

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 954649 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **954649**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 1/16

C07K 1/36

C07K 14/745

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.03.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.09.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **29.09.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **24.03.1994 PCT/DK1994/000122**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

31.03.1993 DK 382/93

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Joergensen, Tony, Danmark, TANSKA, (DK)

2 • Pedersen, Anders Hjelholt, Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Hyytymistekijä VII:n puhdistus

Rening av faktor VII

Hyytymistekijä VII:n puhdistus - Rening av faktor VII

5 Keksinnön ala

Keksintö liittyy menetelmään, joka soveltuu käytettäväksi hyytymistekijä VII:n aktivoitumisen ja pilkkoutumisen aikaansaamiseksi hallitulla tavalla.

10 Keksinnön tausta

Hyytymistekijä VII (FVII) on K-vitamiinista riippuvainen seriiniproteaasi, jolla on ratkaiseva osuus veren hyytymisen ulkoisessa aktivoitumistiessä. Se syntetisoituu maksassa ja erittyy vereen, jossa se esiintyy yksiketjuisena glyko-proteiinina (zymogeenina), jonka suhteellinen moolimassa on noin 50 000. Tämä proteaasi katalysoi aktivoituneessa muodossaan, FVIIa:na, kahden muun seriiniproteaasien ryhmään kuuluvan K-vitamiinista riippuvaisen hyytymistekijän, hyytymistekijä IX:n (FIX) ja hyytymistekijä X:n (FX) aktivoitumista.

Aktivoitunut FX (FXa) muuntaa tämän jälkeen protrombiinin trombiiniksi. Trombiini muuttaa sitten fibrinogeenin fibriniksi, joka on hyytymän tärkein ainesosa.

25

Hyytymistekijä VII voidaan puhdistaa veriplasmasta ja aktivoida hyytymistekijä VIIa:ksi menetelmillä, joita on kuvattu julkaisuissa Broze ja Majerus, J. Biol. Chem. 255(4) (1980) 1242 - 1247 ja Hedner ja Kisiel, J. Clin. Invest. 71(1983) 1836 - 1841.

30

Hyytymistekijää VIIa voidaan myös tuottaa yhdistelmä-DNA-menetelmällä viljelmällä hyytymistekijää VII koodaavalla DNA-sekvenssillä transfektoituja nisäkässoluja asiaan-kuuluvassa mediumissa, eristämällä tuotettu proteiini ja aktivoimalla mainittu proteiini hyytymistekijä VIIa:ksi

35

(tätä on käsitelty eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 86 302 855.1.

5 Hyytymistekijää VIIa voidaan käyttää sellaisten potilaiden hoidossa, joille on kehittynyt inhibiittoreita hyytymistekijää VIII vastaan [Hedner ja Kisiel, J. Clin. Invest. 71 (1983) 1836 - 1841], ja sellaisten potilaiden hoitoon, joilla on verenvuotohäiriöitä, kuten verihiutalehäiriöitä, joita ovat trombosytopenia, von Willebrand'in tauti ja muita
10 tyyppillisesti vakavien kudosaivurioiden yhteydessä esiintyy häiriöitä (tätä on käsitelty eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 86 309 197.1.)

15 Plasmasta peräisin olevan boviini-proteiinin [Radcliffe & Nermerson, J. Biol. Chem. 250 (1975) 338 - 395] ja humaani-yhdistelmä-proteiinin [Thim., et. al., Biochemistry 27 (1988) 7785 - 7793] puhdistuksen aikana FVII on aktivoitunut kaksiketjuiseen muotoon Arg₁₅₂-Ile₁₅₃-sidoksen hydrolyysin vaikutuksesta. FVII:n aktivoitumista tehostaa voimakkaasti
20 tämän adsorboituminen anioninvaihtimiin (dietyyliamino-etyyli-ryhmillä tai trimetyyliamino-etyyli-ryhmillä modifioituihin polymeerigeelimatriseihin) [Pedersen, A.H., et al., Biochemistry 28, (1989) 9331 - 9336]. FVII:n aktivoitumisen tehostumismekanismia ei tunneta. Aktivoitumisen lisäksi osa
25 FVIIa-molekyyleistä pilkkoutuu molekyylin oman pilkkomisaktiivisuuden vaikutuksesta pääasiallisesti asemista 290 ja/tai 315 [Nicolaisen, e.m., et al., FEBS Lett. 317 (1983) 245 - 249]. Tällaiset pilkkoutumistuotteet ovat inaktiivisia molekyylejä ja niiden esiintyminen hyytymistekijä VIIa-
30 -valmisteissa johtaa lopullisen valmisteen ominaisaktiivisuuden pienenemiseen. Lisäksi pilkkoutumistuotteiden määrä ja tyyppi voi vaihdella tuotantoerästä toiseen, mikä johtaa siihen, että tuotannossa saadaan valmisteita, joissa on vaihtelevia määriä biologisesti aktiivista hyytymistekijä VIIa:ta. Mikäli lopullinen valmiste sisältää pilkkoutumis-
35 tuotteita, niin nämä voivat käynnistää potilaan immuunijärjestelmän toiminnan. Valmistetta uudelleen annettaessa

5 voi sitten syntyä allergisia reaktioita, jotka vakavissa tapauksissa voivat johtaa kuolemaan. Potilaille voi myös kehittyä suuria vasta-ainetiittereitä hyytymistekijä VIIa:ta vastaan, mikä vaikeuttaa myöhemmin annettavaa hoitoa tai tekee tämän tehottomaksi.

