

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 903366 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **903366**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C07K 3/22
C07K 15/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.10.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.07.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.07.1990**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **19.10.1989 PCT/EP1989/001247**
Internationell ansökan - International
application

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

05.11.1988 EP 88118478

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Octapharma AG, Bankstrasse 7 CH-8750 Glarus, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Smith, Andrew, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaareaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä erittäin puhtaan, ei tartuttavan antihemofiliatekijän valmis tamiseksi kromatografoinnilla
Förfarande för framställning av en mycket ren icke infektiös antihemof ilifaktor genom kromatografi

Menetelmä erittäin puhtaan, ei tartuttavan antihemofilia-
tekijän valmistamiseksi kromatografoinnilla

5 Keksintö koskee menetelmää erittäin puhtaan, infek-
tioita aiheuttamattoman antihemofiliatekijän (AHF eli te-
kijä VIII) valmistamiseksi veriplasmasta käsittelemällä
tekijä VIII:n suhteen rikastettua fraktiota bioyhteensopi-
villa orgaanisilla liuottimilla/detergenteillä ja sitä
seuraavia puhdistusvaiheita.

10 EP-hakemusjulkaisussa O 238 701 kuvataan menetelmää
erittäin puhtaan, infektiota aiheuttamattoman antihemofi-
liatekijän valmistamiseksi, jolloin esikäsitellyt fraktiot
ovat kryopresipitaattina ja ne vapautetaan etanolisaostuk-
sen avulla fibrinogeenistä, globuliineista, albumiineista
15 ja muista häiritsevistä aineosista. Rikastus kryopresipi-
taatista on välttämätöntä, koska materiaalissa on tekijää
VIII vain äärimmäisen pieninä määrinä. Tämä rikastusvaihe
vaikuttaa kuitenkin haitallisesti AHF:n pitoisuuteen lop-
putuotteessa. Tähän asti käytävissä olevilla menetelmil-
20 lä tekijä VIII:n valmistamiseksi saadaan vain pieniä mää-
riä vaikuttavaa ainetta. Käyttämällä tähänastisilla ta-
voilla valmistettua tekijää VIII potilasta kuormitetaan
sen vuoksi suurilla määrillä antigeenisia aineita. Tämä
menetelmänvaihe ei ole varma. Sen vuoksi on tehty runsaas-
25 ti yrityksiä rikastaa tekijä VIII erotusmenetelmien avul-
la. On yritetty saada affiniteetikromatografian avulla
tekijän VIII vastaisilla eläinalkuperää olevilla vasta-
aineilla tuotteita, joilla on suurempi ominaisaktiivisuus.
Tämä menetelmä on kuitenkin hyvin kallis ja suurikustan-
30 nuksinen. Toisaalta se ei ole myöskään vaaraton, koska jo-
kaisessa kromatografisessa erotuksessa pylvästä pestään
tietty määrä eläinperäistä valkuaisainetta.

35 EP-patenttihakemuksessa 88 108 458.6 ehdotetaan
kryopresipitaation virusinaktivoinnin jälkeen suoritetta-
vaksi kromatografista erottamista ioninvaihtimien avulla.

Tämä tosin johtaa saannon kohoamiseen valmistettaessa tekijää VIII, mutta siihen liittyy kryopresipitaatio. Kryopresipitaation menetelmänvaihe on haitallinen, koska silloin ei saavuteta veriplasmassa olevan tekijä VIII:n
5 kvantitatiivista saostumista, niin että täytyy ottaa huomioon suuret saantohäviöt.

Keksinnön perustana on tehtävä saada aikaan menetelmä erittäin puhtaan, bioyhteensopivilla orgaanisilla liuottimilla/detergenteillä käsittelemällä saatavan infek-
10 tioita aiheuttamattoman antihemofiliatekijän (AHF eli tekijä VIII) valmistamiseksi veriplasmasta, niin että saanto on hyvä ja biologinen aktiivisuus proteiinin painoyksikköä kohti on suuri. Toisena tehtävänä on välttää kryopresipitaatio.

15 Tämä tehtävä voidaan yllättävästi ratkaista yksinkertaisella tavalla niin, että tekijällä VIII rikastettu fraktio saadaan kromatografisella menetelmällä.

