

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 162896 B

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5751/84

(51) Int.Cl.5

C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 04 dec 1984

A 61 K 35/16

(41) Alm. tilgængelig: 06 jun 1985

C 07 K 3/18

(44) Fremlagt: 23 dec 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 dec 1983 US 557805

(71) Ansøger: \*ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY; 303 South Broadway; Tarrytown; New York, US

(72) Opfinder: Godfrey A. \*Amphlett; US, Michael E. \*Hrinda; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til oprensning af factor VIII:C samt farmaceutisk præparat indeholdende denne

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag

5751-84

Faktor VIII:C oprenses ved chromatografisk adsorption på aminohexylsægarose ved et pH over 5,5 op til ca. 8, fortrinsvis 6,5 - 7,2, og en ledningsevne på ca. 25 til ca. 35 mS/cm. Der opnås et renere produkt i et større udbytte.

Den foreliggende opfindelse angår oprensningen af det prokoagulerende stof faktor VIII:C fra råmateriale, såsom plasma eller cryoprecipitat, som indeholder antihæmofil faktor (heri kaldt "AHF").

5

Det er en almindelig opfattelse på området, at AHF i sin naturlige form som opnået fra plasma består af aggregater af to molekylenheder, som benævnes faktor VIII:R og VIII:C. Faktor VIII:C er biologisk aktiv ved korrigerende af koaguleringsdefekt for hæmofilia A. Derimod er faktor VIII:R, der også er kendt som faktor VIII:WF (von Willebrand faktor), biologisk aktiv til korrigerende af koaguleringsdefekten ved von Willebrand's sygdom, en blodpladeaggregeringsfejl. Det er yderst ønskeligt at være i stand at rense faktor VIII:C med hensyn til faktor VIII:R og de øvrige plasmaproteiner, med hvilke faktor VIII:C sædvanligvis findes, herunder især fibronectin og fibrinogen.

10

15

Tidligere kendte processer til oprensning af faktor VIII:C indfører tab af udbytte og/eller renhed, som hidtil har været tolereret. Den foreliggende opfindelse giver højere rensningsgrader og højere udbytte uden deaktivering på en måde, som ikke er foreslået i den kendte teknik.

20

25

D.E.G. Austen, "The Chromatographic Separation of Factor VIII on Aminoethyl Sepharose", i British Journal of Hematology, 1979, (43) 669-674, beskriver en chromatografisk adskilleelsesproces, i hvilken human faktor VIII koncentrat eller svinefaktor VIII koncentrat blev passeret gennem en søjle af 6-amino-n-hexylsubstitueret agarose. Søjlen og alle elueringsopløsninger havde et pH på 5,5. Der blev opnået en høj separationsgrad af faktor VIII:C fra faktor VIII:R og en høj rensningsgrad for faktor VIII:C fra andre proteiner. Den totale udvinding af human faktor VIII:C var imidlertid kun 35-40%, og for svinefaktor

30

35

VIII:C var den kun 24-30%. Forfatterne indikerer, at sure pH-værdier i pufferne (ned til pH ca. 5,2) favoriserer højere rensning af faktor VIII, og de valgte med vilje pH 5,5 for at have et så surt miljø som muligt uden  
5 at få et for lavt udbytte. Der er således ud fra denne litteratur en fordom mod at anvende højere (dvs. mindre sure) pH-værdier.

Adskillige nyere publikationer har fortsat med at insistere på at opretholde et surt pH i den chromatografiske søjle. Morgenthaler, "Chromatography of Antihemophilic Factor on Diaminoalkane- and Aminoalkane-Derivatized Sepharose", *Thromb. Haemostas.* 47(2) 124-127 (1982), fandt, at når AHF blev chromatograferet på Sepharose CL-2B agarosegel ved pH-værdier på 6,0, 6,5 og 7,0, kunne der ikke  
10 opnås nogen adskillelse af faktor VIII:C og VIII:R af betydning. Chromatografi af AHF ved pH 5,5 gav en meget mærkbar separation mellem faktor VIII:C og VIII:C. Ifølge en endnu nyere litteratur, Faure et al., Note, "Improved  
15 buffer for the chromatographic Separation of Factor VIII coagulant", *J. Chromatography* 257 (1983), 387-391, opret holder man den af Austen angivne pH-værdi på 5,5 og forsøger at forbedre udbyttet af den chromatografiske procedure ved tilsætning af forbindelser til pufferne. Austen  
20 fortsætter i et forsøg på at forbedre de resultater, der er anført i hans ovennævnte artikel, med at operere ved en pH-værdi på 5,5 og opnår et udbytte af faktor VIII:C på ca. 40%, Austen et al., "Factor VIII Fractionation on Aminoethyl Sepharose with Possible Reduction in Hepatitis  
25 B Antigen", *Thromb. Haemostasis*, 48(1), 46-48 (1982).  
30

Så vidt vides, er faktor VIII:C kun blevet påført en søjle ved et pH nærmere det neutrale i det tilfælde, hvor faktor VIII:R og et stort antal af de øvrige forurenin  
35 ger, herunder fibronectin og fibrinogen, allerede er blevet skilt fra faktor VIII:C. Specifikt anvender Zimmerman et al., ifølge US patentskrift nr. 4 361 509 en søjle,

der bærer monoklonale antistoffer mod faktor VIII:R, til  
udvinding af en fortyndet opløsning af faktor VIII:C, der  
er blevet ultrarensset for faktor VIII:R. Opløsningen af  
ultrarensset faktor VIII:C koncentrerer ved indstilling af  
5 pH til 6,8 med puffer, påføring af opløsningen til en  
søjle af aminohexylagarose og derpå eluering af faktor  
VIII:C fra søjlen. Dette koncentreringsstrin starter ud  
fra materiale, som er ca. 1000 gange så rent som udgangs-  
materialet, og foreslår således ikke, hvilke resultater,  
10 der kunne opnås, hvis væsentlige mængder VIII:R var til  
stede; det er faktisk således, at hvis man har læst dette  
patentskrift og blev præsenteret for råmateriale indehol-  
dende både faktor VIII:C og faktor VIII:R ville man an-  
vende den yderst effektive monoklonale antistof-søjlese-  
15 parationsteknik til fjernelse af faktor VIII:R. Læren fra  
det nævnte patentskrift i henseende til betingelserne for  
anvendelse aminohexylagarosesøjlen kontraindikerer eller  
modificerer således ikke læren af de i det følgende nævn-  
te artikler.

20 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen giver den fordelagtige  
kombination af udbytte og rensning under betingelser, der  
ifølge den hidtil kendte teknik er fuldstændigt uventede  
og faktisk angivet som ufavorable.

25 Opfindelsen angår specielt en fremgangsmåde til oprens-  
ning af faktor VIII:C i højt udbytte fra råmateriale in-  
deholdende faktor VIII:C og faktor VIII:R, hvilken frem-  
gangsmåde er ejendommelig, ved at man

30 (a) tilvejebringer en vandig opløsning af råmateriale,  
som har en pH-værdi på 5,5-8,0 og en ledningsevne på  
25-35 mS/cm,

35 (b) adsorberer faktor VIII:C og faktor VIII:R fra opløs-  
ningen over på aminohexylagarose,

(c) eluerer faktor VIII:R fra aminoexylagarosen og derpå

(d) eluerer faktor VIII:C fra aminoexylagarosen, hvorved man opnår en opløsning af faktor VIII:C, som er oprenset med hensyn til råmaterialet.

5  
10 Råmaterialet egnet til anvendelse i den foreliggende opfindelse omfatter et vilkårligt materiale indeholdende faktor VIII:C med et eller flere plasmaproteiner. Særlige eksempler er materialer, som indeholder faktor VIII, dvs. komplekset af faktor VIII:C og VIII:R, såsom plasma, i handelen tilgængelige faktor VIII koncenterter og cryo-precipitat opnået fra plasma såvel som produktfraktioner og på anden måde kasserede sidefraktioner fra den velkendte Cohn-fraktioneringsproces. Der kan behandles hu-  
15 mant råmateriale såvel som materiale fra køer og svin. Proteiner ud over faktor VIII:R, der kan være til stede, omfatter fibrinogen, fibronectin og albumin.

20 Når cryoprecipitat er udgangsmaterialet, må det rekonstitueres i en vandig puffer på en måde, der er almindeligt kendt for fagmanden på området, idet man må iagttage det nye pH-område og den ionstyrke, der skal anvendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse. Plasma og plas-  
25 makoncenterter er allerede på en hensigtsmæssig form til påføring på en søjle med undtagelse af de stoffer, hvis pH og ionstyrke må indstilles på passende måde ved hjælp af en vandig puffer.

30 pH kan indstilles ved tilsætning af en vandig opløsning af forbindelser, som pufferer pH for den resulterende opløsning til et sted i det ønskede område 6,5-7,2, og som ikke forstyrrer aktiviteten af faktor VIII:C. Mange sådanne opløsninger er kendte for fagmanden; et eksempel er  
35 en pufferopløsning indeholdende 20 mM imidazol, 0,1 M lysin og 0,02% natriumazid (i det følgende kaldt "Buffer A"), som pufferer pH til ca. 6,8. Et andet eksempel er 10

mM histidin, 0,1 M lysin og 0,02 vægt-% natriumazid.

5 Ledningsevnen kan indstilles ved ganske enkelt at tilsætte natriumchlorid i en tilstrækkelig mængde, således at den samlede ledningsevne sammen med ledningsevnen af de allerede tilstedeværende ioner kommer til at ligge mellem ca. 25 mS/cm og ca. 35 mS/cm (milli-Siemens pr. cm, svarende til  $10^{-3}$  mhos/cm). Natriumchlorid kan tilsættes som et fast stof eller som en vandig opløsning til pufferopløsning eller direkte til faktor VIII:C kildeopløsningen. 10 Hvis ledningsevnen er for høj eller for lav, mistes bindingskapacitet, og hvis den er for lav, nedsættes endvidere produktets renhed.

15 Det i søjlen anvendte adsorptionsmateriale er aminohexylagarose. Det er, som det er velkendt i teknikken, agarose med omega-aminosidekæder. Der må være tilstrækkeligt med sidekæder til at tillade den ønskede oprensning at finde sted. Fordelagtigt må der være mindst ca. 10  $\mu$ mol aminohexylsidekæder pr. g agarose, og mere fordelagtigt mindst 20 ca. 15  $\mu$ mol/g. Mængder af adsorptionsmiddel er angivet i den foreliggende beskrivelse og kravene som vådvægten, defineret som vægten af materiale, der er blevet filterret under sugning til det punkt, hvor filterkagen knækker. Tilfredsstillende aminohexylagarose er tilgængelig i 25 handelen under handelsnavnet "Aminohexyl Sepharose", forhandlet af Pharmacia Fine Chemicals Company, og det har ca. 12  $\mu$ mol aminohexylkæder pr. g materiale.

30 Adsorptionsmidlet fremstilles ved ligevægtsindstilling deraf, dvs. vask deraf i en puffer til opnåelse af et pH derfor på over 5,5 op til ca. 8,0, foretrukket 6,0 til 7,5, særligt foretrukket 6,5 til 7,2. Forholdet mellem råmateriale og adsorptionsmiddel må helst ikke overskride 35 kapaciteten af adsorptionsharpiksen, som er en værdi, der let kan bestemmes af en fagmand, der er kendt med chromatografiske adskillelser. Almindeligvis er kapaciteten 5-

10 VIII:C enheder pr. g harpiks, når der anvendes cryo-precipitat, og adskillige gange højere, når der anvendes mere rensat råmateriale. Adsorptionen kan udføres batch-  
vis eller på en søjle, idet man i hvert tilfælde anvender  
5 teknik og udstyr, der er sædvanligt på dette område til chromatografiske adskillelser af denne type.