10 Sellaisen puhdistetun FVIIa-tuotteen valmistamiseksi, jossa pilkkoutumistuotteiden määrä on pieni, on oleellista kontrolloida aktivoitumista ja viivästä puhdistusmenetelmän ja myöhemmän käsittelyn aikana tapahtuvaa pilkkoutumista. Yksiketjuinen muoto, FVII, on FVIIa:sta poiketen resistentti raskaan ketjun pilkkoutumiselle tai siinä tapahtuu tällaista paljon vähemmän. Tästä syystä voi olla edullista puhdistaa FVII yksiketjuisessa muodossaan.

15 Edellä olevan perusteella tämän keksinnön tarkoituksena on saattaa käyttöön FVII:n puhdistusmenetelmä, jolla aktivoitumista ja pilkkoutumista vältetään tai nämä pidetään niin vähäisenä, että se on vielä hyväksyttävä, jolla menetelmällä on tarkoituksena saattaa käyttöön erittäin puhdas homogeeninen tuote, joka voidaan sitten myöhemmässä vaiheessa aktivoida erittäin hyvällä saannolla FVIIa:ksi sellaisen yhtenäisen ja homogeenisen tuotteen aikaansaamiseksi, jonka ominaisaktiivisuus on suuri.

25 On tunnettua, että sinkki-ionit inhiboivat yhdistelmä-FVIIa:n amidolyyttistä ja proteolyyttistä aktiivisuutta [Pedersen, A. H., et al., Thrombosis and Haemostasis 65 (1991) 528 - 534]. Tässä keksinnössä on tehty se yllättävä havainto, että sinkki-ionien lisäystä voidaan käyttää kontrolloimaan FVII:n autogeenistä aktivoitumista ja viivästä FVII/FVIIa:n pilkkoutumista kromatografisia kolonni-

30 materiaaleja käyttäen suoritettavan puhdistuksen aikana.

35 Keksinnön kuvaus

Tämä keksintö liittyy laajimmassa merkityksessään menetelmään FVII:n aktivoitumisen ja pilkkoutumisen aikaansaamiseksi.

si kontrolloiduissa olosuhteissa puhdistuksen aikana, jonka kuluessa hyytymistekijä VII:n liuosta käsitellään useissa kromatografisissa puhdistusvaiheissa, joista vaiheista ainakin yhdessä käytetään Zn^{++} :aa.

5

Tämä keksintö liittyy edellistä rajoitetummassa mielessä menetelmään FVII:n aktivoitumisen ja pilkkoutumisen aikaansaamiseksi kontrolloiduissa olosuhteissa, jossa menetelmässä FVII:n liuosta käsitellään useissa eri anioninvaihto- ja immunoaffiniteettikolonneissa.

10

Tämän keksinnön edullisessa sovellutusmuodossa FVII-liuosta käsitellään kromatografiakolonneissa järjestyksessä, joka on: 1) anioninvaihtokolonni; 2) immunoaffiniteettikolonni; 3) anioninvaihtokolonni; 4) anioninvaihtokolonni, joissa Zn^{++} :aa käytetään ainakin kahdessa ensimmäisessä vaiheessa.

15

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on esitys FVII:n aktivoitumisesta anioninvaihtokolonneissa Zn^{++} -konsentraatiota muutettaessa.

20

Kuvio 2 on esitys rFVII:n aktivoitumisesta rFVIIa:ksi sellaisten puhdistuskaavioiden mukaisissa puhdistuksissa, joissa puskureihin on yhdessä tai useammassa puhdistusvaiheessa lisätty Zn^{++} :aa.

25

Puhdistuskaavioissa A - E käytetyt olosuhteet on esitetty taulukossa 1 ja tulokset on esitetty taulukossa 2.

30

Kuvio 3 on esitys FVIIa:n pilkkoutumisesta sellaisten puhdistuskaavioiden mukaisissa puhdistuksissa, joissa puskureihin on yhdessä tai useammassa puhdistusvaiheessa lisätty Zn^{++} :aa.

35

Puhdistuskaavioissa A - E käytetyt olosuhteet on esitetty taulukossa 1 ja tulokset esitetty taulukossa 2.

Ennen kuin tätä keksintöä ryhdytään selittämään, on sen ymmärtämiselle avuksi esittää tiettyjen tuonnempana käytettyjen termien määritelmät.

