

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ENLACE AL COLÁGENO DEL FACTOR VON WILLEBRAND PRESENTE EN EL CONCENTRADO TERAPÉUTICO FANHDI MEDIANTE RESONANCIA DE PLASMONES DE SUPERFICIE

S. Trancha y J.I. Jorquera

Área Investigación y Desarrollo. Instituto Grifols S.A. Barcelona.

El Factor von Willebrand juega un papel central en el mantenimiento de la hemostasia gracias a su capacidad para interaccionar con el colágeno y la glicoproteína GPIb en la superficie de las plaquetas. Fanhdi es concentrado terapéutico cuyo principio activo es el complejo Factor VIII/Factor von Willebrand (FVIII/FVW) de alta pureza y doblemente inactivado. Con el objetivo de evaluar el impacto del proceso de purificación empleado sobre la capacidad del FVW para unirse al colágeno, el presente estudio ha estudiado la afinidad FVW: colágeno mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR). Paralelamente, se ha estudiado la conservación de la estructura multimérica del FVW en Fanhdi, ya que este aspecto puede modular la funcionalidad del FVW. Las propiedades cinéticas y de equilibrio de la interacción FVW: colágeno mediante SPR se analizaron en un equipo Biacore 1000 (Biacore). Para ello se procedió a inmovilizar colágeno humano tipo III (Sigma) sobre un chip de carboximetil dextrano CM5 (Biacore) en el que se realizaron los ensayos secuenciales de interacción con cantidades conocidas de complejo FVIII/FVW. La estructura multimérica fue obtenida por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, transferencia en membrana de nylon y revelado con un anticuerpo anti-FVW humano marcado. El resultado fue evaluándose mediante densitometría. Los resultados muestran que el complejo FVIII/FVW posee una constante cinética de afinidad k_a de $8,49 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la constante de disociación dinámica (k_d) obtenida fue $2,42 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Como consecuencia, la constante de equilibrio K_D para la unión colágeno-FVW en Fanhdi es $2,85 \times 10^{-09} \text{ M}$. Estas constantes son equivalentes a las observadas previamente con FVW humano purificado (Saenko E *et al. Anal Biochem* 2002; 302:252). Por su parte, la evaluación de la estructura multimérica muestra que la proporción de formas de alto peso molecular (área de bandas 11 o superior) en Fanhdi se mantiene en un 80% en relación a la encontrada en un plasma normal. Estos resultados son consistentes con referencias previas (Mouton *et al. Int J Hematol* 2004; 80:383, Rivera J *et al Haematologica* 1999; 84:5). En conjunto los resultados indican que el proceso de purificación empleado en la obtención del complejo FVIII/FVW de alta pureza Fanhdi mantiene adecuadamente las propiedades bioquímicas naturales del FVW, tal y como confirma la experiencia clínica en el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand.