vantagem as preparações pobres em fibrinogénio, imunoglobulinas e isoaglutininas.

O factor de von Willebrand circula no plasma numa concentração de 5-10 mg/l e na forma de um complexo não ligado covalentemente com o factor VIII, a chamada globulina anti-hemofílica. No co-precipitado o factor de von Willebrand encontra-se, como complexo de factor de von Willebrand/factor VIII, muito enriquecido e pode por isso isolar-se a partir do plasma ou de fração do plasma, por meio de métodos de fraccionamento conhecidos.

No registo de patente alemão 3 504 385 (USP 4,578,218) conhece-se um processo para o tratamento do complexo de factor VIII, em que se liga uma preparação de factor VIII a uma matriz insolúvel, que contém grupos sulfato livres, por exemplo sulfato de dextran, não sendo contudo claramente possível uma separação do complexo de factor VIII em factor VIII: C e factor de von Willebrand.

No GB 2 079 292 descreve-se um processo para a preparação de um factor de von Willebrand a partir do coprecipitado, que contudo também não separa o factor VIII: C do factor de von Willebrand.

No EP 0 022 052 (USP 4,210,580) descreve-se um processo, em que se trata no plasma com heparina de sódio, precipitando fibronectina juntamente com o factor de von Willebrand. A partir da canuda sobrenadante recupera-se o factor anti-hemofílico. Cromatografa-se o precipitado em celulose DEAE e isola-se a fibronectina. Refere-se que, quando se utiliza para a cromatografia gel de agarose, o factor de von Willebrand elui-se no "void volume" (volume morto). A heparina é contudo dispendiosa nas quantidades utilizadas e uma filtração de gel é um passo limitante para uma produção em escala in-

dustrial. Além disso trabalha-se com KSCN que é tóxico.

No registo de patente europeu 0 083 483 refere-se que, no estado da técnica, se descreve um processo, no J. Lab. Clin. Med 93,40 (1879), para a separação do factor VIII: C e do factor de von Willebrand, separação essa efectuada por imunoadsorpção. Nesse processo, contudo, apenas se obtém o factor VIII: C com uma pureza razoável.

Um outro processo para a separação destes dois factores encontra-se descrito no Brit. J. Hematol. 43,669(1979), no qual se utiliza aminohexil-agarose. Também este processo é inadequado para a obtenção do factor de von Willbrand.

Na própria EP 0 083 483 descreve-se um processo para a preparação do factor VIII: C, que apenas contém pequenas quantidades do factor de von Willebrand. Não se refere aí, contudo, qualquer processo para o isolamento do factor de von Willebrand.

Todos estes processos têm uma característica comum que é a de não conduzirem a uma dissociação completa do complexo com o isolamento consequente de um F VIII: C nativo e do vWF. Nenhum destes processos descreve um produto pasteurizado e por isso isento de vírus. Para proteger o vWF de uma decomposição proteolítica durante a purificação, utilizam-se nestes processos substâncias tóxicas como DFP e inibidor da tripoína de soja ou ainda tampões como KSCN ou NaN_3 . Finalmente estes processos desvantagens, uma vez que incluem passos que são limitantes para a produção em larga escala. Entre eles destacam-se, por exemplo, filtrações em gel, isto é, separações com base no peso molecular, ou passos cromatográficos utilizando um gradiante salino para a eluição.

A presente invenção descreve um processo com o qual se consegue, surpreendentemente, dissociar o comple-

xo do factor VIII: C e do factor de von Willebrand e isolar o factor de von Willebrand purificado e pasteurizado com elevado rendimento. O objectivo desta invenção é a preparação de um agente terapeutico coagulante, purificado, pasteurizado e por isso isento de virus, para o tratamento do síndroma de von Willebrand.

O objectivo da invenção é um processo para a preparação de um concentrado de factor de von Willebrand pasteurizado, caracterizado por se tratar uma solução que contém o factor de von Willebrand (vWF) como complexo com o F VIII: C num tampão de aminoácido de pH 5,5 a 6,5 e numa concentração de hidratos de carbono de 5 a 30% em peso, com um permutador aniónico, ao qual se liga o F VIII: C, e se isolar a partir da solução o concentrado de factor de von Willebrand.