5 FVII: FVII sisältää FVII:n, joka on eristetty veriplasmasta tai valmistettu yhdistelmä-DNA-menetelmällä. Se sisältää myös mahdollisesti olemassa olevat ja yksilökohtaisesti esiintyvät alleelivariantit ja sellaiset FVII-proteiinit, joita on modifioitu deleetimalla niistä ja/tai substituoi-

10 malla niissä aminohapporyhmiä, joilla aktivoitumisen tapahtuttua on samanlainen tai olennaisesti samanlainen biologinen aktiivisuus veren hyytymisen kyseessä ollessa kuin endogeenisellä humaani-FVII:lla.

15 Edellä olevaan määritelmään sisältyvä "FVII" sisältää myös FVII-proteiinit, joissa esiintyy vaihtelevan tasoista ja eri paikoissa olevaa glykosylaatiota ja/tai muita translaation jälkeisiä modifikaatioita, jotka tapahtuvat sen mukaan, mitkä ovat yhdistelmä-DNA-menetelmän avulla ilmennettynä

20 ovat valitut isäntäsolut ja viljelyolosuhteet.

FVII:n biologinen aktiivisuus: FVIIa:n biologinen aktiivisuus luonnehditaan ulkoisen aktivaatiotien kautta tapahtuvan veren hyytymisen välityksellä.

25 FVIIa aktivoi FX:n FXa:ksi, joka puolestaan muuntaa protrombiinin trombiiniksi, joka tämän johdosta saa aikaan fibriinihiyytymän muodostumisen.

30 Kontrolloitu aktivoituminen ja pilkkoutuminen: tämä ilmaus kattaa menetelmän, jossa FVII:n aktivoituminen ja pilkkoutuminen puhdistuksen aikana etenee sen mukaan, miten tiettyä muuttujaa (tässä tapauksessa käytettävää Zn^{++} -pitoisuutta) muutetaan aiotulla tavalla säännösteltysti.

35 Zn^{++} :n puuttuessa on puhdistusmenetelmän muuttujia säädettävä samanaikaisesti tapahtuvan aktivaatio- ja pilkkoutumis-

reaktion mukaan. Zn^{++} :n läsnäollessa on osoittautunut mahdolliseksi säännöstellä näitä reaktioita, mikä tekee mahdolliseksi puhdistuksen ja aktivoitumisen optimoinnin toisistaan riippumattomalla tavalla.

5

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Humaani-FVII:tä ilmennetään edullisesti transfektoiduissa nisäkkäiden Baby Hamster Kidney (BHK) -soluissa eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro 86 302 855.1 kuvatulla tavalla. Ennen kuin kromatografinen puhdistus aloitetaan, erotetaan FVII:tä sisältävä kasvatusmedium ja solujen kasvua stimuloivat proteiinit soluista sentrifugoimalla ja suodattamalla.

15 Puhdistustarkoitusta varten FVII absorboidaan erityyppisiin kromatografisiin matrikseihin, kuten kationinvaihtimiin, anioninvaihtimiin, immunoaffiniteettimatrikseihin, metalli-ionikelaattoreihin, väriaine-affiniteettimatrikseihin, hydrofobiseen vuorovaikutukseen perustuviin matrikseihin ja
20 affiniteettimatrikseihin, jotka sisältävät immobilisoituja biospesifisiä ligandeja. Mekanismi, jolla FVII adsorboituu näihin eri matrikseihin, on eri tapauksissa erilainen ja tästä syystä Zn^{++} :n vaikutus FVII:n aktivaatioon saattaa olla erilainen, mutta kuitenkin merkittävä sinä aikana, jona
25 tekijä adsorboituu erityyppisiin kromatografisiin matrikseihin.

Sinkkisuola voidaan lisätä tasapainotukseen ja eluointiin käytettyihin yhteen tai useampaan eluointiliuokseen ja puskuriin. Sinkkisuola voi olla mikä tahansa liukoinen
30 sinkkisuola, kuten sinkkiasetaatti, sinkkisitraatti, sinkkikloridi tai sinkkisulfaatti.

Zn^{++} -konsentraatio voi vaihdella alueella $10\ \mu\text{M}$ - $1\ \text{mM}$ ja se
35 on edullisesti noin $20\ \mu\text{M}$ - noin $1\ \text{mM}$ ja edullisimmin noin $40\ \mu\text{M}$ - noin $1\ \text{mM}$.

Puhdistetun FVII:n myöhempi aktivoituminen FVIIa:ksi voidaan saada aikaan käyttämällä FXIIa:ta Hedner':in ja Kiesel':in kuvaamalla tavalla [J. Clin. Invest. 71 (1983) 1836 - 1841] tai käyttäen muita proteaaseja, joiden spesifisyys on trypsiinityypistä [Kiesel ja Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73 (1983) 29 - 42]. Vaihtoehtoisesti FVII voidaan aktivoida polymeeristen makromolekyylien, kuten polylysiinin, matriksirakenteiden, substituoidun agaroosigeelin tai membraanien, läsnäollessa.

Kokeellinen osa

rFVII puhdistettiin ja aktivoitiin rFVIIa:ksi käyttäen peräkkäisiä kromatografiavaiheita, jotka olivat vaihe 1, anioninvaihto; vaihe 2, immunoaffiniteettikromatografia; vaihe 3, anioninvaihto; vaihe 4, anioninvaihto.