Råmaterialet, som allerede separat er blevet indstillet til samme pH som adsorptionsmidlet, bringes sammen med  
10 adsorptionsmidlet, idet man giver tilstrækkelig kontakt-tid til, at de ønskede protein-adsorptionsmiddelinteraktioner kan foregå. Ved udførelse på søjle er typiske tilfredsstillende strømningshastigheder ca. 5 søjlevolumener pr. time, men ikke så høj hastighed, at søjlen trykkes  
15 sammen eller ødelægges. Det materiale, der passerer gennem søjlen først i dette trin, vil være blevet reduceret i indhold af faktor VIII:C samt indhold af faktor VIII:R, hvis faktor VIII:C i råmaterialet var til stede kompleksdannet med faktor VIII:R. Fjernelsen af ikke-adsorberet  
20 materiale kan lettes ved vask af søjlen med pufferopløsning, såsom Buffer A indeholdende 0,3 M NaCl.

Efter vask af massen af ikke-adsorberet materiale fra søjlen (som indikeret ved en absorbans ved 280 nm af  
25 eluatet på 1 eller mindre), fortsættes vask under anvendelse af Buffer A indeholdende 0,3 M NaCl og 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .  $\text{CaCl}_2$  er kendt i teknikken for at stabilisere faktor VIII:C, men kan ikke anvendes tidligere på grund af faren for at aktivere størkningsfaktorer, hvilket fører til fi-  
30 brinklumper på harpiksen og potentiel nedbrydning af faktor VIII:C. Vask af harpiksen er effektiv til fjernelse af fibronectin, fibrinogen og massen af forurenende protein.

35 Hvor faktor VIII:C er kompleksdannet med faktor VIII:R, er det fordelagtigt at eluere søjlen derefter med et elueringsmiddel, som er effektivt til at desorbere størs-

tedelen af faktor VIII:R, der bliver tilbage på søjlen, som ikke er elueret ved vasken. En del af faktor VIII:C kan også eluere i dette trin, men der kompenseres derfor af den kendsgerning, at faktor VIII:C, som ikke eluerer i dette trin, vil blive udvundet på renere form og i et udbytte, som stadig overgår hidtil kendt teknik med en væsentlig faktor. Faktor VIII:R kan elueres med et elueringsmiddel omfattende førnævnte "Buffer A", hvori der er indeholdt 0,4 M NaCl og 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Den eluerede fraktion samles og repræsenterer en beriget kilde for faktor VIII:R.

Den mængde faktor VIII:C, der bliver tilbage på adsorptionsmidlet, elueres derpå under betingelser, der er effektive til desorbering af faktor VIII:C uden nedsættelse af dens biologiske aktivitet. Et tilfredsstillende elueringsmiddel omfatter førnævnte "Buffer A", indeholdende opløst deri 0,3 M til 0,5 M CaCl<sub>2</sub>, foretrukket 0,5 M CaCl<sub>2</sub>. Den eluerede fraktion samles og kan behandles yderligere eller anvendes som sådan som kilde for faktor VIII:C til terapeutiske formål.

Når råmaterialet er plasma, må fremgangsmåden udføres med tilsætning af små, men effektive mængder inhibitorer mod proteolytisk nedbrydning, såsom benzamidin, pancreatisk trypsininhibitor eller hirudin. Ingen sådanne inhibitorer er nødvendige, når råmaterialet er cryoprecipitat eller materiale med højere faktor VIII:C renhed.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

#### EKSEMPEL 1

Dette eksempel sammenligner rensning af antihæmofil faktor fra humant cryoprecipitat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og ved dermed beslægtede offentliggjorte pro-

cedurer. Alle procedurer blev udført ved stuetemperatur.

