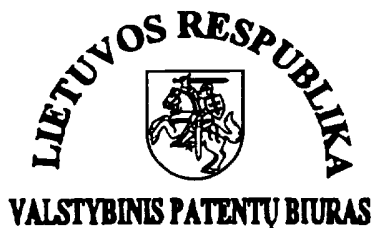


(19)



(10) **LT 3418 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3418**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 35/16**

(21) Paraiškos numeris: **IP263**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 09 25**

(60) SU duomenys: **SU 4831275, 1990 09 04**

(31,32,33) Prioritetas: **89 11567, 1989 09 05, FR**

(72) Išradėjas:

Miryana Burnouf, FR
Thierry Burnouf, FR

(73) Patent savininkas:

Centre Regional de Transfusion Sanguine de Lille, 19-21 rue Camille Guerin, F-59000
Lille, FR

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Būdas komplekso "VIII faktorius- von Willebrand'o faktorius" koncentratui gauti

(57) Referatas:

Išradimas liečia "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso koncentrato, turinčio aukštą specifinį aktyvumą, paruošimo iš visos (nekrepiocituotos) plazmos metodą.

Metodas susideda iš išankstinio valymo, naudojant dvigubą apdorojimą bario chloridu ir aliuminio hidroksidu. Taip pat metodas susideda iš chromatografinio valymo, naudojant DEAE-Fractogel tipo anijonų mainų dervą.

Metodas apima virusų inaktyvacijos stadiją, apdorojant tirpikliu - detergentu.

Metodas taip pat leidžia išskirti iš tos pačios plazmos fibrinogeną, albuminą, imunoglobulinus, antitrombiną III, fibronektiną ir protrombino kompleksą.

[vairūs koncentratai, gauti naudojant metodą sutinkamai su išradimu, yra skirti, ypač, terapiniam naudojimui.

Išradimas apima komplekso "VIII faktorius-von Willebrand'o faktorius" koncentrato, turinčio aukštą specifinį aktyvumą, gavimo būdą, panaudojant kraujo plazmą.

5

Hemofilijos A gydymas VIII faktoriaus injekcija yra įprasta praktika ir reikalauja didelio švarumo preparatų, kad, iš vienos pusės, sumažinti preparatų užteršimo virusais galimybę, iš kitos pusės - kadangi 10 injekcijos yra dažnai kartojamos - kad išvengti pavojingų pacientui nepageidaujamų imuninių pasekmių dėl preparate susikaupusių liekamųjų teršalų.

Norint išgryninti VIII faktorių, techniniuose centruose 15 yra naudojami įvairūs žmogaus plazmos apdorojimo metodai. Tokie metodai apima teršiančiųjų baltymų išsodinimą, naudojant įvairius cheminius agentus gelių-filtracinę chromatografiją bei įvairius šių skirtingų metodų derinius.

20

Kadangi plazmoje randami nedideli VIII faktoriaus kiekiai, valymo proceso išeiga yra svarbiausia spręstina problema. Be to, VIII faktorius yra nestabilus baltymas, kurį gali aktyvuoti kiti kraujo 25 faktoriai. Vienok, aktyvuojant, jis praranda savo gydomąją galią. Tokiu būdu problemos sprendimui reikalingi specialūs valymo metodai ir galutinis dozavimas.

30 Pareiškėjas jau išvystė valymo būdą, naudojant jonų mainų chromatografiją, kuri aprašyta Prancūzijos patentinėje paraiškoje No 88 07530; šis būdas leidžia gauti aukšto valymo laipsnio VIII faktoriaus koncentratą.

35

Vienok, kaip tai praktikavo kiti gamintojai, išleidžiantys analogiškus preparatus, pagal šį metodą

pradinė žaliava buvo plazmos krioprecipituota frakcija. Šioje krioprecipitacijos stadijoje prarandama 30-40% VIII faktoriaus, kuris lieka supernatante.

