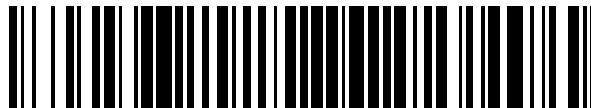


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 535**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2010 E 10706368 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2387582**

54 Título: **Nuevo proceso para la purificación altamente selectiva de dos proteínas plasmáticas: factor de von willebrand (vwf) y fibronectina (fn).**

30 Prioridad:

19.01.2009 IT FI20090007

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

23.08.2013

73 Titular/es:

**KEDRION S.P.A. (100.0%)
Localita' ai Conti 5
55051 Castelvecchio Pascoli - Barga, IT**

72 Inventor/es:

**MORI, FILIPPO;
NARDINI, ILARIA;
FARINA, CLAUDIO y
NARDINI, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 420 535 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 proceso para la purificación altamente selectiva de dos proteínas plasmáticas: factor de von willebrand (vWF) y fibronectina (fn)

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al ámbito de la purificación de proteínas de plasma humano.

10 **Estado de la técnica**

[0002] El Factor de von Willebrand (vWF) es una de las mayores glucoproteínas conocidas que circulan en el plasma. Esta proteína está en forma de multímeros, que se mantienen unidos por puentes de disulfuro, cuyo peso molecular puede variar desde 260 KDa (subunidad base) hasta 20 millones de Daltons.

15

[0003] El vWF es muy importante en el proceso hemostático; de hecho, además de realizar su función como portador y estabilizador del FVIII en la sangre, es esencial para la adhesión de los trombocitos al endotelio/subendotelio dañado. En la primera etapa de la hemostasia, la adhesión, el vWF actúa formando un puente entre los receptores específicos de la superficie de los trombocitos (Gplb, Gpllb/IIIa) y los componentes del endotelio.

20

[0004] Los cambios en los niveles del vWF pueden provocar graves problemas hemorrágicos.

[0005] La enfermedad de Von Willebrand (vWD) es una enfermedad hereditaria autosómica de la sangre prevalente en alrededor del 0,8% y está causada principalmente por una deficiencia o una composición multimérica anormal del vWF. Consecuentemente, la actividad de la coagulación del FVIII (FVIII:C) se ve a menudo reducida, ya que el vWF no puede realizar su función estabilizante del FVIII. Los pacientes que padecen la vWD pueden mostrar síntomas similares a los de la hemofilia A, causada por una disminución en la semivida del FVIII.

25

[0006] La relevancia del vWF para la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado se refleja en el hecho de que los pacientes con vWD tienen a menudo un tiempo de hemorragia elevado; por lo tanto, el principal objeto del tratamiento de la vWD es la corrección del tiempo de hemorragia y de la deficiencia en el FVIII.

30

[0007] Actualmente hay dos metodologías terapéuticas para la enfermedad: 1) el uso de desmopresina (1-desamina-8-D-arginina, vasopresina o DDAVP) y 2) la terapia de sustitución con una infusión de concentrados plasmáticos que contienen el vWF. El tratamiento con DDAVP, que estimula la liberación del vWF endógeno desde las células endoteliales, es la terapia de elección, pero en muchos casos los pacientes con vWD no responden a este tratamiento o se vuelven resistentes después de administraciones repetidas, y por lo tanto se hace necesario recurrir al uso de concentrados obtenidos a partir de plasma (crioprecipitados o concentrados de FVIII/vWF). Sin embargo, los crioprecipitados no están exentos de riesgo de contaminación vírica, ya que no son sometidos a una etapa de inactivación vírica eficaz, y el exceso de proteínas contaminantes, que no son útiles para el paciente, pueden provocar reacciones adversas. Por el contrario, aunque los concentrados del complejo FVIII/vWF se someten a tratamientos eficaces de inactivación/eliminación vírica, el proceso de purificación y los concentrados que se obtienen se han optimizado para el tratamiento de pacientes con hemofilia A y no para aquellos que padecen la enfermedad de von Willebrand. De hecho, se han desarrollado concentrados altamente purificados de FVIII/vWF para pacientes hemofílicos (según se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/79260 y en el documento W02008135568), que, bien contienen un bajo contenido en el vWF, o bien el contenido del FVIII con respecto al del vWF es tan elevado que puede aumentar el riesgo de trombosis en pacientes que padecen vWD (especialmente en la subclase 2N y 3). Para estos pacientes, que tienen unas concentraciones plasmáticas normales de FVIII, son sin embargo más adecuados los concentrados de vWF que contienen unos niveles despreciables de FVIII.