a. Rensning ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen

5 3 g humant cryoprecipitat blev gensuspenderet under anvendelse af en vibromixer i 10 ml "Buffer A" (20 mM imidazol, 0,1 M lysin, 0,02% azid, pH 6,8) indeholdende 0,3 M NaCl. Vitamin K afhængige proteaser blev fjernet ved  
10 behandling med aluminiumhydroxidgel ("Resorptar"<sup>®</sup>, Armour Pharmaceutical Co.). Opløsningen blev omrørt med 1/30 volumen "Resorptar" i 10 minutter, der blev centrifugeret ved 10 000 x g i 5 minutter og reabsorberet med samme mængde "Resorptar" i 10 minutter. Efter centrifugering (10 000 x g i 5 minutter) blev opløsningen passeret  
15 gennem 2 lag osteklæde. Den resulterende opløsning havde en ledningsevne på 32 mS/cm. 2,5 ml af denne opløsning blev påført en 10 ml søjle af "AH-Sepharose" (Pharmacia) (10 x 0,55 cm) bragt i ligevægt med "Buffer A" indeholdende 0,3 M NaCl ved en strømningshastighed på 12 ml/time. Søjlen  
20 blev vasket med ligevægtsbevirkende puffer ("Buffer A" indeholdende 0,3 M NaCl), indtil absorbansen ved 280 nm for eluatet var mindre end 0,1. Søjlen blev yderligere vasket med "Buffer A" indeholdende 0,3 M NaCl og 10 mM CaCl<sub>2</sub>, hvorpå der blev elueret, først med "Buffer A" indeholdende  
25 0,2 M NaCl og 10 mM CaCl<sub>2</sub> og dernæst med "Buffer A" indeholdende 0,5 M CaCl<sub>2</sub>.

30

35



ført en 10 ml søjle af "AH-Sepharose" (Pharmacia) (10 x 0,55 cm), bragt i ligevægt med "Buffer B" ved en strømningshastighed på 12 ml/time. Søjlen blev vasket med "Buffer B", indtil absorbansen ved 280 nm for eluatet var mindre end 0,1, derpå elueret med "Buffer B" indeholdende 0,2 M NaCl og endelig med "Buffer B" indeholdende 1 M NaCl.

Fraktion	Faktor			
	Faktor VIII:C (E/mg)	Faktor VIII:C (enheder i alt)	Udbytte %	x rensning
Cryoprecipitatopløsning	0,20	22,8	100	1
Ubundet	0	0	0	-
"Buffer B"				
+ 0,2 NaCl vask	0,16	3,1	14	0,8
"Buffer B"				
+ 1 M CaCl vask	0*	0	0	-

\* Denne spids indeholdt til at begynde med ca. 25% af faktor VIII "C" aktiviteten påført søjlen, men den var meget ustabil og tabte al aktivitet efter 2 timers forløb ved stuetemperatur.

### 30 c. Rensning ved metoden af Faure et al.

3,8 g cryoprecipitat blev opløst under anvendelse af en vibromixer i 11 ml "Buffer C" (1% saccharose, 1% humant serumalbumin, 0,1 M lysin, 0,1 M natriumacetat, pH 5,5) og adsorberer 2 gange med "Resorptar" som under (a). pH for opløsningen, som på dette tidspunkt var 6,4, blev sænket til 5,5 ved langsom tilsætning af 10%'s eddikesyre

under omrøring, og det resulterende tunge bundfald blev fjernet som under (b). 3,5 ml klaret cryoprecipitatopløsning blev påført en 10 ml søjle af "AH-Sepharose" (Pharmacia) (10 x 0,55 cm), bragt i ligevægt med "Buffer C", ved en strømningshastighed på 12 ml/time. Søjlen blev vasket med "Buffer C" indtil absorbansen af eluatet var mindre end 0,1, med "Buffer C" indeholdende 0,2 M NaCl og endelig med "Buffer C" indeholdende 1 M NaCl.