5 Būtų tikslinga sukurti paruošimo iš nekrioprecipituotos visos plazmos būdą, kad apriboti VIII faktoriaus nuostolius. Be to, toks metodas būtų labai parankus įranga nevienodai aprūpintiems centrams, kuriuose kartais būna sunku atlikti krioprecipitaciją.

10 Štai kodėl siūlomas paprastas VIII faktoriaus išskyrimo iš visos plazmos būdas, kuris leidžia gauti labai išvalytą stabilų koncentratą su labai aukšta produkto išeiga.

15 Tokiu būdu šis išradimas liečia VIII faktoriaus koncentrato gavimą, naudojant visą plazmą. Šis būdas apima išankstinę valymą, pašalinant protrombino komplekso sudedamąsias dalis (II, VII, IX, X
20 faktorius), taip pat valymą jonų mainų chromatografijos pagalba, parenkant gelį ir eliucijos buferį, norint gauti aukšto valymo laipsnio "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktorius" kompleksą.

25 Šis būdas (įvedus papildomas valymo stadijas) taip pat gali būti naudojamas kitų plazmos baltymų, kaip fibrinogenas, fibrinonektinas, albuminas, imunoglobulinai ir III antitrombinas, valytų tirpalų gavimui.

30 Šis būdas sukurtas naudojant žmogaus plazmą, bet jis vienodai tinkamas ir gyvulinės kilmės plazmai.

Remiantis šiuo išradimu, būdas tinkamas, kaip pradinę žaliavą naudojant visą kraujo plazmą, kuri gali būti
35 šviežia ar užšaldyta (išsaugojimo tikslu), bet tiksliai nekrioprecipituota. Tikslinga, kad ši plazma būtų surinkta, esant koagulantui ar stabilizuojančiam

tirpalui. Paprastai šiam reikalui naudojama citrato-dekstrozės-fosfato mišinys. Naudinga taip pat naudoti bet kokią specifinę VIII faktoriaus stabilizatorių, įvedamą į mišinį ar jį pakeičiantį.

5

Kaip plazmos pradinę medžiagą stabilizuojantį tirpalą tikslinga naudoti mišinį, susidedantį iš 0,2-2 v/ml heparino, 1-5 mM EDTA, 1-10 mM CaCl_2 , su galimu 5-60 g/l gliukozės priedu.

10

Sutinkamai su šiuo išradimu būdas turi išankstinio valymo stadiją, kuri derina išsodinimą bario chloridu ir adsorbiciją ant aliuminio hidroksido gelio.

15

Tikslinga plazmos apdorojimą bario chloridu atlikti prie pH 6.5, dedant 1 M bario chlorido tirpalą iki galutinės 0.08 M koncentracijos, nepertraukiamai maišant, po to centrifuguoti 5-10°C temperatūroje, kad pašalinti precipituotus baltymus ir tada surinkti supernatantą. Precipituotus baltymus naudinga surinkti, nes iš jų galima pagaminti protrombino kompleksą ar jo sudėtinės dalis.

20

Supernatantas tada apdorojamas 3% aliuminio hidroksido geliu (pH 6.5), adsorbuojančiu pasilikusius baltyminius teršalus. Šis apdorojimas atliekamas, supernatantą atšaldžius kriostate iki 5-8°C, po to centrifuguojant 5°C temperatūroje ir surenkant supernatantą, kuris laikomas 5-8°C temperatūroje.

25

30

Iš gauto supernatanto reikalinga pašalinti druskas. Tai galima atlikti arba ultrafiltracijos būdu, esant buferiui, kuris naudojamas sekančioje chromatografijos stadijoje ir į kurią pridedama 0.5-2 v/ml heparino, arba chromatografuojant ant Sephadex G25 tame pačiame buferyje.