Eräässä keksinnön mukaisen menetelmän edullisessa suoritusmuodossa saavutetaan suurempi tekijän VIII saanto,
20 kun tekniikan tason mukaisen kryopresipitaation sijasta suoritetaan geelipermeaatiokromatografointi ioninvaihtomateriaaleilla. Tällöin pakastettu plasma sulatetaan vesihauteessa. Niin pian kuin on saavutettu tietty lämpötila, joka on edullisesti 25 °C, plasma laimennetaan edullisesti
25 50 tilavuusprosentilla vettä ja suodatetaan. Sen jälkeen näin käsitellylle plasmalle suoritetaan geelipermeaatiokromatografointi ioninvaihtomateriaalilla kuten esimerkiksi Fractogel^R-DEAE-hartsilla. Fractogel^R on hydrofiilinen kromatografointimateriaali, joka perustuu oligoetyleeniglykolien, glysidyylimetakrylaattien ja pentaerytrolidimetakrylaattien kopolymeraatteihin. Pylväässä oleva erot-
30 tava materiaali tasapainotetaan etukäteen glysiiniä, natriumsitraattia, natriumkloridia ja hepariinia sisältävällä puskurilla. Puskurilla on edullisesti seuraava koostumus:
35 10 - 50 mM natriumkloridia, 2 - 18 mM natriumsitraattia,

30 - 210 mM glysiiniä ja 20 - 180 U/l hepariinia. Tällä puskurilla saavutetut ionivahvuusolosuhteet johtavat siihen, että tekijä VIII adsorboituu pylväsmateriaaliin. Muut veriplasman aineosat erottuvat pesemällä muutamalla pylvääntilavuudella kantajapuskuria, jonka pH-arvo on 6,5 - 6,9.

Sen jälkeen muutetaan puskuriolosuhteita kohottamalla suolapitoisuutta, edullisesti keittosuolapitoisuutta. Tämä voi tapahtua keskeytymättömästi tai jaksoittain. Edullisesti natriumkloridipitoisuutta kohotetaan edellä esimerkkinä esitetyssä puskurisysteemissä kolmessa vaiheessa arvoihin 20 - 80 mM, 30 - 180 mM ja 40 - 360 mM. Pylväsmateriaali pestään useita kertoja suuremman suolapitoisuuden omaavilla puskureilla, jolloin epäpuhtaudet poistuvat. Tekijä VIII eluoituu silloin suurina ionivahvuuksina.

Tekijän VIII sisältävä fraktio otetaan talteen ja stabiloidaan lisäämällä ihmisalbumiinia. Edullisesti ihmisen seerumalbumiinin (HSA) pitoisuus on 1 mg/ml. Sen jälkeen liuos voidaan käsitellä alumiinihydroksidilla protrombiinikompleksitekijöiden jäännösten poistamiseksi. Sen jälkeen suoritetaan suodatus.

Virusinaktivointi suoritetaan menetelmällä, jota kuvataan EP-hakemusjulkaisussa 131 740, käsittelemällä bioyhteensopivilla orgaanisilla liuottimilla/detergenteillä, edullisesti Tween/TNBP (tri-n-butyylifosfaatti). Hyviä tuloksia saavutetaan myös natriumkolaatilla TNBP:llä.

Keksinnön eräässä toisessa edullisessa suoritustavassa saavutetaan suurempi tekijän VIII saanto ominaisaktiivisuuden ollessa suurempi suorittamalla virusten poistamisen jälkeen näytteelle geelipermeaatiokromatografointi ioninvaihtomateriaaleilla.

Virusten inaktivoinnin jälkeen käsittelemätön fraktio voidaan laimentaa ja suodattaa.

K. Woods ja Th. Orme kuvaavat EP-hakemusjulkaisussa 0 239 859, että on edullista virusten poistamisen tai in-

aktivoinnin jälkeen ja ennen kromatografista erotusta uut-
taa näytettä öljyillä, edullisesti soijaöljyllä, risiini-
öljyllä ja/tai puuvillansiemenöljyllä.