Suoritettiin koesarja, jossa käytettiin sellaisia puhdistuskaavioita, jossa jotkin kaavioista sisälsivät sinkkisuolan lisäämisen kaikkiin puskureihin yhdessä tai useammassa kromatografiavaiheista taulukossa 1 hahmotellulla tavalla.

Koeolosuhteet on esitetty esimerkeissä 2 - 4.

Vertailukoe (E) suoritettiin esimerkin 2 mukaisesti lukuunottamatta sitä, että ei lisätty lainkaan $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$:ta.

Taulukko 1

	Puhdistus- kaavio	Kromatografiavaihe			
		1	2	3	4
5	A	-	+	+	+
	B	-	+	+	-
	C	-	+	-	-
10	E (ver- tailu- koe)	-	-	-	-

+/- tarkoittaa puskureissa olevaa sinkkisuolaa tai tämän puuttumista.

15 Kunkin vaiheen eluaatista määritettiin FVII:n aktivaatiotaso (FVII:n %-määrä) ja FVIIa:n pilkkoutumistuotteiden pitoisuus. FVII:n muuntuminen kaksiketjuiseksi FVIIa-muodoksi määritettiin tavallisella polyakryyliamidielektroforeesilla (PAGE) natriumdodekyylisulfaatissa (SDS) pelkistävissä olosuhteissa yhdistettynä Coomassiesinivärjäykseen ja tulokset kvantitoitiin laserdensitometriä käyttäen.

25 FVIIa:n pilkkoutumistuotteiden pitoisuus kvantitoitiin korkean suorituskyvyn käänteisfaasi-nestekromatografialla (RP-HPLC) butyyllilla sidostetussa silikakolonissa lineaarista asetonitriiligradienttia käyttäen.

30 Tulokset kokeista, jotka suoritettiin olennaisesti esimerkeissä kuvatulla tavalla, on lueteltu taulukossa 2 ja esitetty kuvioissa 2 ja 3. Kuviosta 2 käy ilmi, että sinkki-ionien läsnäollessa (käyrät A, B ja C) ei immunoaffiniteettivaiheen (vaihe 2) aikana eikä anioninvaihtovaiheiden (vaihe 3 ja 4) aikana (käyrät A ja B) tapahtunut lainkaan rFVII:n aktivoitumista tai tämä oli erittäin pientä.

35

Tästä poiketen tapahtui vaiheessa 2 (käyrä E) ja vaiheessa 3 ja 4 (käyrät B, C ja E) sinkki-ionien puuttuessa voimakasta aktivoitumista.

5 Tuloksista käy myös ilmi, että sinkki-ionien vuorovaikutus FVII/FVIIa:n kanssa, mikä aiheuttaa FVII:n aktivoitumiseen kohdistuvan inhibitorisen vaikutuksen, on luonteeltaan käänteinen; koska sen jälkeen kun sinkki-ionit on poistettu sitomalla ne kompleksiksi käyttäen ylimäärin EDTA:a, FVII
10 aktivoituu myöhempien puhdistusvaiheiden aikana (käyrät B ja C).

Vaiheessa 1 ei sinkki-ionien puuttuessa tapahtunut nähtävästi lainkaan aktivoitumista. Tämä saattaa johtua kolonnissa
15 olevasta paljon pienemmästä FVII-konsentraatiosta.

Kaikissa näissä kokeissa käytetty vaiheen 1 eluaatti sisälsi alle 1 % FVIIa:ta.

20 Taulukko 2

Koe	Puhdistus- vaiheet	Zn ⁺⁺	FVII:n %-määrä (SDS-PAGE)	Pilkkoutu- neen FVIIa:n %-määrä (RP-HPLC)
A + B	2	+	94	0
	3	+	92	0
A	4	+	89	<2
	4	-	18	3,6
B	2	+	99	<2
	3	-	69	<2
C	4	-	2	5,0
	2	-	46	3,9
E	3	-	19	4,6
	4	-	4	8,0

Esimerkki 1FVII:n aktivoitumisen inhibitio tämän ollessa kiinnittyneenä anioninvaihtimeen

5 Zn⁺⁺:n vaikutus FVII:n aktivoitumiseen tutkittiin kokeessa, jossa puhdistettu FVII oli adsorboitu Q-Sepharose FF -matriksiin vaihtelevissa Zn⁺⁺-konsentraatioissa. 500 µg FVII:tä inkuboitiin 1,5 ml:n vetoisissa koeputkissa seoksessa, jossa käytettiin 50 µl Q-Sepharose FF:ää liuotettuna 800 µl:aan puskuria, jonka koostumus oli 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM

10 CaCl₂ ja jossa käytettiin vaihtelevia konsentraatioita sinkkiasetaattia. 1 ja 2 tunnin kuluttua matriksi laskeutettiin sentrifugoimalla ja supernatantti poistettiin. Seokseen lisättiin 800 ml puskuria, jonka koostumus oli 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 25 mM CaCl₂ ja jonka pH oli 8, ja kun seosta oli

15 sekoitettu ja se oli sentrifugoitu, otettiin supernatantista näytteitä, joista SDS-PAGE:n avulla analysoitiin FVII/FVIIa.