35

Šis išradimas taip pat apima atskyrimą anijonų mainų chromatografijos pagalba. Prancūzijos patento paraiškoje No 88 07530 aprašyti privalumai, kuriuos turi žemos jonų mainų galios ir didelių porų dydžių dervos, dėka ko ant jų užsilaiko labai didelės molekulės. Šitas prailgėjęs užsilaikymas įgalina susidaryti silpniems hidrofobiniams molekulių ryšiams su derva ir, parenkant buferių joninę jėgą, leidžia selektyviai desorbuoti surištas molekules.

10

Šio tipo dervos pardavime figūruoja bendrų Fractogel vardu. Galima naudoti DEAE - Fractogel 650 (R) bei T-ar D-MAE-Fractogel (Merck) dervas. Kai kurios iš šių dervų paprastai yra tokioje modifikacijoje, kurią tiekėjas charakterizuoja kaip "čiulptuvėlio" tipo dervos. Jų matricų struktūra yra modifikuota, norint padidinti teigiamus krūvius surišanti paviršių, kuris padidina gelio talpumą.

20

Chromatografinės kolonėlės užkrovimo buferis yra buferis, kurio pagrindą sudaro natrio citratas ir natrio chloridas, nureguliuotas iki pH 7. Tikslinga, kad šis buferis turėtų 0.5-6 mM kalcio chlorido, 2-4 g/l lizino ir 8-11 g/l glicino. Būdas realizuojamas iš anksto didinant natrio chlorido koncentraciją.

25

Valymo būdo pagal šį išradimą įgyvendinimas apima anksčiau aprašyto valyto preparato užnešimą ant chromatografinės kolonėlės. Nustatytomis sąlygomis (0.11 M NaCl) kolonėlė gali surišti labai dideles molekules, pav., "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" kompleksą, leisdamą į filtratą pereiti fibrinogenui, albumidui, imunoglobulinams, antitrombinui III ir fibronektinui.

35

Sutinkamai su išradimo įgyvendinimo pageidautinu variantu, kurio tikslas yra pasiekti VIII faktoriaus

išskyrimo optimalų efektyvumą, chromatografinės kolonėlės buferio-eliuento joninė jėga buvo padidinta vieną kartą iki 0.27 M natrio chlorido koncentracijos. Sutinkamai su išradimo įgyvendinimo kitu variantu ši
5 eliucijos stadija seka po kolonėlės perplovimo su 0.13 M natrio chloridu, kuris pašalina fibronektiną.

Šiomis sąlygomis desorbuoto ir eliuoto "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso
10 specifinis aktyvumas mažiausiai lygus 5-10 v/mg. Bendra produkto išeiga lygi 350 v/l pradinės plazmos ir gali būti lygi mažiausiai 500 v/l, pridėjus į pradinę plazmą aukščiau aprašyto stabilizuojančio mišinio.

Priklausomai nuo būsimo panaudojimo šis "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso
15 tirpalas gali būti papildomai valomas, ypač, koncentruojant ir papildomai chromatografuojant. Analogiškai prieš tai buvusiai chromatografijai, ši
20 chromatografija gali būti atliekama ant DEAE- ar T/D-MAE-Fractogel ar kitų dervų. Galima naudoti kitus nešiklius, pav., dekstrano sulfatą, imobilizuotą amino-heksiną, imobilizuotą hepariną, sulfopropilo dervas, afinines ar imuno-afinines dervas.

Šis papildomas chromatografavimas gali būti atliekamas tame pačiame buferyje, kaip ir anksčiau. Sutinkamai su vienu pageidautinu išradimo įgyvendinimo variantu, kurio tikslas yra gauti kiek galima koncentruotesnį
30 VIII faktorių, papildomas chromatografavimas atliekamas tomis pačiomis sąlygomis kaip anksčiau, per vieną desorbcijos stadiją buferio joninę jėgą padidinus iki 0,27 M NaCl. Sutinkamai su kitu išradimo įgyvendinimo
35 variantu pirmas buferio joninės jėgos padidinimas iki 0.13 M turi pašalinti liekamuosius teršiančius baltymus, antras buferio jėginės jėgos padidinimas iki 0.27 M įgalina išskirti aukštai valytą "VIII

faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso koncentratą, kurio specifinis aktyvumas mažiausiai lygus 10-20 v/mg.