35

40

45

50

[0008] La fibronectina es otra glucoproteína con un elevado peso molecular (440 KDa) que existe en dos formas: una soluble en el plasma y otra insoluble.

55

[0009] Esta proteína tiene un papel determinante en algunas funciones fisiológicas de extrema importancia para la homeostasis del organismo.

[0010] En particular, interactúa con la migración y la diferenciación celular, la regeneración nerviosa, la revascularización y la reparación de lesiones en el epitelio, en las mucosas o en el endotelio. La Fn es capaz de estimular, como opsonina no específica, la fagocitosis del sistema de macrófagos. La deficiencia en esta proteína está acompañada por una reducción en la actividad fagocítica que, en el caso de una infección, puede conducir a un aumento en la mortalidad. Por lo tanto, se ha hipotetizado que la administración de fibronectina exógena puede tener un efecto terapéutico en estados clínicos graves, caracterizados por unos bajos niveles hemáticos de esta glucoproteína y por la propensión a evolucionar hacia un fallo multiorgánico vital, tal como del hígado, de los riñones, de los pulmones, etc. Estos estados están representados por sepsis, coagulopatías, amplias quemaduras, procedimientos quirúrgicos intensivos.

60

65

- 5 **[0011]** Otro uso de la Fn en terapia está relacionado con la capacidad de esta proteína de promover la migración celular de neovascularización epidérmica a través del tejido de granulación, y la reorganización de la membrana basal de las células epiteliales y de la mucosa. La Fn juega por tanto un importante papel en el cierre de las lesiones del epitelio y de las mucosas y, por ejemplo, si se aplica en forma de gotas oculares, puede acelerar la reepitelización y la reparación de las lesiones corneales provocadas por traumas o por infecciones.
- 10 **[0012]** El reconocimiento del potencial efecto terapéutico del vWF y de la Fn ha aumentado en gran medida el interés por estas proteínas y los esfuerzos para obtener vWF y Fn altamente purificados que respondan a las necesidades terapéuticas y a los requisitos del mercado.
- 15 **[0013]** La purificación de proteínas tales como el vWF y la Fn es muy difícil debido a su elevado peso molecular y a sus propiedades adhesivas, que comprometen su recuperación y pueden provocar su deterioro.
- 20 **[0014]** Tanto el vWF como la Fn se han purificado por separado usando plasma como material de partida o fracciones enriquecidas tales como criosobrenadante o intermedios derivados de pretratamientos de precipitación y/o de la cromatografía del crioprecipitado.
- 25 **[0015]** Berntorp y col. (Vox Sang. 1989, 56: 212) y Winkelman y col. (Vox Sang. 1989, 57: 97), por ejemplo, purifican el vWF a partir de plasma mediante la precipitación diferencial en presencia de glicina o de sulfato sódico. Perret y col. (Haemostasis 1984, 14: 289) y Austen y col. (Thromb. Haemostas. 1982, 42: 295) purifican a su vez el vWF a partir de plasma usando diferentes procedimientos de separación cromatográfica, tales como exclusión molecular o intercambio aniónico. Sin embargo, todas estas técnicas producen un vWF con bajos rendimientos y baja pureza.
- 30 **[0016]** La patente US 6.579.723 describe un proceso para preparar vWF altamente purificado mediante cromatografía de inmutafinidad con anticuerpos anti-vWF. Sin embargo, la adición de una subsiguiente etapa de cromatografía de afinidad no ayuda a eliminar totalmente la presencia de anticuerpos residuales, que pueden provocar reacciones inmunológicas.
- 35 **[0017]** La patente US 5.408.039, partiendo de una fracción enriquecida en vWF y sometida a una activación vírica, proporciona dos cromatografías subsiguientes, la primera en Fractogel DEAE TSK 650 y la segunda en gelatina-Sepharose para eliminar la fibronectina, considerada una impureza; a su vez, la patente US 5.252.709 sustituye la última cromatografía por una filtración en gel de Sephacril S-400.
- 40 **[0018]** La patente US 2006/0036081, partiendo de una fracción enriquecida obtenida a partir de una etapa precedente de cromatografía en DEAE-Fractogel TSK 650, purifica el vWF, eliminando las impurezas de Fn con una cromatografía en DEAE-Fractogel TSK 650 usando un tampón (acetato sódico 20 mM) con altas velocidades de flujo.
- 45 **[0019]** La patente EP0469985B1, partiendo de un crioprecipitado de virus inactivados, purifica el vWF mediante dos etapas cromatográficas con el mismo tipo de resina, que en este caso es la Q-Sepharose FF; el procedimiento usa en la segunda cromatografía un tampón de fuerza iónica que permite al vWF unirse, purificándolo de proteínas tales como fibrinógeno, IgG, fibronectina, albúmina, que no se unen a la resina.
- 50 **[0020]** Por su parte, con respecto a la Fn, Mosesson & Umfleet, (1970; J. Biol. Chem. 245, 5728 - 5736); Mosher, D. F. (1975; J. Biol. Chem. 250, 6614 - 6621) la purifican a partir de plasma combinando una etapa de precipitación, una cromatografía de exclusión molecular y una cromatografía de intercambio aniónico. Sin embargo, estos procesos son muy largos, con rendimientos muy bajos y que no pueden dimensionarse fácilmente. Vuento A. & Mosher D. (1978, Biochem J. 175, 33 - 336) purifican la Fn mediante una cromatografía de inmutafinidad, mientras que Engvall & Ruoslahti (1977, Int. J. Cancer. 20, 1 - 5) la purifican con una cromatografía de afinidad de gelatina. Sin embargo, estos procedimientos parecen tener efectos desnaturalizantes sobre la proteína.
- 55 **[0021]** Vuento M. & Vaheri (1979, Biochem. J. 183, 331 - 337) mejoraron la primera cromatografía de afinidad en gelatina Sepharose y añadieron una cromatografía de afinidad adicional: arginina Sepharose. Sin embargo, este proceso también es muy largo y difícil de dimensionar a nivel industrial.
- 60 **[0022]** Todos los procedimientos contemplados hasta la fecha para la preparación tanto del vWF como de la Fn son difíciles de adaptar a escala industrial y a menudo producen proteínas con una baja pureza y/o parcialmente deterioradas e inestables; en cualquier caso, ningún procedimiento proporciona la purificación de ambas proteínas de una forma secuencial.
- 65 **[0023]** El objeto de la presente invención es por tanto proporcionar un procedimiento simple con un elevado rendimiento y eficacia, fácilmente dimensionable a nivel industrial, para obtener secuencialmente en el mismo proceso los dos concentrados bien caracterizados basados en las proteínas de interés, el vWF y la Fn, con un elevado grado de purificación y estabilidad, adecuadas para su uso terapéutico.