Tulokset (kuvio 1) osoittivat, että Zn⁺⁺:n puuttuessa 55 % FVII:sta oli aktivoitunut FVIIa:ksi 1 tunnin kuluessa ja yli

20 90 % 2 tunnin kuluttua.

Silloin kun käytettiin 10 µM Zn⁺⁺:aa, ainoastaan 25 % aktivoitui 1 tunnin kuluttua ja ainoastaan 73 % aktivoitui 2 tunnin kuluttua.

25 Sellaisissa Zn⁺⁺-konsentraatioissa, jotka olivat yli 40 µM, ei 2 tunnin aikana tapahtunut lainkaan aktivoitumista.

30 Tämän kokeen perusteella on selvää, että Zn⁺⁺:lla on konsentraatioalueella noin 10 µM - noin 100 µM inhiboiva vaikutus FVII:n aktivoitumiseen anioninvaihtimien läsnäollessa ja on ajateltavissa, että Zn⁺⁺:lla on vaikutus FVII:n aktivointoon kaikissa Zn⁺⁺-konsentraatioissa koko sillä alueella, joka ulottuu alle 10 µM:sta 1 mM:een.

35 Vaikuttaa siltä, että vaihtelemalla Zn⁺⁺-konsentraatiota on mahdollista säännöstellä FVII:n aktivoitumisen nopeusvakiota

ja olennaisesti "suojata" FVII:tä suurissa Zn^{++} -konsentraatioissa aktivoitumiselta ja tästä syystä pilkkoutumiselta.

Esimerkki 2

5 rFVII:n puhdistus ja sen aktivaatio rFVIIa:ksi suoritettiin noudattaen seuraavaa neljää kromatografista vaihetta:

Vaihe 1:

10 rFVII:tä sisältävän soluviljelymediumin ionivahvuus säädettiin laimentamalla arvoon, joka oli alle 10 mS/cm, ja tämä lisättiin Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskuri A:lla, jonka koostumus oli 10 mM trihydroksimetyyliaminometaani (Tris); 150 mM NaCl ja jonka pH oli 8.

15

Pesuvaiheen jälkeen, jossa käytettiin samaan puskuriin valmistettua 175 mM NaCl:ää, rFVII eluoitiin puskurilla B, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM CaCl_2 ja jonka pH oli 8.

20

Vaihe 2:

Eluaattiliuos, joka sisälsi 104 mg/l rFVII:tä, säädettiin lopulliseen koostumukseen, joka oli 10 mM Tris; 1 M NaCl; 25 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5, ja lisättiin Sepharose-kolonneihin, joka sisälsi immobilisoitua monoklonaalista FVII:tä vastaan suunnattua vasta-ainetta.

25

Vasta-ainekolonne oli tasapainotettu etukäteen puskurilla C, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5. Tämän jälkeen kolonne pestiin seoksella, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 2 M NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5 ja tämän jälkeen puskurilla C. Tämän jälkeen rFVII/rFVIIa eluoitiin käyttämällä puskuria, jonka koostumus oli 75 mM Tris; 30 mM trinitriumsitraatti; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5.

35

Vaihe 3:

Eluaatti lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6.

Kolonne pestiin samalla puskurilla ja rFVII/rFVIIa eluoitiin lineaarisella gradientilla, jonka koostumus muuttui puskurista A puskuriin D, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 500 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6.

Vaihe 4:

rFVII/rFVIIa:tä sisältävän fraktion ioninvahvuus säädettiin arvoon alle 10 mS/cm laimentamalla ja tämä lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 150 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6.

Kun kolonne oli pesty puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 175 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6; ja puskurilla E, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6, eluoitiin rFVII/rFVIIa lineaarisella gradientilla, joka muuttui puskurista E puskuriin, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; 15 mM CaCl₂; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6. Virtausnopeus oli 1 kolonnin tilavuus tuntia kohti.

Puhdistetun rFVIIa-preparaatin ominaisuudet olivat:

rFVIIa:n pitoisuus: 345 mg/l määritettynä UV-spektroskopian avulla (OD 280)

vieraisten proteiinien pitoisuus > 1 % RP-HPLC:n avulla määritettynä

rFVII:n pitoisuus: 89 % SDS-PAGE:n avulla määritettynä

rFVIIa:n pilkkoutumistuotteiden pitoisuus: > 2 % RP-HPLC:n avulla määritettynä.

Esimerkki 3

5 rFVII:n puhdistus ja sen aktivointi rFVIIa:ksi suoritettiin käyttäen neljää seuraavaa kromatografista vaihetta:

Vaihe 1:

10 rFVII:tä sisältävän soluviljelymediumin ionivahvuus säädettiin laimentamalla arvoon, joka oli alle 10 mS/cm, ja tämä lisättiin Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskuri A:lla, jonka koostumus oli 10 mM trihydroksimetyyliaminometaani (Tris); 150 mM NaCl ja jonka pH oli 8.