Como material de partida para a preparação de um concentrado de vWF podem utilizar-se soluções nas quais o vWF se encontra presente como complexo com o F VIII: C, p. ex. plasma e fracções dele obtidas como crioprecipitados, fracção dohn I ou ainda camadas sobrenadantes e extractos de culturas celulares.

O material de partida, de preferência os crioprecipitados ou as fracções intermédias deles obtidas, pode ser pasteurizado.

O vWF pode proteger-se da inactivação térmica durante a pasteurização, pela adição de hidratos de carbono, de preferência sacarose, de preferência em concentrações de 10 a 60 % em peso, e/ou de aminoácidos, de preferência glicina, de preferência em concentrações de 0,5 a 3,0 mol/l, e/ou de sais de cálcio, de preferência em concentrações de 1 a 20 mmol/l. Por meio destas medidas pode também impedir-se ao mesmo tempo a precipitação de proteínas sensíveis ao meio ácido, por exemplo a fibronectina.

Os hidratos de carbono servem não só para proteger as proteínas da uma inactivação térmica ou de uma desnaturação, mas também como solubilizantes na zona de pH ácido de 6,5 a 5,5, e neste caso em especial para o fibrinogénio e para o vWF. impedindo surpreendentemente a sua precipitação.

Pode manter-se o vWF em solução após adsorpção do F VIII: C ao permutador iónico a pH 5,5, separar-se da solução o fibrinogénio por adição de glicina em concentrações de 0,5 a 3,0 mol/l, de preferência 2,7 mol/l e, a partir da camada sobrenadante de glicina precipitar-se o vWF com concentrações de NaCl correspondentes a 2 a 15 % em peso, de preferência 6 % em peso.

O vWF pode pasteurizar-se uma segunda vez, como produto intermediário, para aumentar a segurança viral.

O vWF pasteurizado e altamente purificado pode filtrar-se em condições estéreis e liofilizar-se, por exemplo com glicina (2 % em peso), albumina (0,5 %) em citrato (0,02 mol/l)-NaCl (0,06 mol/l) como estabilizadores.

O preparado de acordo com a invenção é mais ou menos isento de proteínas inconvenientes, ao contrário dos crioprecipitados anti-hemofílicos, do crioprecipitado bruto ou das suas criofracções, que até agora têm sido utilizados para o tratamento do síndroma de vW.

O processo de acordo com a invenção correspondem às elevadas exigências de pureza, rendimento e isenção de virus: juntamente com as proteínas indesejáveis eliminam-se também pelo processo de purificação outros virus possivelmente presentes e inactivam-se por meio de pasteurização. A actividade específica de um produto preparado de acordo com o processo descrito situa-se acima de 100 E de F VIII R: Co F/mg de proteína.

Pode proceder-se da seguinte maneira:

O crioprecipitado dissolvido, fortemente enriquecido com o factor de von Willebrand e com o factor VIII, libertado dos factores do complexo de protrombina por meio de adsorção em $Al(OH)_3$, estabiliza-se para protecção contra inactivação térmica, por meio de um método conhecido, por adição de hidratos de carbono, aminoácidos e iões cálcio, e aquece-se em solução aquosa, de preferência durante 10 horas a $60^{\circ}C$.

A solução pasteurizada pode diluir-se até ao dobro do volume com um tampão de condutividade fisiológica (12 - 15 mS) e a um pH de 5,5, com a composição de 0,2 mol/l de lisina e 0,2 mol/l de acetato de sódio, ajusta-se o pH da solução a 5,5 e aplica-se a um permutador aniónico a $20^{\circ}C$.

Nestas condições, o factor VIII liga-se a permutadores iónicos básicos com DEAE e QAE como grupos funcionais ligados a ^RSephadex, ^RSepharose, celulose ou ^RFractogel como matriz, enquanto que o vWF permanece em solução. Para este fim equilibram-se previamente estes permutadores com o seguinte tampão: 0,1 mol/l de acetato de sódio; 0,1 mol/l de lisina; 0,017 mol/l de NaCl; pH 5,5.

Uma vez que, nas condições mencionadas, o vWF permanece na camada sobrenadante juntamente com fibrinogénio e fibronectina, ocorre evidentemente a dissociação do complexo de vWF como factor VIII, nas condições mencionadas.

O permutador aniónico carregado com F VIII pode lavar-se com uma solução tampão contendo 0,1 mol/l de lisina; 0,1 mol/l de acetato de sódio; 0,017 mol/l de acetato de sódio; 0,017 mol/l de NaCl; pH 5, ou com outros tampões com uma condutividade de 12 - 15 mS. Para a eluição utilizam-se tampões com elevadas concentrações salinas, por exemplo 0,3-1 mol/l de NaCl ou de outros halogenetos alcalinos ou alcalino-terrosos.

O eluído pode, conforme o caso, tratar-se de modo a obter-se um concentrado de F VIII: C pasteurizado e altamente purificado.

A dissociação descrita e a adsorpção selectiva a pH ácido só é possível quando o fibrinogénio, que constitui a componente principal da proteína em solução, não precipita; pois é sabido que as englobulinas, às quais pertence o fibrinogénio, precipitam em solução aquosa por acidificação a pH 5 a 5,5.

Isto não é válido para o processo de acordo com a invenção, porque os hidratos de carbono que ficam em solução após a pasteurização e o cálcio e o fibrinogénio também se mantém em solução a um pH ácido.

Este passo do processo é também objectivo e matéria da presente invenção, mesmo quando a pasteurização das proteínas se efectua mais tarde.

O factor de von Willebrand, isento da actividade do factor VIII: C, continua justamente com o fibrinogénio e com a fibroneactiva na camada sobrenadante (processo "batch") ou passa pela coluna e pode em seguida separar-se, por meio de passos de fraccionamento apropriados, das proteínas em grande excesso que o acompanham, por exemplo por meio de um fraccionamento com glicina e precipitação com NaCl da camada sobrenadante do permutador aniónico.

Para este fim ajusta-se o pH da camada sobrenadante de DEAE a 7,3 e precipita-se a 37°C com 0,5-3 mol/l de glicina, de preferência com 2,7 mol/l, e separa-se o fibrinogénio precipitado.

Por meio de adição de NaCl sólido e m soluções ao sobrenadante de glicina até uma concentração final

de 2 a 25 % em peso, de preferência 6 % em peso, precipita-se selectivamente o factor de von Willebrand e separa-se, por exemplo, numa centrifuga.

O precipitado dissolvido pode purificar-se por tratamento com ^RAerosil até um grau de pureza superior. A uma determinada concentração de albumina, ajustada pela OD (densidade óptica) a 280nm, ligam-se ao Aerosil de preferência as proteínas acompanhantes do vWF, nomeadamente fibrinogénio, fibronectina e imunoglobulina; diminuindo-se também claramente as isoaglutininas indesejadas. O tratamento com aerosil pode efectuar-se tanto antes como depois da Pasteurização.

O precipitado de factor de von Willebrand assim preparado dissolver-se, juntar-se com sacarose-glicina e aquecer-se novamente durante 10 horas a 60°C para aumentar a segurança contra virus. Esta pasteurização é surpreendentemente possível praticamente sem perda de actividade. A partir da solução diluída arrefecida separa-se o fibrinogénio ainda presente por meio de uma precipitação com glicina de 0,5-3,0 mol/l, de preferência 2,2 mol/l. Através de uma precipitação subsequente, com cloreto de sódio, da camada sobrenadante, com 2 a 25 % em peso, de preferência 8 % em peso, pode isolar-se o factor de von Willebrand numa forma de elevada pureza e com um baixo teor em isoaglutinina.