Definiciones y abreviaturas

[0024]

- 5 Ag: antígeno
- CBA: actividad de unión al colágeno
- Fn: fibronectina
- Ig: inmunoglobulina
- RCo: cofactor de ristocetina
- 10 TMAE- trimetilamonioetilo
- TNBP: fosfato de tri-n-butilo
- UI: unidades internacionales
- VWD: enfermedad de von Willebrand
- vWF: factor de von Willebrand

15

Resumen de la invención

[0025] La presente invención proporciona un proceso simple, con un elevado rendimiento y eficacia, fácil de adaptar a nivel industrial, para la producción de dos concentrados que contienen esencialmente vWF y Fn, partiendo de una fracción biológica enriquecida en vWF y Fn, caracterizado por una única purificación cromatográfica en una resina de intercambio aniónico fuerte.

20

[0026] Los concentrados obtenidos tienen una elevada actividad específica y, dado el bajo contenido en proteínas contaminantes, son particularmente adecuados para su uso terapéutico.

25

Breve descripción de las figuras

[0027]

- 30 Figura 1- distribución multimérica del vWF purificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.
- Figura 2- patrón electroforético de las fracciones cromatográficas en gel de poliacrilamida al 5%.

Descripción detallada de la invención

[0028] La presente invención se refiere a un proceso para la producción secuencial de dos proteínas altamente purificadas: vWF y Fn, partiendo de una fracción biológica enriquecida en vWF y Fn, caracterizado por una única purificación cromatográfica con una resina de intercambio aniónico fuerte.