15

Pesuvaiheen jälkeen, jossa käytettiin samaan puskuriin valmistettua 175 mM NaCl:ää, rFVII eluoitiin puskurilla B, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM CaCl_2 ja jonka pH oli 8.

20

Vaihe 2:

25 Eluaattiliuos, joka sisälsi 104 mg/l rFVII:tä, säädettiin lopulliseen koostumukseen, joka oli 10 mM Tris; 1 M NaCl; 25 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5, ja tämä lisättiin Sepharose-kolonneihin, joka sisälsi immobilisoitua monoklonaalista FVII:tä vastaan suunnattua vasta-ainetta.

30 Vasta-ainekolonne oli tasapainotettu etukäteen puskurilla C, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5. Tämän jälkeen kolonne pestiin seoksella, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 2 M NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5 ja tämän jälkeen puskurilla C. Tämän jälkeen rFVII/rFVIIa eluoitiin käyttämällä puskuria, jonka koostumus oli 75 mM Tris; 30 mM trinitriumsitraatti; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5.

35

Vaihe 3:

Eluaatti lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6.

Kolonneista pestiin samalla puskurilla ja rFVII/rFVIIa eluoitettiin lineaarisella gradientilla, jonka koostumus muuttui puskurista A puskuriin D, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 500 mM NaCl; 70 μ M Zn(CH₃COO)₂ ja jonka pH oli 8,6.

Vaihe 4:

rFVII/rFVIIa:tä sisältävän fraktion etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) -pitoisuus säädettiin arvoon 2 mM ja ionivahvuus arvoon, joka oli alle 10 mS/cm, laimentamalla, ja seos lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonneihin, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 150 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6.

Kun kolonneista oli pesty puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 175 mM NaCl; ja puskurilla E, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6, eluoitettiin rFVII/rFVIIa lineaarisella gradientilla, joka muuttui puskurista E puskuriin, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; 15 mM CaCl₂ ja jonka pH oli 8,6. Virtausnopeus oli 1 kolonnin tilavuus tuntia kohti.

Puhdistetun rFVIIa-preparaatin ominaisuudet olivat seuraavat:

rFVIIa:n pitoisuus: 492 mg/l määritettynä UV-spektroskopian avulla (OD 280)

vieraiden proteiinien pitoisuus < 1 % RP-HPLC:n avulla määritettynä

rFVII:n pitoisuus: 18 % SDS-PAGE:n avulla määritettynä

rFVIIa:n pilkkoutumistuotteiden pitoisuus: 3,6 % RP-HPLC:n avulla määritettynä.

5

Esimerkki 4

rFVII:n puhdistus ja sen aktivointi rFVIIa:ksi suoritettiin käyttäen neljää seuraavaa kromatografista vaihetta.

10

Vaihe 1:

rFVII:tä sisältävän soluviljelymediumin ionivahvuus säädettiin laimentamalla arvoon, joka oli alle 10 mS/cm, ja tämä lisättiin Q-Sepharose-kolonnein, joka oli tasapainotettu etukäteen puskuri A:lla, jonka koostumus oli 10 mM trihydroksimetyyliaminometaani (Tris); 150 mM NaCl ja jonka pH oli 8.

15

20

Pesuvaiheen jälkeen, jossa käytettiin samaan puskuriin valmistettua 175 mM NaCl:ää, rFVII eluoitiin puskurilla B, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM CaCl_2 ja jonka pH oli 8.

Vaihe 2:

Eluaattiliuos, joka sisälsi 104 mg/l rFVII:tä, säädettiin lopulliseen koostumukseen, joka oli 10 mM Tris; 1 M NaCl; 25 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5, ja tämä lisättiin Sepharose-kolonnein, joka sisälsi immobilisoitua monoklonaalista FVII:tä vastaan suunnattua vasta-ainetta.

25

30

35

Vasta-ainekolonne oli tasapainotettu etukäteen puskurilla C, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5. Tämän jälkeen kolonne pestiin seoksella, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 2 M NaCl; 20 mM CaCl_2 ; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5 ja tämän jälkeen puskurilla C. Tämän jälkeen rFVII/rFVIIa eluoitiin käyttämällä puskuria, jonka koostumus oli 75 mM Tris; 30 mM trinitriumsitraatti; 70 μM $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ja jonka pH oli 7,5.

Vaihe 3:

Eluaatin etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) -pitoisuus säädettiin arvoon 2 mM ja lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonnein, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 150 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6.

Kolonnein pestiin samalla puskurilla ja rFVII/rFVIIa eluoitiin lineaarisella gradientilla, jonka koostumus muuttui puskurista A puskuriiin D, jonka koostumus oli 10 mM Tris; 500 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6.

Vaihe 4:

rFVII/rFVIIa:tä sisältävän fraktion ionivahvuus säädettiin laimentamalla arvoon, joka oli alle 10 mS/cm, ja se lisättiin välittömästi Q-Sepharose-kolonnein, joka oli tasapainotettu etukäteen puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 150 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6.