Após dissolução do factor de von Willebrand num tampão de 0,02 mol/l de citrato, 0,06 mol/l de NaCl, pH 6,8, e estabilização por adição de aminoácidos e albumina, segue-se uma diálise; filtra-se então o produto em condições estéreis e, conforme o caso, liofiliza-se. O teor em vWF determinou-se através de actividade do F VIIIIR:CoF, de acordo com o método da aglutinação.

As plaquetas estabilizadas aglutinam-se na presença de F VIIIIR:CoF e do antibiótico ristocetina A.

Processo da determinação:

Misturam-se 50 μ l de reagente de von Willebrand, Behringwerke (ressuspendido em 1 ml de água destilada) e 50 μ l de plasma ou de diluição de plasma, sobre uma placa de vidro e agitam-se durante um minuto à temperatura ambiente, quer numa máquina de agitação, quer manualmente; sendo importante uma boa mistura. Após um minuto de repouso compara-se o grau de aglutinação com um controle de cloreto de sódio. Lê-se o grau de diluição que ainda é positivo em relação ao controle e multiplica-se pela sensibilidade do reagente. Obtém-se o teor de F VIIIR:CoF em percentagem.

Descreve-se em seguida, com exemplos, a preparação de um concentrado de factor de von Willebrand pasteurizado e de elevada pureza.

Exemplo 1

1. Material de partida

Dissolveu-se 1 kg de crioprecipitado bruto, por aquecimento a 30-37°C, em 3 l de um tampão que continha 0,08 mol/l de NaCl; 0,27 Mol/l de glicina; 0,13 E/l de antitrombina III e 0,66 USPE/ml de heparina. Obtiveram-se 4 l de solução com um valor de pH de 6,8-6,9 e com os componentes e concentrações seguintes:

NaCl	0,06 mol/l
Glicina	0,2 mol/l
AT III	0,1 E/ml
Heparina	0,5 E/ml.

2. Adsorpção em $Al(OH)_3$

A 1000 ml da solução do ponto 1 adicionaram-se 80 ml de uma suspensão de Al(OH)_3 a 1 % (Behringwerke, Marburg) e agitou-se durante 15 minutos, à temperatura de 28-30°C. Em seguida centrifugou-se durante 15 minutos a 3000 x g, regeitou-se o resíduo e adicionaram-se estabilizadores à fase líquida e pasteurizou-se.

3. Estabilização e pasteurização

Trataram-se 1000 ml da fase líquida do ponto 2 com os seguintes estabilizadores:

5 ml de solução de CaCl_2 , 1 mol/l (5 mmol/l)
1000 g de sacarose (500 g/kg de solução)
150 g de glicina (2 mol para 1 l de solução).

O valor de pH ajustou-se a 7,3 com NaOH_2N . O volume de solução aumentou com a adição. A partir de 1kg de crioprecipitado obtiveram-se 6,8 l de solução estabilizada que se aqueceu durante 10 horas a 60°C em banho maria.

4. Tratamento por permuta iônica

Diluiram-se 6,8 l da solução do ponto 3 com 6,8 l de um tampão que continha 0,2 mol/l de acetato de sódio, pH 5,5 e 0,2 mol/l de lisina. O valor de pH ajustou-se a 5,5 com ácido acético.

Tratou-se a solução com 300 ml de DEAE-^R Sepharose CL 6 B, que tinha sido equilibrada com um tampão de pH 5,5 que continha 0,1 mol/l de acetato de sódio, 0,1 mol/l de lisina e 1 g/l de NaCl . Agitou-se a suspensão durante 2-3 horas à temperatura ambiente e vigiou-se o decurso da adsorpção por meio de determinação contínua do F VIII. Em seguida aplicou-se a resina carregada a um filtro de Nylon e separou-se, lavou-se, eluiu-se e tratou-se o eluído para se obter um concentrado de F VIII:C.