5 Kiti kolonėlės pirmo filtrato baltymai, kaip imunoglobulinai, albuminas, III antitrombinas, fibrinogenas ir fibronektinas, taip pat gali būti valomi ir koncentruojami, naudojant įprastus chromatografijos metodus.

10

Būdas sutinkamai su šiuo išradimu taip pat apima virusinę inaktyvaciją, atliekamą įprastu būdu. Naudojant cheminį agentą, pav., veikiant tirpikliu - detergentu, virusinę inaktyvaciją tikslinga atlikti prieš kiekvieną chromatografijos stadiją, bet tokiu būdu, kad vėliau būtų užtikrintas inaktyvuojančių agentų pašalinimas.

15

Šio išradimo objektu taip pat yra "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso bei kitų plazmos baltymų koncentratai, gaunami naudojant anksčiau aprašytą būdą.

20

Paminėti koncentratai yra suformuluoti pagal Farmakopėjos standartus ir gali būti naudojami terapiniams tikslams.

25

Sekantys pavyzdžiai iliustruoja išradimo įgyvendinimo variantus, bet neapriboja išradimo.

30 **1 PAVYZDYS**

Imama 250 ml šviežios plazmos arba užšaldytos ir iš anksto atšildytos iki 20-25⁰C plazmos. Plazma surenkama, esant antikoagulantui/stabilizatoriui (pav., citratui-dekstrozei-fosfatui) ir acto rūgštimi nustatomas pH 6.5.

35

a) Išankstinis valymas

Į plazmą peristaltiniu siurbliu esant pH 6.5 supilama
20 ml 1 M bario chlorido iki galutinės 0.08 M
5 koncentracijos. Bario chloridas yra supilamas 4-8
ml/min. greičiu ir tada mišinys kambario temperatūroje
yra maišomas 15 min.

Po to mišinys yra centrifuguojamas prie 2700 aps./min.
10 20 min. 8°C temperatūroje ir surenkamas supernatantas.

Supernatantas tuomet adsoruojamas ant aliuminio
hidroksido gelio (Alhydrogel Eurobio su 3% Al(OH)₃),
imant 2.3 g gelio 1l plazmos. Nustatomas pH lygus 6.5
15 ir kriostate atšaldoma iki 5°C. Mišinys yra
centrifuguojamas 20 min. 2700 aps./min., esant 5°C
temperatūrai ir surinktas supernatantas laikomas 5°C
temperatūroje.

20 Šis apdorojimas įgalina pašalinti protrombino komponentus
(II, VII, IX, X faktoriai), kuriuos galima surinkti ir
išvalyti žinomais metodais.

Ypatingai gerus rezultatus galima gauti, derinant šiuos
25 du apdorojimo metodus, kai tuo tarpu apdorojimas vien
Alhydrogel nepakankamas, kad pilnai būtų pašalintas
protrombinas ir kiti PPSB komplekso komponentai, o
apdorojimas vien bario chloridu praleidžia kokią tai
kiekį X faktoriaus, protrombino ir daugiausia VIII
30 faktorių.

Surinktas tokiu būdu supernatantas nudruskinamas
ultrafiltracijos pagalba, esant buferiui, kuris
naudojamas sekančioje chromatografijos stadijoje (žiūr.
35 žemiau), pridėjus 1 V/ml heparino, ar chromatografuojant
ant Sephadex 625 tame pačiame buferyje.

Po to atliekama įprasta virusinė inaktyvacija tirpiklio-detergento pagalba 24⁰C temperatūroje 6 val. laikotarpyje (šis metodas aprašytas Europos patento paraiškoje No 0 131 740).