Kun kolonnein oli pesty puskurilla, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 175 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6, ja puskurilla E, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; ja jonka pH oli 8,6, eluoitiin rFVII/rFVIIa lineaarisella gradientilla, jonka koostumus muuttui puskurista E puskuriiin, jonka koostumus oli 10 mM glysyyliglysiini; 100 mM NaCl; 15 mM CaCl_2 ja jonka pH oli 8,6. Virtausnopeus oli 1 kolonnin tilavuus tuntia kohti.

Puhdistetun rFVIIa-preparaatin ominaisuudet olivat:

rFVIIa:n pitoisuus: 1,2 mg/l määritettynä UV-spektroskopian avulla (OD 280)

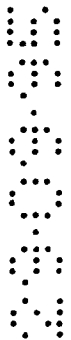
vieraiden proteiinien pitoisuus < 1 % RP-HPLC:n avulla määritettynä

rFVII:n pitoisuus: 1 % SDS-PAGE:n avulla määritettynä

rFVIIa:n pilkkoutumistuotteiden pitoisuus: 6,7 % RP-HPLC:n avulla määritettynä.

.

.



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä hyytymistekijä VII:n kontrolloiduksi aktivoimiseksi ja pilkkomiseksi puhdistuksen aikana, jossa hyytymistekijää VII käsitellään useilla kromatografisilla puhdistusvaiheilla, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä käytetään Zn^{++} :aa ainakin yhdessä puhdistusvaiheista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hyytymistekijä VII:n liuos lisätään useisiin anioninvaihto- ja immunoaffiniteettikromatografiakolonneihin.

3. Patenttivaatimusten 1 - 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Zn^{++} :aa käytetään liukoisen sinkki-suolan muodossa.

4. Patenttivaatimusten 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Zn :ää käytetään konsentraatiossa, joka on noin $10 \mu M$ - noin $1 mM$.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä käytetään Zn^{++} :aa konsentraatiossa, joka on noin $20 \mu M$ - noin $1 mM$.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Zn^{++} :aa käytetään konsentraatiossa, joka on noin $40 \mu M$ - noin $1 mM$.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että FVII-liuos lisätään kromatografiakolonneihin käyttäen järjestystä, joka on: 1) anioninvaihtokolonni; 2) immunoaffiniteettikolonni; 3) anioninvaihtokolonni; 4) anioninvaihtokolonni, ja siitä, että Zn^{++} :ää käytetään ainakin kahdessa vaiheessa.