Sellaisessa tapauksessa, että lähtöaineena ei käy-
5 tetä sulatettua tai tuoretta veriplasmaa vaan kaupallista
kryopresipitaattia, on edullista menetellä seuraavalla
tavalla: kaupallinen kryopresipitaatti sulatetaan huoneen-
lämpötilassa 3 - 4 tunnin aikana ja jaetaan noin 1 - 2
cm:n palasiin. Nämä palaset suspendoidaan lämpötiloissa
10 10 - 25 °C sekoittamalla noin kaksinkertaiseen tilavuuu-
teen vettä, joka sisältää 1 - 3 U/ml hepariini-natriumia.
Suspension pH säädetään 0,1 M etikkahapolla vähintään ar-
voon 7,0 - 8, edullisesti 7,0 - 7,1. Sekoitetaan 15 - 60
15 min, edullisesti 30 min huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen
lisätään noin 108 g 2-prosenttista alumiinihydroksidibus-
pensiota kilogrammaa kohti kryopresipitaattia ja sekoite-
taan 1 - 10 min, edullisesti 5 min huoneenlämpötilassa.
Hapolla, edullisesti 0,1 M etikkahapolla, happopitoisuus
säädetään pH-arvoon 6,0 - 7,0, edullisesti 6,5 - 6,6. Näy-
20 te jäädytetään lämpötilaan 10 - 18 °C, edullisesti 14 -
16 °C. Sentrifugoidaan tässä lämpötilassa, esimerkiksi
Sharples AS-16 (Cepa 61) -sentrifuugissa käyttäen nopeutta
1,0 l/min. Sen jälkeen suoritetaan ylitteen suodatus esi-
merkiksi käyttäen Pall AB-1 U010ZP -suodatinta. Sentrifu-
25 goinnin ja suodatuksen jälkeen seuraa edullisesti virusten
inaktivointi. Erityisen edulliseksi on osoittautunut vi-
rusten inaktivointi Tween/TNBP:n (tri-n-butyylifosfaatti)
avulla. Hyviä tuloksia saavutetaan myös natriumkolaatti/
TNBP:llä. Tween/TNBP tai natriumkolaatti/TNBP-seos voidaan
30 taas poistaa esimerkiksi öljyuuton avulla.

Virusten inaktivoinnin jälkeen näyte siirretään
kromatografiapylvääseen, jossa on geelipermeaatiomateriaa-
lia, jolla on ioninvaihtoaktiivisuutta, kuten esimerkiksi
Fractogel^R-DEAE. Pylvään kapasiteetin tulee olla sellai-
35 nen, että pylväässä on 1 kilogrammaa kohti kryopresipi-

taattia 0,5 kg pylväsmateriaalia. Näyte syötetään pylväseen ja pestään puskurilla. Näytteen eluoinnin jälkeen puskurilla, jolla on suurempi ionivahvuus, saatu tuote laimennetaan tarvittaessa matalamman suolapitoisuuden omaavalla puskurilla pH-arvoon 6,5 - 7,5, edullisesti 6,9 - 7,1. Sen jälkeen suoritetaan vielä suodatus edullisesti nitroselluloosasuodattimilla, minkä jälkeen suoritetaan steriilisuodatus.

Käyttämällä keksinnön mukaisia toimenpiteitä on ollut ensimmäistä kertaa mahdollista valmistaa saannon ollessa suuri erittäin puhdasta antihemofiliatekijää, jolla on tähän asti saavuttamaton ominaisaktiivisuus. Tähänastiset tulokset osoittavat, että käyttämällä tähän asti tavallista etanolisaostusta tai kryopresipitaatiota tuhoetaan huomattava osa tekijästä VIII irreversiibelisti.

Keksintöä selvennetään lähemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Tuoretta tai pakastettua ihmisplasmaa temperoidaan mahdollisesti vesihauteessa, kunnes seoksen lämpötila on saavuttanut arvon 20 °C. Plasma laimennetaan 50 tilavuusprosentilla vettä ja sen jälkeen suodatetaan. Plasmasuodos siirretään ioninvaihtopylväeseen, jossa on Fractogel^R-DEAE-hartsia. Pylväs oli tasapainotettu etukäteen seuraavan koostumuksen omaavalla puskurilla:

50 mM natriumkloridia
 10 mM natriumsitraattia
 120 mM glysiiniä
 100 U/l hepariinia pH 6,5 - 6,9

Näytteen kaatamisen jälkeen ioninvaihtohartsia pestään useita kertoja puskurin vesiliuoksella. Sen jälkeen kohotetaan asteittain keittosuolan pitoisuutta pesemällä ensin puskurilla, joka sisältää 100 mM natriumkloridia, sen jälkeen 160 mM natriumkloridia ja sitten 200 mM natriumkloridia. Tekijän VIII sisältävät fraktiot kootaan ja

stabiloidaan lisäämällä ihmisen seerumialbumiinia 1,0 mg/ml. Jatkokäsittely suoritetaan seuraavien esimerkkien mukaisesti, kuitenkin niin että niissä käytetyn kaupallisen kryopresipitaatin sijasta käytetään tekijän VIII sisältäviä pylväsfraktioita.