10	Fraktion	Faktor VIII:C (enheder ialt)	Udbytte %
	Cryoprecipitatopløsning	24,7	100
15	Ubundet	0	0
	"Buffer C" + 0,31 M NaCl vask	0	0
20	"Buffer C" + 1 M NaCl vask	7,0	28

Hverken specifik aktivitet eller rensningsniveau er meningsfuldt i dette eksempel på grund af den høje koncentration (10 mg/ml) af albumin, der er til stede i alle fraktioner.

#### EKSEMPEL 2

30 Dette eksempel viser fordelingen af andre proteiner af interesse - fibronectin, von Willebrand's faktor (faktor VIII:R) og fibrinogen - efter rensning af faktor VIII:C fra humant cryoprecipitat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Rensningsproceduren var som beskrevet i eksempel 1 (a). Det udvundne i hver fraktion, som vist i det følgende, er udtrykt som en procentdel af mængden af det protein, der blev påført harpiksen.

	Søjlehulrum				
	Cryo- preci- pitat	+ "Buffer A" + 0,3 M NaCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub>	"Buffer A" + 0,4 M NaCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub>	"Buffer A" + 0,5 M CaCl <sub>2</sub>	
5	Totalprotein	100	95	2	1
	Fibronectin	100	+	3	1
10	Fibrinogen	100	+	0,5	0,5
	Faktor VIII:C	100	3	24	57
15	Von Willebrands- faktor (VIII:R)	100	+	23	3
	Faktor VIII:C (enheder/mg)	0,18	0,007	2,0	9,1

20 + ikke bestemt. Da imidlertid 96% af det påførte protein blev elueret fra søjlen, og fibronectin og fibrinogen er til stede i høje koncentrationer i cryoprecipitatet, må disse proteiner eluere i høj grad i denne fraktion.

### 25 EKSEMPEL 3

30 Dette eksempel sammenligner fibronectin- og fibrinogenindholdet af faktor VIII:C oprenset fra humant cryoprecipitat ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen med et i handelen tilgængeligt præparat med høj renhed af faktor VIII:C ("Factorate"®, Generation IIB, Armour Pharmaceutical).

	Fraktion	Faktor VIII:C (E/mg)	Fibro- nectin $\mu$ g/E FVIII:C	Fibri- nogen $\mu$ g/E FVIII:C
5	"Factorate" Gen 11B	4,2	4	146
10	"Buffer A" + 0,4 M NaCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub>	2,0	75	143
	"Buffer A" + 0,5 M CaCl <sub>2</sub>	9,1	11	36
15	Begge portioner "AH-sepharose"-vaske- væsken samlet	4,4	30	68

EKSEMPEL 4

20 Dette eksempel viser anvendelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til oprensning af faktor VIII:C fra humant plasma. Det viser også effektiviteten af proteolytiske inhibitorer, specielt thrombininhibitorer, såsom hirudin, ved forbedring af udbyttet af faktor VIII:C ved denne op-

25 rensning.

Fast NaCl blev sat til humant plasma for at forøge dets ledningsevne til 30-35 mS/cm. I et gennemløb blev søjlen drevet uden brug af inhibitorer. I et andet gennemløb

30 blev benzamidin (0,5 M) og pancreatisk trypsininhibitor ("Trasylo<sup>®</sup>", 1 mg/ml) tilsat til endelige koncentrationer på 1 mM og henholdsvis 0,01 mg/ml. I et tredje gennemløb blev hirudin (Calbiochem Col., 25 E/ml) tilsat i stedet til en endelig koncentration på 1 enhed/ml. 5 ml

35 plasma blev ført til en 4 ml (4 x 0,55 cm) søjle af "AH-Sepharose" (Pharmacia) bragt i ligevægt i "Buffer A" (20 mM imidazol, 0,1 M lysin, 0,02% azid, pH 6,8) indeholden-

de 0,3 M NaCl ved en strømningshastighed på 12 ml/time. Hvis proteolytiske inhibitorer var blevet sat til plasmaet, blev de også sat til søjleelueringspufferne. Søjlen blev vasket med ligevægtspuffer (se eksempel 1), indtil  
 5 absorbansen ved 280 nm for eluatet var mindre end 0,02, og der blev derpå elueret med 0,5 M CaCl<sub>2</sub> i "Buffer A".