35

[0029] Según la presente invención, se pretende que la fracción biológica enriquecida en vWF y Fn sea una fracción derivada de un tratamiento de purificación precedente mediante cromatografía de intercambio aniónico realizado según los procedimientos conocidos sobre: plasma humano, un crioprecipitado u otra fracción plasmática, sometida opcionalmente a un tratamiento de prepurificación, tal como adsorción en hidróxido de aluminio, y sometida opcionalmente a una inactivación vírica con el procedimiento del disolvente/detergente (Tween/TNBP).

40

[0030] Según un aspecto particularmente preferido y ventajoso, dicha fracción biológica enriquecida es una fracción de desecho del proceso de producción del FVIII. La separación cromatográfica de la presente invención puede realizarse con resinas de intercambio aniónico fuerte, tales como: Q Sepharose™ (GE Healthcare), UNOsphere Q™ (Bio Rand Laboratories Inc.), Toyopearl® Super Q y Toyopearl® GigaCap Q (TOSOH), y preferiblemente con resinas formadas por un medio hidrófilo sintético con estructura de tentáculo que contiene largas cadenas poliméricas, en el extremo de las cuales hay unidos grupos cargados positivamente adecuados para el intercambio aniónico fuerte (tales como TMAE-trimetilamonioetilo); algunos ejemplos de resinas de este tipo son Fractoprep® EMD TMAE o Fractogel® EMD TMAE (Merck).

45

50

[0031] El uso de resinas de tentáculo promueve la unión de proteínas de elevado peso molecular (> 300 KDa) o de proteínas adhesivas tales como el vWF, disminuyendo la interacción con la matriz, que podría provocar una disminución en la recuperación de la proteína y/o su inactivación. Según la presente invención, la única purificación cromatográfica se caracteriza por un aumento secuencial apropiado de la concentración salina que permite la eliminación de proteínas contaminantes y la dilución secuencial de dos disoluciones que contienen respectivamente Fn y vWF con una excelente pureza y rendimiento.

55

60

[0032] Según la presente invención, la purificación cromatográfica comprende preferiblemente las siguientes etapas:

- a) el acondicionamiento de la resina de intercambio aniónico fuerte con un tampón acuoso con un pH comprendido entre 6,8 y 7,4, que contiene NaCl a una concentración entre 0,10 y 0,15 M, y que comprende

opcionalmente glicina y/o CaCl₂;

b) la carga de la fracción enriquecida en las proteínas de interés;

c) la elución de las proteínas contaminantes usando el tampón de acondicionamiento;

d) la elución de una disolución que contiene Fn con un tampón a un pH de entre 6,8 y 7,4 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,2 y 0,27 M y en el que hay opcionalmente presente CaCl₂ a una concentración comprendida entre 1 y 5 mM,

e) la elución de una disolución que contiene vWF con un tampón a un pH de entre 6,8 y 7,4 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,6 y 1,0 M y en el que hay opcionalmente presente CaCl₂ a una concentración comprendida entre 1 y 5 mM.

[0033] Dicho tampón a un pH comprendido entre 6,8 y 7,4 se obtiene, por ejemplo, con glicina, citrato, fosfato o Tris.

[0034] Las disoluciones obtenidas, que contienen la Fn o el vWF, se ultrafiltraron por separado, se concentraron y se liofilizaron.

[0035] Con este procedimiento pueden obtenerse dos concentrados altamente purificados con una excelente estabilidad:

- un concentrado de vWF para ser usado tanto para las subclases de vWD en las que el contenido en FVIII está en un intervalo normal, como para aquellos pacientes en los que no es posible el uso de desmopresina;
- un concentrado de Fn para su uso sistémico en la prevención del fallo orgánico vital en estados de sepsis y/o para su uso tópico como promotor de la reparación de las lesiones del epitelio o de las mucosas.

[0036] Este procedimiento hace posible purificar las dos proteínas de interés terapéutico partiendo de una fracción de desecho del proceso de producción del FVIII, mejorando así el uso de un material preciado tal como el plasma humano.