Isolamento do facto de von Willebrand a partir da camada sobrenadante de DEAE

5. Precipitação com glicina 2,7 M

Para a precipitação ajustou-se o pH da fase líquida de DEAE a 6,8 com NaOH 2 M, aqueceu-se a 37°C, e por adição de 2,1 mol/l de glicina cristalina (157,5 g) levou-se a uma concentração final de 2,7 mol/l, já que o líquido de DEAE continha já 0,6 mol/l de glicina vindo da solução pasteurizada. Doseia-se a glicina durante 30 minutos, lentamente, sob agitação. Precipita então o fibrinogénio e remove-se. A mistura de precipitação arrefece até 20-25°C. Separou-se o precipitado de fibrinogénio por meio de centrifugação a 3000 - 5000 x g.

6. Precipitação com NaCl a 6 %

Precipitou-se o factor de von Willabrand por meio de adição de NaCl cristalino à fase líquida contendo glicina 2,7 molar (60 g/l). A precipitou-se efectuou-se à temperatura ambiente, adicionando-se o NaCl durante 30 minutos e agitando-se depois durante mais 30 minutos. Separou-se o precipitado fino numa centrífuga contínua a 15000 x g a 10°C e um caudal de 40 l/hora.

7. Dissolução do resíduo da precipitação com NaCl a 6 %, estabilização e pasteurização

O resíduo da precipitação com NaCl a 6 % dissolveu-se em 60 ml de água destilada. Obtiveram-se 82,5 ml de uma solução com uma densidade óptica de 40 a 280 nm. No caso de uma densidade óptica maior do que 50 dilui-se a este valor.

Para a estabilização adicionaram-se a 82,5 ml de solução 82,5 g de sacarose (1 g/ml) e 12,3 g de glicina (2 mol/l). O volume da solução estabilizada era de

140 ml, o pH ajustou-se a 6,8 com NaOH 2 M e aqueceu-se a solução estabilizada durante 10 horas a 60°C.

8. Isolamento do factor de von Willebrand pasteurizado a partir da solução de estabilizador

Diluição:

Após arrefecimento a 40°C diluiu-se a solução pasteurizada, na proporção de 1:3, com 280 ml de um tampão que continha 0,03 mol/l de NaCl e 0,02 mol/l de tri-citato de sódio. A densidade óptica da solução, a 280 nm, era de 8,82 após diluição.

Pré-precipitação com glicina (2,2 mol/l)

Misturaram-se 420 ml da solução pasteurizada e diluída, que já continha 0,4 mol/l de glicina, com 56,7 g de glicina (1,8 mol/l), a 35°C. A solução arrefeceu durante a precipitação (30 minutos) e durante o tempo de agitação que se seguiu (30 minutos) até à temperatura de 25°C.

Centrifugou-se o precipitado a 3000 g e rejeitou-se

Precipitação com NaCl a 8 %

Misturou-se a camada sobrenadante de glicina 2,2 molar (420 ml) com 0,38 volumes de um agente de precipitação (159,6 ml) que continha 1,8 mol de glicina e 300 g de NaCl por litro. A temperatura quando da precipitação foi de 20°C, sendo o tempo total de precipitação e agitação de 1 hora. O resíduo de NaCl a 8 %, que continha o factor de von Willebrand HS, centrifugou-se a 5000 g.

Dissolução do resíduo de NaCl a 8 %, diálise e ultracentrifugação:

Dissolveu-se o resíduo de NaCl a 8 % em 33 ml de um tampão de pH 6,9 com a seguinte composição:

Tampão de dissolução: 0,06 mol/l de NaCl

0,02 mol/l de tri-citrato de sódio

2 % de glicina

0,5 % de albumina humana.

Dialisou-se a solução durante 2 x 1,5 horas, a 20°C, contra 1,2 l de um tampão de diálise, sob agitação:

Tampão de diálise: 0,06 mol/l de NaCl

0,02 mol/l de tri-citrato de sódio

2 % de glicina

(pH 6,8-6,9).

O dialisado (69 ml) levou-se a uma concentração final de 0,5 % com albumina humana e centrifugou-se durante 60 minutos a 20°C e 15 000 g, até se obter uma solução límpida.

Para a filtração estéril ajustou-se o volume da solução ultracentrifugada a 110 ml com tampão de dissolução.