10	Inhibitorer	Fraktion	Faktor	Faktor	Udbytte	x rensning
			VIII:C	VIII:C		
			(E/mg)	(enheder i alt)	%	
	-	Plasma	0,014	2,8	100	1
15	Ingen	{ Ubunden "Buffer A" + 0,5 CaCl <sub>2</sub> vask	0,001	0,2	9	-
			0,44	1,1	39	32
	Benzamid	{ Ubunden "Buffer A" + 0,5 CaCl <sub>2</sub> vask	0,001	0,1	4	-
	+ Trasylol		0,67	2,5	90	48
20	Hirudin	{ Ubunden "Buffer A" + 0,5 CaCl <sub>2</sub> vask	0,001	0,21	8	-
			0,60	2,0	72	43

Det ses, at selv uden inhibitorer oprenser fremgangsmåden  
 25 ifølge opfindelsen effektivt faktor VIII:C med en faktor på godt over 10:1, nemlig 20:1, 25:1, 30:1 eller bedre, afhængigt af den særlige fraktion, der samles. Med inhibitorer er rensningsfaktoren endnu højere og kan overskride 40:1. Ved en vilkårlig given oprensingsgrad er  
 30 udbyttet, dvs. mængde faktor VIII:C, der føres til processen, som udvindes som oprenset produkt, højere end opnåeligt under anvendelse af til teknikens stadi hørende processer til oprensning til samme renhedsgrad. Udbytter på over 30% kan opnås selv uden inhibitorer, og  
 35 udbytter over 50% og så høje som 70-90% kan opnås med inhibitorer. Denne kombination af oprensning og udbytte er yderst fordelagtig og overraskende.

## P a t e n t k r a v :

-----

- 5 1. Fremgangsmåde til oprensning af faktor VIII:C fra råmateriale indeholdende faktor VIII:C og faktor VIII:R, k e n d e t e g n e t ved, at man
- 10 (a) tilvejebringer en vandig opløsning af råmaterialet, som har en pH-værdi på 5,5-8,0 og en ledningsevne på 25-35 mS/cm,
- 15 (b) adsorberer faktor VIII:C og faktor VIII:R fra opløsningen over på aminohexylagarose, som er bragt i ligevægt ved den vandige opløsnings pH,
- (c) eluerer faktor VIII:R fra aminohexylagarosen og derpå
- (d) eluerer faktor VIII:C fra aminohexylagarosen.
- 20 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH for råmaterialet er 6,0-7,5.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at pH for råmaterialet er 6,5-7,2.
- 25 4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at aminohexylagarosen indeholder mindst ca. 10  $\mu$ mol aminohexylkæder pr. g.
- 30 5. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at råmaterialet er plasma, et plasmakoncentrat eller et cryoprecipitat, som indeholder AHF.
- 35 6. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at råmaterialet også indeholder fibronectin og/eller fibrinogen, og at fibronectinet

og/eller fibrinogenet coelueres med faktor VIII:R.

5 7. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-6,  
k e n d e t e g n e t ved, at en proteolytisk inhibitor  
er til stede i trin (a), (b), (c) og (d) i en lille, men  
effektiv mængde, til at inhibere proteolyse af faktor  
VIII:C.

10 8. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-7,  
k e n d e t e g n e t ved, at faktor VIII:C elueres med  
en vandig pufret opløsning indeholdende 0,3-0,5 M  $\text{CaCl}_2$ .

15 9. Farmaceutisk præparat til administrering for at afbøde  
symptomerne på hæmofili, k e n d e t e g n e t ved, at  
det indeholder en terapeutisk effektiv mængde af faktor  
VIII:C, der er blevet oprenset ved fremgangsmåden ifølge  
et vilkårligt af kravene 1-8.

20

25

30

35