[0037] El procedimiento de purificación de la presente invención, además de permitir la obtención de concentrados altamente purificados de vWF y Fn, también es eficiente, reproducible, puede dimensionarse hasta el nivel industrial y proporciona un producto con elevados rendimientos. Los productos de Fn y vWF obtenidos tienen una elevada actividad específica, con bajas concentraciones de los principales contaminantes, tales como fibrinógeno, fibronectina, IgG, IgM. El vWF obtenido mediante el presente proceso cromatográfico tiene un patrón multimérico con elevados porcentajes de multímeros de elevado peso molecular, y en particular, el presente proceso cromatográfico da como resultado un producto final enriquecido en multímeros de elevado peso molecular (Fig. 1).

[0038] Para una mejor comprensión de la invención, a continuación se establece un ejemplo de purificación de las dos proteínas Fn y vWF según el proceso de la presente invención.

Parte experimental

Ejemplo 1

Purificación del vWF y de la Fn partiendo de un crioprecipitado

[0039] Después de la disolución de 65 g de crioprecipitado en 10 volúmenes de H₂O, se añadió a la disolución hidróxido de aluminio a pH 6,5 a una temperatura de 15°C. Después de centrifugar el sobrenadante, se sometió a una etapa de inactivación vírica mediante la adición de disolvente y detergente (Tween/TNBP) y subsiguientemente se cargó en una resina Toyopearl 650 M acondicionada con tampón de citrato 10 mM a pH 7,0 y con una concentración de NaCl de 0,12 M.

[0040] Las proteínas contaminantes fueron eliminadas lavando con el mismo tampón. Posteriormente, mediante el tratamiento de la resina con tampón de citrato 10 mM a pH 7,0 con NaCl 0,16 M se obtuvo una fracción enriquecida en vWF y Fn.

[0041] Esta fracción se dializó frente a tampón con una concentración de NaCl de 0,11 M y se concentró 2 5 veces.

[0042] Subsiguientemente, el concentrado se cargó en una resina Fractogel EMD TMAE, acondicionada con tampón de citrato 10 mM a pH 7,0 y con una concentración de NaCl de 0,11 M. Después de eliminar cualquier proteína contaminante con el mismo tampón, se separó la Fn eluyendo a una concentración de NaCl de 0,22 M. El eluido que contenía la Fn se diafiltró y se concentró frente a tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M a pH 7,5 hasta alcanzar una concentración de proteínas de 5 mg/ ml, después se filtró estéril, se embotelló y se liofilizó.

[0043] Subsiguientemente se eluyó el vWF aumentando la concentración de NaCl hasta 0,60 M y obteniendo un producto altamente purificado.

[0044] El eluido que contenía el vWF se diafiltró y se concentró frente a tampón de citrato 10 mM, NaCl 0,1 M, glicina 0,12 M, CaCl₂ 1 mM a pH 7,0 hasta alcanzar una concentración de 1.000 UI de vWF de Ag/ml, la disolución así obtenida después se filtró estéril, se embotelló y se liofilizó.

5 [0045] La distribución del vWF y de la Fn en las diversas etapas cromatográficas se resume a continuación en la Tabla A.

Tabla A

Distribución del contenido en vWF y en fibronectina en las diversas fracciones del proceso cromatográfico

Muestra	Recuperación de vWF:Ag		Recuperación de Fibronectina	
	(U totales)	(%)	(mg totales)	(%)
Fracción enriquecida	3325	-	447,8	-
0,22 M	186,9	5,6	448,2	100
0,60 M	2944	885	-	-

10 Ejemplo 2

Caracterización del vWF

15 [0046] El producto obtenido después de la elución cromatográfica con NaCl 0,60 M se caracterizó evaluando el contenido proteico total, la actividad del vWF:RCo (cofactor de ristocetina) y el vWF:CBA (actividad de unión al colágeno). La Tabla B, a continuación, muestra sus valores, mientras que la Fig. 1 muestra la distribución de los multímeros de vWF presentes en las fracciones cromatográficas en comparación con las presentes en el plasma, evaluadas en un gel de agarosa al 1 5%.