5

Esimerkki 2

Tekijä VIII:n rikastus

Kaupallista kryopresipitaattia sulatetaan huoneenlämpötilassa 3 - 4 tunnin ajan ja jaetaan suuruudeltaan n. 1 - 2 cm:n kappaleisiin. Nämä kappaleet suspendoimaan sekoittamalla lämpötilassa 20 - 25 °C ja suspendoidaan noin kaksinkertaiseen tilavuuteen vettä, joka sisältää 2 U/l hepariini-natriumia. Suspension pH säädetään 0,1 M etikkahapolla arvoon 7,0 - 7,1. Sekoitetaan 30 min lämpötilassa 20 - 25 °C. Lisätään 108 g 2-prosenttista alumiinihydroksidisuspensiota yhtä kilogrammaa kohti kryopresipitaattia ja sekoitetaan edelleen 5 min huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen pH säädetään 0,1 M etikkahapolla arvoon 6,5 - 6,6. Sen jälkeen näyte jäädytetään lämpötilaan 14 - 16 °C, sentrifugoidaan Sharples AS-16 (Cepa 61) -sentrifuugissa käyttäen nopeutta 1,0 l/min. Ylite suodatetaan Pall AB-1 U010ZP -suodattimen läpi.

15

20

Esimerkki 3

Kromatografiapylvään esivalmistelu kromatografointia varten virusten raakafraktiosta poistamisen jälkeen

25

Uutetun kryopresipitaatin erottamiseksi käytetään pylvästä, jossa on vähintään 0,5 l Fractogel^R-DEAE -hartsia yhtä kilogrammaa kohti kryopresipitaattia. Pylvään korkeuden tulee olla \leq halkaisija. Kun hartsi on laitettu pylvääseen, kromatografiapylvästä pestään 5-kertaisella tilavuudella 0,1 M natriumkloridiliuosta. Sen jälkeen pestään puskurilla A, jolla on seuraava koostumus:

30

110 mM natriumkloridia, 10 mM natriumsitraatti-5H₂O, 120 mM glysiiniä, 1 mM kalsiumkloridi-2H₂O, pH säädetään arvoon 6,9 - 7,0 1 M HCl:llä.

35

Kaikkien puskureiden täytyy olla viruksettomia, koska seuraavat vaiheet suoritetaan käyttäen kryopresipitaatin viruksettomia uutteita.

Esimerkki 4

5 Näyte kaadetaan pylvääseen ja läpi virtaavan liuoksen absorptiota tarkkaillaan aallonpituudella 280 nm. Suodos otetaan talteen ja tutkitaan tekijä VIII:n aktiivisuuden suhteen, samoin kuin tehdään pylväserotuksen tuotteelle. Sen jälkeen pylväs pestään puskurilla A, kunnes absorptio saavuttaa jälleen lähtöarvon. Sen jälkeen pylvästä 10 pestään puskurilla B. Tätä tehdään niin kauan, että absorptio on jälleen saavuttanut perustason.

Puskurilla B on seuraava koostumus:

15 160 mM natriumkloridia, 10 mM natriumsitraatti-5H₂O, 120 mM glysiiniä, 1 mM kalsiumkloridi-2H₂O, pH-arvo 6,9 - 7,0.

Tuotteen eluointi suoritetaan puskurilla C. Puskurin C lisäyksen jälkeen tuleva proteiinifraktio kerätään. Puskurilla C on seuraava koostumus:

20 250 mM natriumkloridia, 20 mM natriumsitraatti-5H₂O, 80 mM glysiiniä, 16 mM lysiiniä, 2,5 mM kalsiumkloridi-2H₂O, pH-arvo 6,9 - 7,0.

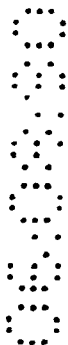
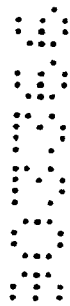
Halutun fraktion eluoinnin jälkeen pylväs pestään lopuksi 5-kertaisella tilavuudella puskuria D, joka sisältää 1 M natriumkloridiliuosta. 25

Pylvään regenerointi suoritetaan pesemällä 0,1 N NaOH:lla (2 pylvään tilavuutta), sen jälkeen pesemällä pylväs 0,1 N suolahapolla (3 pylvään tilavuutta) ja pesemällä pylväs 5 pylvään tilavuudella 25-prosenttista alkoholin vesiliuosta. 30

Esimerkki 5

Koottuja fraktioita laimennetaan niin kauan puskurilla E, jonka koostumus on 20 mM natriumsitraattia, 80 mM glysiiniä, 16 mM lysiiniä, 2,5 mM kalsiumkloridi-2H₂O, pH-arvo 6,9 - 7,1, kunnes sen aktiivisuus on 26 - 35 U/ml. 35

Sen jälkeen pH säädetään tarvittaessa arvoon 6,9 - 7,1, minkä jälkeen suoritetaan tuotteen suodatus 0,45 µm:n Sealclean-suodattimen läpi. Sen jälkeen suoritetaan toinen steriilisuodatus.



Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä erittäin puhtaan, infektiota aiheuttamattoman antihemofiliatekijän (AHF eli tekijä VIII) valmistamiseksi veriplasmasta käsittelemällä tekijän VIII suhteen rikastettua fraktiota bioyhteensopivilla orgaanisilla liuottimilla/detergenteillä ja sen jälkeisillä muilla puhdistusvaiheilla, t u n n e t t u siitä, että tekijän VIII suhteen rikastettu fraktio saadaan käyttäen kromatografista menetelmää.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografinen menetelmä on ioninvaihtimiin perustuva geelipermeaatiokromatografinen menetelmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ioninvaihtomateriaali on anioninvaihtohartsia kuten DEAE-modifioitua materiaalia.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tekijän VIII sisältävä sisältävä fraktio sekoitetaan alumiinihydroksidisuspension kanssa ja lämpötilaan 10 - 18 °C jäädyttämisen jälkeen ja pH:n säätämisen jälkeen arvoon < 7 sentrifugoidaan tai suodatetaan.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tekijän VIII sisältävän fraktion jatkokäsittely suoritetaan kromatografisen menetelmän avulla.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografinen menetelmä on ioninvaihtimiin perustuva geelipermeaatiokromatografinen menetelmä.

7. Patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografointimateriaali on anioninvaihtomateriaali kuten DEAE-modifioitu materiaali.

8. Tekijän VIII sisältävä raakafraktio, joka on valmistettu erottamalla veriplasma kromatografisen menetelmän avulla.

5 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen tekijän VIII sisältävä raakafraktio, t u n n e t t u siitä, että kromatografinen menetelmä on ioninvaihtimiin perustuva geelipermeaatiokromatografisen menetelmä.

10 10. Ioninvaihtimiin perustuvien geelipermeaatiokromatografiaan tarkoitettujen materiaalien kuten DEAE-modifioitujen materiaalien käyttö tekijän VIII sisältävien fraktioiden valmistukseen veriplasmasta.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en högren, icke-infektiös antihemofiliafaktor (AHF eller faktorn VIII) ur blodplasma genom behandling av en på faktorn VIII anrikad fraktion med biokompatibla organiska lösningsmedel/tvättmedel och anslutna ytterlibare reningssteg, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den på faktorn VIII anrikade fraktionen utvinns genom ett kromatografiskt förfarande.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det kromatografiska förfarandet är ett gelpermeationskromatografiförfarande på basis av jonbytare.
3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e - t e c k n a t därav, att jonbytarmaterialet är ett anjonbytarharts, såsom ett DEAE-modifierat material.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att den faktorn VIII innehållande fraktionen blandas med en aluminiumhydroxid-suspension centrifugeras eller filtreras efter avkylning från 10 till 19 °C vid ett pH < 7.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att upparbetningen av den faktorn VIII innehållande fraktionen sker genom ett kromatografiskt förfarande.
6. Förfarande enligt patentkraven 5, k ä n n e - t e c k n a t därav, att det kromatografiska förfarandet är ett gelpermeationskromatografisk förfarande på basis av jonbytare.
7. Förfarande enligt patentkravet 5 eller 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att kromatografimaterialet är en anjonbytar material, såsom ett DEAE-modifierat material.
8. Råfraktion, vilken innehåller faktorn VIII och framställts genom separering av blodplasma genom ett kro-

matografiskt för farande.

9. Råfraktion enligt patentkravet 8 och innehållande faktorn VIII, k ä n n e t e c k n a d därav, att det kromatografiska förfarandet är ett gelpermeationskromatografiskt förfarande på basis av jonbytarharts.

10. Användning av material för gelpermeationskromatografi på jonbytarbasis, såsom DEAE-modifierade material, för framställning av blodplasmafraktioner, som innehåller faktorn VIII.