Filtração estéril, ajuste de concentração, enchimento e liofilização:

Filtrou-se em condições estériles a solução ultracentrifugada do concentrado de factor de von Willebrand HS (110 ml), após aquecimento a 30-35°C, através de uma placa filtrante de tamanho de poros 0,45 nm e 0,2 nm. A solução continha 160 E/ml de actividade de F VIII R: CoF.

Exemplo 2

De acordo com o exemplo 1, ponto 6, preparou-se um precipitado com NaCl a 6% e purificou-se o factor de von Willebrand por tratamento com Aerosil. Para tal, dissolveu-se primeiro o precipitado em 60 ml de água destilada, mediu-se a densidade óptica (OD) a 280 nm e diluiu-se depois a solução até ao volume de 200 ml com uma OD de 10. A esta solução adicionou-se Aerosil 200 húmido (em relação à substância seca 5 mg/ml) e agitou-se a suspensão durante 30 minutos a 20°C; centrifugou-se então o Aerosil carregado com as proteínas acompanhantes do factor de von Willebrand e tratou-se a camada sobrenadante, como descrito no exemplo 1, até à obtenção do produto final. Este tinha, com rendimento bom e inalterado, uma actividade específica superior por um factor de 2 a 4.

R E I V I N D C A Ç Õ E S

- 1a -

Processo para a preparação de um concentrado de factor de von Willebrand pasteurizado, caracterizado por se tratar uma solução contendo o factor de von Willebrand (vWF) como complexo com o F VIII:C num tampão contendo aminoácidos a pH 5,5 a 6,5 e a uma concentração de hidratos de carbono de 5 a 30 % peso/peso, num permutador aniónico, ao qual se liga o F VIII:C, e se recuperar a partir da solução o concentrado de factor de von Willebrand.

- 2a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se utilizar como solução contendo o factor de von Willebrand como complexo com o F VIII:C, plasma ou uma

fracção a partir dele obtida, de preferência um coprecipitado ou fracção de Conh I, ou uma camada sobrenadante ou um extrato de uma cultura celulas.

- 3a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se pasteurizar a solução que contém o factor de von Willebrand.

- 4a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se pasteurizar a solução do factor de von Willebrand e por se evitar uma inactivação térmica durante a pasteurização através da adição de sacarose, de preferência numa concentração de 10 a 60 % peso/volumen, de glicina, de preferência numa concentração de 0,5 a 3,0 mol/l e de um sal de cálcio, de preferência numa concentração de 1 a 20 mol/l, impedindo-se ao mesmo tempo pela adição destas substâncias a precipitação de proteínas sensíveis ao meio ácido, em especial do fibrogénio e da fibronectina.

- 5a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se tratar o precipitado de factor de von Willebrand, na forma em que se encontra antes ou depois da pasteurização, em solução com ^RAerosil.

- 6a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por após o tratamento por permuta iônica se precipitar o fibrinogénio a partir da solução por adição de glicina numa concentração de 0,5 a 3 mol/l, de preferência 2,7 mol/l,

e se precipitar o VWF a partir da camada sobrenadante com uma concentração de NaCl de 2 a 15 % (peso/volume), de preferência 6 % (peso/volume).

- 7a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se filtrar em meio esterilizado e se liofilizar o VWF pasteurizado e purificado por meio da adição de glicina (2 % peso/volume), albumina (0,5 %) em citrato (0,02 mol/l)-NaCl (0,06 mol/l).

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 14 de Fevereiro de 1989, sob o nº. P 39 04 354.1.

Lisboa, 13 de Fevereiro de 1990
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM CONCENTRADO DE FACTOR DE VON WILLEBRAND PURIFICADO E PASTEURIZADO"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um concentrado de factor de von Willebrand pasteurizado, que comprehende tratar-se uma solução contendo o factor de von Willebrand (vWF) como complexo com o F VIII:C num tampão contendo aminoácidos a pH 5,5 a 6,5 e a uma concentração de hidratos de carbono de 5 a 30 % Peso/peso, num permutador aniónico, ao qual se liga o F VIII:C, e se recuperar a partir da solução o concentrado de factor de von Willebrand.