5

b) Chromatografinis valymas

Iš anksto valytas dializuotas supernatantas valomas chromatografiškai. Tam naudojama K 26/30 kolonėlė (Pharmacia - Uppsala Sweden), kurios diametras 2.6 cm
10 ir darbinis aukštis 30 cm, 10 cm kurio užpildyta DEAE-Fractogel TSK 650 (R) derva (Merck).

Kolonėlę praplaunančio ir pavyzdį ištirpinančio buferio
15 sudėtis: 10 mM natrio citrato, 1 mM kalcio chlorido, 9 g/l glicino, 3 g/l lizino. Į šį buferį yra pridedama natrio chlorido iki galutinės 0.11 M ir pH nustatomas lygus 7.

20 Pavyzdys užnešamas ant kolonėlės 100 ml/val. greičiu. Kolonėlė yra plaunama buferiu, norint pašalinti neadsorbuotus baltymus: fibrinogeną, albuminą, imunoglobulinus, III antitrombiną ir fibronektiną, o taip pat virusus aktyvuojančiu agentus.

25

"VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" kompleksas tada desorbuojamas, padidinus buferio joninę jėgą iki 0.27 M natrio chlorido.

30 Šiuo būdu gautas VIII faktoriaus tirpalas turi 5-10 TV/mg specifinį aktyvumą, o valymo efektyvumas užneštos ant kolonėlės plazmos atžvilgiu yra 60-80%.

35 Šio VIII faktoriaus tirpalo švarumą galima truputį padidinti, panaudojus chromatografinio atskyrimo stadiją, kurios dėka gaunamą produkciją reikia koncentruoti. Pav., imama antroji kolonėlė su DEAE-

Fractogel ir, laikantis tų pačių užkrovimo sąlygų, praplaunama 0.13 M NaCl, kuris pašalina likusius teršiančius baltymus. Po to buferio joninė jėga padidinama iki 0.27 M NaCl, norint desorbuoti ir
 5 eliuuoti labai valytą ir koncentruotą "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" kompleksą.

Antrą chromatografinio koncentravimo stadiją galima pakeisti ultrafiltravimu.

10

Sutinkamai su šio išradimo įprastiniu įgyvendinimo variantu, pirma chromatografinio valymo stadija yra atliekama ant DEAE-Fractogel derbos. Be to, labai geri rezultatai buvo gaunami, naudojant tokias Merck firmos
 15 dervas, kaip TMAE-Fractogel (TMAE=Tri-Metil-Amino-Etilas) ir DMAE-Fractogel (DMAE=Di-MAE), kurių savybės ekvivalentiškos DEAE-Fractogel dervos savybėms. Taip pat gali būti naudojamas "čiulptuvėlio" tipo naujos dervos, sukurtos Merck kompanijoje ir W. Muller
 20 pristatytos skystos chromatografijos konferencijoje, kuri vyko 1989 m. birželio mėn. Stokholme.

2 PAVYZDYS

25 Kitas šio išradimo įgyvendinimo variantas leidžia gauti fibrinogeno ir fibronektino koncentratų tuo pačiu metu, kaip "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" koncentratą, tik su žemesne išeiga ir truputį geresniu specifiniu aktyvumu.

30

Technologinis procesas analogiškas 1 pavyzdžio procesui, išskyrus "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso eliuciją iš pirmos kolonėlės, užkrautos DEAE-Fractogel derva.

35

Fibrinogenas, III antitrombinas, albuminas ir imunoglobulinai ant kolonėlės neužsilaiko ir aptinkami filtrate.

5 "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" kompleksas gali būti išvalytas ir koncentruotas antroje chromatografinio atskyrimo stadijoje kolonėlėje su DEAE-Fractogel derva, naudojant buferį, kurio joninė jėga yra 0.17 M natrio chlorido ir kuris nesulaiko užteršiančiųjų baltymų. Padidinus buferio joninę jėgą iki 0.27 M natrio chlorido, užtikrinama "VIII faktoriaus-von Willebrand'o faktoriaus" komplekso desorbcija ir eliuacija. Tokiu būdu gauto preparato specifinis aktyvumas lygus 10-20 TV/mg.