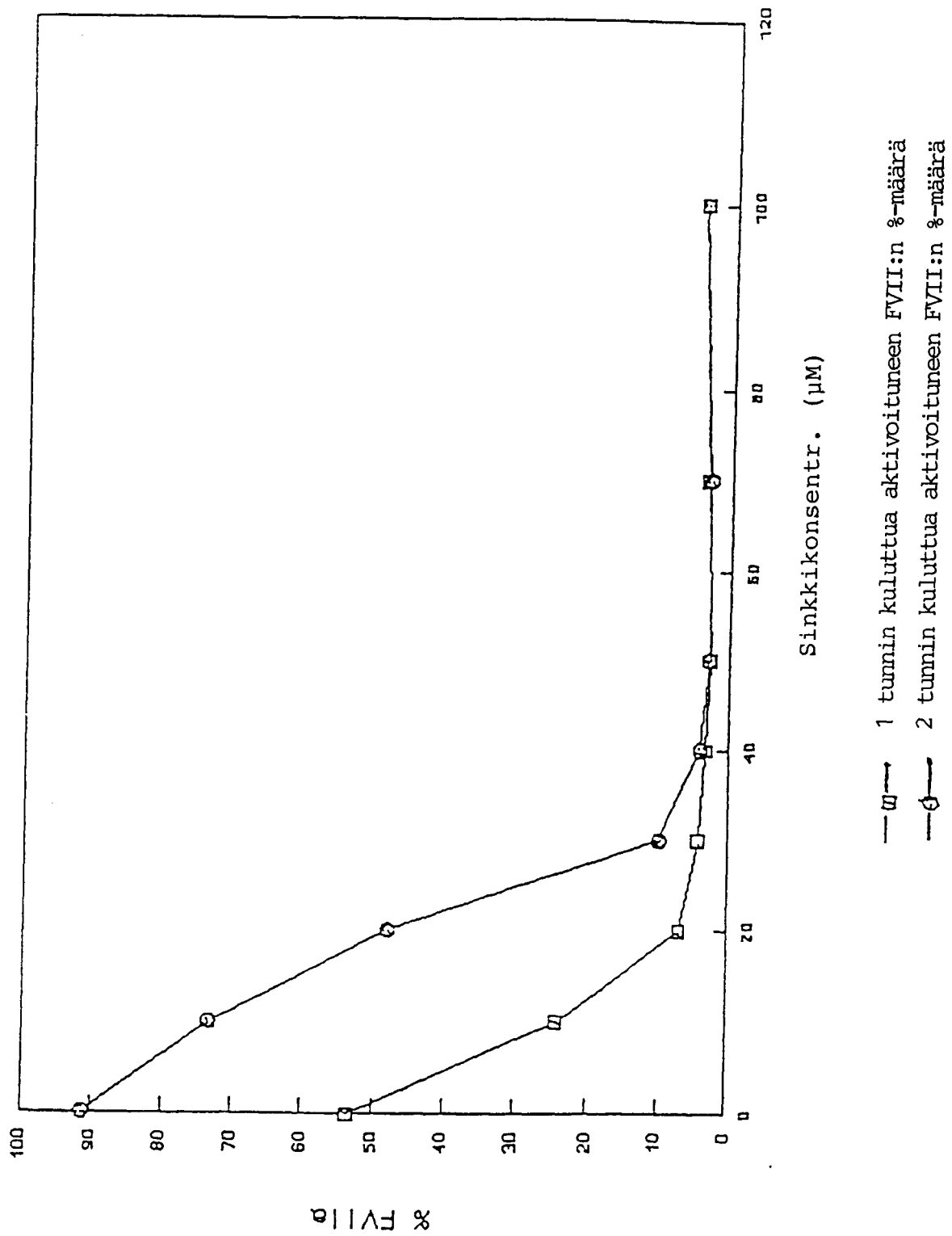


Fig. 1

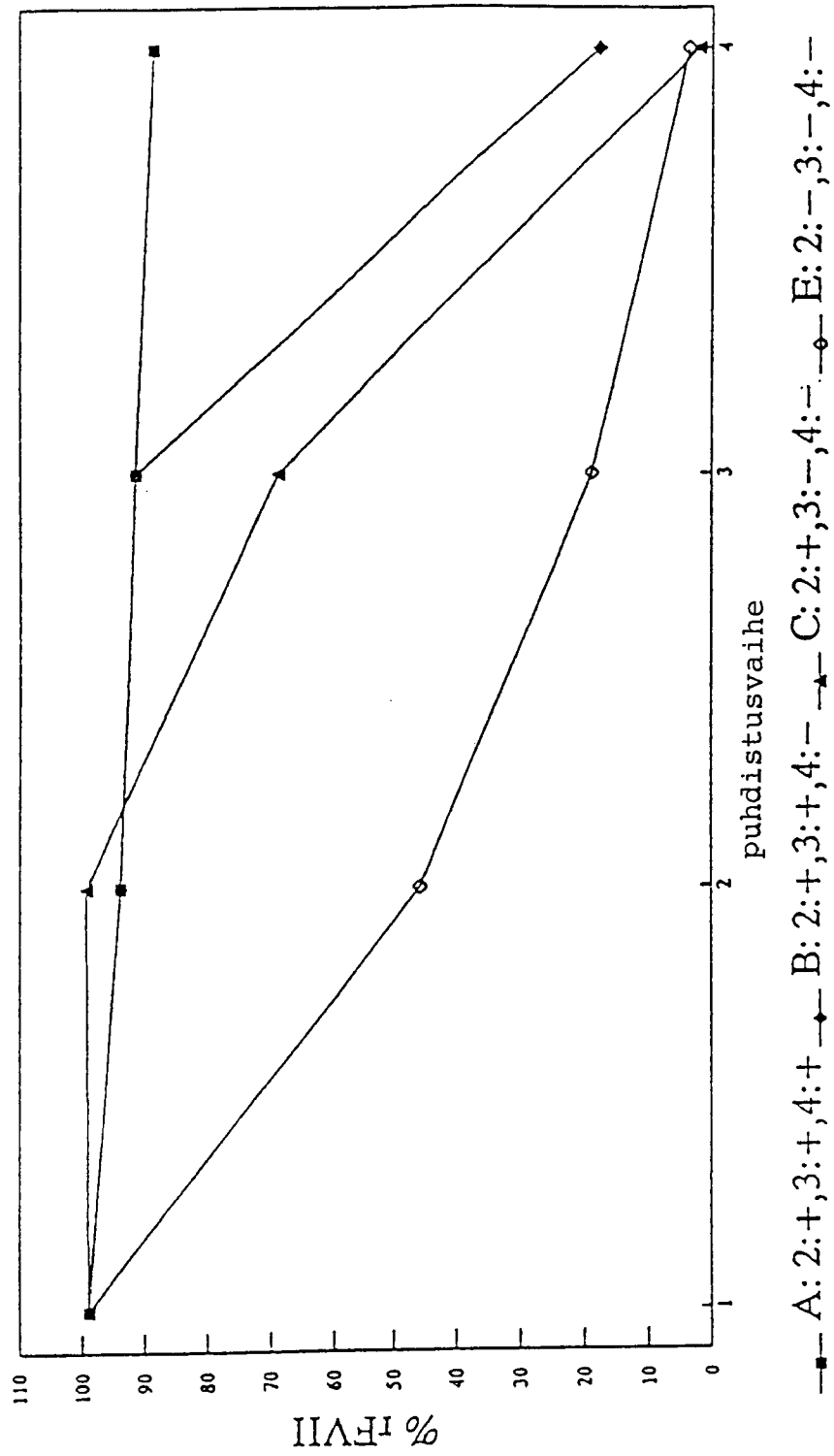


Fig. 2

2003-05-04

Fig. 3