20

Tabla B

Actividad y proteínas del producto eluido con NaCl 0,60M

vWF:Ag (IU/ml)	33,00
vWF:RCo (IU/ml)	20,77
VWF:CBA (IU/ml)	18,06
Proteínas (mg/ml)	0,198
Actividad específica (UI/ml)	104,8
vWF:RCo/vWF:Ag	0,63
vWF:CBA/vWF,Ag	0,55

[0047] Las principales proteínas contaminantes fueron evaluadas sobre el producto obtenido después de la elución cromatográfica con NaCl 0,60 M. Los resultados se establecen en la Tabla C, a continuación:

25

Tabla C

Concentración de las principales proteínas contaminantes en un frasco de 1.000 UI de vWF:Ag

Análisis/frasco	Concentración
vWF:Ag (UI)	1.000
vWF:RCo (UI)	582
Proteínas (mg)	6,0
IgG (mg)	< 0,005
IgA (mg)	< 0,00036
IgM (mg)	0,033
Fibronectina (mg)	N. D.
Fibrinógeno (mg)	N. D.
FVIII:C (UI)	48

EJEMPLO 3

Caracterización de la fibronectina

- 5 **[0048]** El producto obtenido después de la elución cromatográfica con NaCl 0,22 M se caracterizó evaluando el contenido proteico total, el contenido en fibronectina mediante nefelometría y las principales proteínas contaminantes. La Tabla D, a continuación, muestra sus valores, mientras que la Fig. 2 (línea 3) muestra la pureza de la fibronectina, evaluada mediante una electroforesis en SDS-PAGE al 5%.

10

Tabla D

Características del producto eluido con NaCl 0,22 M

Fn:Ag (mg)	546,4
Proteínas (mg)	541,3
Pureza	> 95%
IgG	0,3%
IgA	N. D.
IgM	N. D.

N.D. no detectable

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para la producción secuencial de dos proteínas, el vWF y la Fn, partiendo de una fracción biológica enriquecida en vWF y en Fn, **caracterizado por** una única purificación cromatográfica con una resina de intercambio aniónico fuerte.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1 en el que la fracción biológica enriquecida en vWF y en Fn deriva de un tratamiento de purificación precedente mediante una cromatografía de intercambio aniónico realizada sobre: plasma humano, un crioprecipitado u otra fracción plasmática sometida opcionalmente a un tratamiento de prepurificación mediante adsorción en hidróxido de aluminio y sometida opcionalmente a una inactivación vírica.
- 15 3. Proceso según la reivindicación 2 en el que la fracción biológica enriquecida en vWF y en Fn es una fracción de desecho del proceso de producción del FVIII.
- 15 4. Proceso según la reivindicación 1 en el que la resina de intercambio aniónico fuerte está elaborada con un soporte sintético hidrófilo tentacular que contiene largas cadenas poliméricas portadoras de grupos TMAE en sus extremos.
- 20 5. Proceso según las reivindicaciones 1 - 4 en el que la purificación cromatográfica comprende las siguientes etapas:
- 20 a) el acondicionamiento de la resina de intercambio aniónico fuerte con un tampón acuoso con un pH comprendido entre 6,8 y 7,4, que contiene NaCl a una concentración entre 0,10 y 0,15 M, y que comprende opcionalmente glicina y/o CaCl₂;
- 25 b) la carga de la fracción enriquecida en las proteínas de interés;
- 25 c) la elución de las proteínas contaminantes usando el tampón de acondicionamiento;
- 25 d) la elución de una disolución que contiene Fn con un tampón a un pH de entre 6, 8 y 7,4 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,2 y 0,27 M y en el que hay opcionalmente presente CaCl₂ a una concentración comprendida entre 1 y 5 mM,
- 30 e) la elución de una disolución que contiene vWF con un tampón a un pH de entre 6,8 y 7,4 que contiene NaCl a una concentración comprendida entre 0,6 y 1,0 M y en el que hay opcionalmente presente CaCl₂ a una concentración comprendida entre 1 y 5 mM.

FIGURA 1

Multímeros del vWF:

a) plasma b) fracción de NaCl 0,22 M dializada c) fracción de NaCl 0,60 M dializada

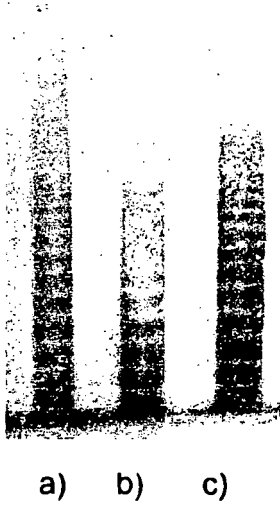


FIGURA 2

SDS-PAGE en condiciones no reductoras

1: intervalo de Alto Estándar puro 2: material de partida 0,16M
3:intermedio 0,22 M 4 - 5:eluido 0,60 M (W2)