15

Toliau galima valyti ir koncentruoti fibrinogeną ir fibronektiną, naudojant žinomus chromatografinius metodus, norint gauti tirpalus, savo kokybe tinkamus terapiniam naudojimui ir aprašytus Prancūzijos patento paraiškoje No 88 075 30.

20

Kiti plazmos baltymai gali būti valomi ir koncentruojami, naudojant įprastinius frakcionavimo metodus.

25

3 PAVYZDYS

Valymo efektyvumas gali būti padidintas, stabilizuojant pradinę plazmą (prieš tai atšildžius iki 25°C) sekančio mišinio priedu:

30

Heparinas:	1 v/ml,
Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA):	2 mM arba 0.74 g/l,
Kalcio chloridas:	6 mM arba 0.67 g/l.

I šį mišinį papildomai pridėta 5-60 g/l gliukozės.

Po to acto rūgštimi pH yra pažeminamas iki 6.5. Toliau valymo stadijos yra atliekamos kaip išdėstyta 1 ir 2 pavyzdyje.

- 5 Šiomis sąlygomis valymo proceso bendra išeiga mažiausiai lygi 500 v VIII faktoriaus: C/l pradinės plazmos.

- 10 Tai atitinka VIII faktoriaus 55-65% bendro aktyvumo, esant 10-30 v VIII faktoriaus: C/mg baltymo specifiniam aktyvumui.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas "VIII faktoriaus - von Willebrand'o faktoriaus" komplekso stabiliam koncentratui, turinčiam
5 aukštą specifinį aktyvumą, gauti, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad visą plazmą iš anksto valo
dviem stadijom, pirma apdorojant bario chloridu, o po
to aliuminio hidroksidu, o po to valo chromatografiškai,
naudojant anijonų mainų gelį, užtikrinanti labai didelių
10 molekulių surišimą ir užlaikymą.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad visa plazma yra šviežia arba užšaldyta.
- 15 3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad į plazmą deda stabilizuojančio mišinio,
susidedančio iš 0.2-2 v/ml heparino, 1-5 mM
etilendiamintetraacto rūgšties ir 1-10 mM kalcio
chlorido.
20
4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad stabilizuojantis mišinys taip pat turi
5-60 g/l gliukozės.
- 25 5. Būdas pagal vieną iš 1-4 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad išankstinę valymą sudaro:
 - a) išsodinimas bario chloridu, centrifugavimas ir
supernatanto surinkimas,
30
 - b) adsorbciija ant aliuminio hidroksido gelio,
centrifugavimas žemoje temperatūroje ir
supernatanto surinkimas,
 - 35 c) nudruskinimas.

- 5 6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad išsodinimą bario chloridu atlieka dedant 1 M bario chlorido tirpalą esant pH 6.5, nepertraukiamai maišo, po to centrifuguoja 5-10⁰C temperatūroje ir surenka supernatantą.
- 10 7. Būdas pagal 5 arba 6 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad adsorbciją ant aliuminio hidroksido gelio atlieka, naudojant 3 % gelį pH 6.5, po to seka greitas atšaldymas iki 5⁰C, centrifugavimas 5⁰C temperatūroje ir supernatanto surinkimas.
- 15 8. Būdas pagal vieną iš 5-7 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad nudruskinimą atlieka ultrafiltracija, esant buferiui, kuris naudojamas sekančioje chromatografijos stadijoje ir į kurią prideda heparino.
- 20 9. Būdas pagal vieną iš 5-7 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad nudruskinimą atlieka chromatografuojant ant Sephadex G25 kolonėlės buferyje, kuris naudojamas sekančioje chromatografijos stadijoje ir į kurią pridedama heparino.
- 25 10. Būdas pagal vieną iš 1-9 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad iš anksto valytą plazmos supernatantą užneša ant chromatografinės kolonėlės, užkrautos anijonų mainų geliu, nepraleidžiančiu labai didelių molekulių, bet leidžiančiu pereiti į filtratą 30 fibrinogenui, albuminui, imunoglobulinams, antitrombinui III ir fibronektinui.
- 35 11. Būdas pagal vieną iš 1-10 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad chromatografinis gelis yra vinil-polimerinio tipo gelis, prie kurio funkcinų grupių yra prijungtos DEAE arba tri-, arba dimetilaminoetilo tipo grupės.

12. Būdas pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polimerinis gelis yra Fractogel.

5 13. Būdas pagal vieną iš 10-12 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad chromatografinės kolonėlės užkrovimo buferį sudaro natrio citrato ir kalcio chlorido buferis, turintis glicino ir lizino, į kurį pridėta natrio chlorido iki 0.11 M koncentracijos ir kurio pH lygus 7.

10

14. Būdas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad buferis turi 8-11 g/l glicino ir 2-4 g/l lizino.

15 15. Būdas pagal vieną iš 10-14 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad norint desorbuoti iš chromatografinės kolonėlės "VIII faktoriaus - von Willebrand'o faktoriaus" kompleksą, buferio joninę jėgą padidina iki 0.27 M natrio chlorido koncentracijos.

20 16. Būdas pagal vieną iš 10-14 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad norint eliminuoti fibronektiną, buferio joninę jėgą padidina iki 0.13 M natrio chlorido koncentracijos ir po to - iki 0.27 M natrio chlorido koncentracijos, desorbuojant iš chromatografinės kolonėlės
25 "VIII faktoriaus - von Willebrand'o faktoriaus" kompleksą.

30 17. Būdas pagal vieną iš 1-16 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad "VIII faktoriaus - von Willebrand'o faktoriaus" kompleksą, desorbuotą iš pirmos chromatografinės kolonėlės, papildomai valo ir koncentruoja chromatografijos pagalba.

35 18. Būdas pagal vieną iš 1-17 punktų, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad papildomą chromatografiją atlieka ant jonų mainų dervos, pasirinktos iš: DEAE - arba T/D-MAE-Fractogel, imobilizuoto heparino, dekstrano

sulfato, sulfopropilo, arba ant afininės ar imunoafininės dervos.

- 5 19. Būdas pagal 17 arba 18 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad papildomą chromatografiją
atlieka, naudojant buferį su 0.11 M natrio chlorido ir
taikant 2 sekančius vienas po kito joninės jėgos
didinimus - pirma iki 0.13 M, po to iki 0.27 M.
- 10 20. Būdas pagal 17 arba 18 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad papildomą chromatografiją
atlieka, naudojant buferį su 0.17 M natrio chlorido ir
vienąkart padidinant joninę jėgą iki 0.27 M.
- 15 21. Būdas pagal vieną iš 1-14 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad baltymus, esančius
chromatografiniame filtrate pagal punktą 10, papildomai
valo ir koncentruoja.
- 20 22. Būdas pagal vieną iš 1-21 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad prieš kiekvieną
chromatografijos stadiją atlieka įprastą virusų
inaktyvavimą, naudojant tirpiklį - detergentą.
- 25 23. "VIII faktoriaus - von Willebrand'o faktoriaus"
komplekso koncentratas, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad jis yra gaunamas būdu pagal vieną iš 1-22
punktų.
- 30 24. Baltymų koncentratai, gauti iš plazmos, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad jie gaunami būdu pagal
vieną iš 1-14 ir 21 arba 22 punktų.
- 35 25. Koncentratai pagal 23 arba 24 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad jie yra gaminami terapiniam
naudojimui.