(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 239 T2** 2004.07.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 607 392 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 239.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/06609**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 917 166.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/001466**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.07.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.01.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.07.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.10.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 9/74**

(30) Unionspriorität:
913590 **14.07.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Alpha Therapeutic Corp., Los Angeles, Calif., US

(74) Vertreter:
RACKETTE Partnerschaft Patentanwälte, 79098 Freiburg

(72) Erfinder:
HERRING, W., Steven, San Dimas, US; UEMURA, Yahiro, Arcadia, US; NODA, Munehiro, Nara 632, JP; SHITANISHI, T., Kenneth, No. Hollywood, US

(54) Bezeichnung: **REINIGUNG VON PLASMAFRAKTION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Erfindungsbereich

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Thrombin aus gereinigtem Prothrombin (Faktor II) unter Verwendung eines gereinigten Faktors X_a, Phospholipiden, Ca^{2+} und Plasmafraktionen, die einen Faktor V_a enthalten, wobei alle Faktoren (II, V_a und X_a) aus einem einzigen Reinigungsverfahren stammen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Blutgerinnung wird durch zwei unterschiedliche, jedoch ähnliche molekulare Mechanismen ausgelöst, die als intrinsische und extrinsische Koagulationswege oder Kaskaden bezeichnet werden. Beim intrinsischen Weg spielen üblicherweise im Blut vorkommende Faktoren eine Rolle. Beim extrinsischen Weg treten zu Blutbestandteilen zusätzlich Faktoren des Gewebes hinzu. Bei jedem der Reaktionsschritte der beiden Kaskaden wandelt eine Proteinnase ein inaktives Zymogen in seine enzymatisch aktive Form um. Im letzten Schritt der Kaskade, der bei beiden Pfaden, dem intrinsischen und dem extrinsischen Pfad, der gleiche ist, wird das inaktive Prothrombin in Thrombin umgewandelt, welches seinerseits die Umwandlung eines löslichen Fibrinogens in unlösliches Fibrin katalysiert.

[0003] Die Umwandlungen der Zymogene in beiden Kaskaden zu aktiven Proteinasen sind bei Abwesenheit akzessorischer Faktoren, welche die in ihrer Abwesenheit beobachtete Rate der Zymogenaktivierung auf das 10^4- bis 10^5-fache anregen, überaus langsam. Drei Arten akzessorischer Faktoren wirken in den Kaskaden: (1) Ca^{2+}-Ionen, (2) saure Phospholipide, die aus den Membrandoppelschichten der Thrombozyten oder aus beschädigtem Gewebe stammen, und (3) einem Proteincofaktor, der insbesondere zur Aktivierung eines vorgegebenen Zymogens erforderlich ist. Prothrombin, das ein Molekulargewicht von etwa 69.000 bis etwa 80.000 aufweist, ist aus einer einzigen Polypeptidkette zusammengesetzt. Wie die Aktivierung aller Blutkoagulationszymogene findet die Aktivierung von Prothrombin auf einer Oberfläche statt, die durch negativ geladene Phospholipide wie beispielsweise Phosphatidylserin bereitgestellt wird, die aus Thrombozyten oder beschädigtem Gewebe stammen. Solche Lipide werden fast ausschließlich auf der Zytoplasmaseite oder im Inneren der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen aufgefunden. Prothrombin haftet nicht an Erythrozyten oder an den endothelialen Zellen des vaskularen Systems, es sei denn, die Zellen werden beim Herausstellen ihrer inneren Flächen gestört. Daher ermöglicht die Störung von Zellen, ihre negativ geladenen Phospholipide herauszustellen, die Bindung des Prothrombins an den Phospholipiden. Dies stellt einen ersten Schritt bei der Aktivierung des Prothrombins dar. Das Anbinden von Prothrombin an den Phospholipiden ist ein Ca^{2+} abhängiges Verfahren.

[0004] Die Aktivierung von Prothrombin wird durch den Faktor X_a katalysiert, der ebenfalls an Phospholipiden durch Ca^{2+} abhängige Wechselwirkungen anbindet. Jedoch werden die Höchstraten der Prothrombienaktivierung nur erreicht, wenn der Faktor V_a an dem Prothrombin-X_a-Ca^{2+}-Phospholipidkomplex gebunden ist.

[0005] Der Faktor X ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 59.000 bis etwa 70.000 und aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt, einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 40.000 und einer anderen von etwa 19.000. Der Faktor X wird sowohl auf dem intrinsichen als auch auf dem extrinsischen Weg zum Faktor X_a aktiviert.

[0006] Der Faktor V, der ein Molekulargewicht von 330.000 aufweist, ist ein Glycoprotein, das aus einer Polypeptidkette zusammengesetzt ist, die ein einziges fest gebundenes Ca^{2+} enthält, welches für die Aktivität des Faktors V_a wesentlich ist. Der Faktor V_a ist keine Proteinnase, wirkt jedoch bei der Prothrombinaktivierung als ein akzessorisches Protein, das eine Steigerung der Rate der Prothrombinaktivierung bewirkt. Der Faktor V selbst wird durch Thrombin aktiviert. Daher aktiviert bei einer Thrombinaktivierungsreaktion erzeugtes Thrombin den Faktor V zu V_a, der seinerseits die Rate der Thrombinsynthese steigert.

[0007] In vitro Untersuchungen zeigen, dass Ca^{2+} und Phospholipide die Rate der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch den Faktor X_a um etwa das 50-fache im Vergleich zur Umwandlungsrate des Faktors X_a allein steigern. Der Faktor V_a steigert die Umwandlungsrate durch X_a um etwa das 350-fache. Alle Faktoren zusammen steigern die Rate jedoch um mindestens etwa das 20.000-fache. Daher erzeugt der Ca^{2+}-Phospholipid-X_a-V_a-Komplex in einer Minute die gleich Menge an Thrombin wie diejenige, die durch den Faktor X_a allein in zwei Wochen erzeugt wird.

[0008] Da Thrombin den aktiven Wirkstoff bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, dem unlöslichen, das Blutgerinnsel ausbildenden Protein, darstellt, findet Thrombin beim Vermeiden eines Blutverlustes aus Wunden, blutenden Geschwüren, bei chirurgischen Verfahren und weiteren solcher Verletzungen Anwendung. Die natürliche Blutgerinnung benötigt zum wirksamen Unterbinden eines Blutausfluss aus einer Verletzungsstelle mehrere Minuten. Die Anwendung von Thrombin an der Verletzungsstelle bewirkt jedoch ein sofortiges Gerinnen. Daher ist die topische Anwendung des Thrombins unter Bedingungen wünschenswert, die im Anschluss einer Operation und eines Trauma herrschen. Die orale Applikation ist hingegen bei der Behandlung

von Geschwüren zweckmäßig, um einen lebensbedrohlichen massiven Blutverlust zu vermeiden. Ferner kann die Thrombininfusion während einer Augenoperation in dem glasartigen Hohlraum das Bluten an Stellen verhindern, die für die Kaustik schwer auszumachen sind. Eine solche Behandlung setzt die Gefahr einer Verletzung des Auges auf Grund eines Anstiegs des intraokularen Druckes während einer routinemäßigen Operation herab.

[0009] Bislang sind Rinderthrombinzubereitungen für topische Anwendungen erhältlich. Rinderthrombinzubereitungen führen jedoch häufig zu unerwünschten immunologischen Reaktionen bei dem behandelten Patienten. Solche Reaktionen können durch die Verwendung menschlicher Thrombinzubereitungen vermieden werden. Die Zubereitungen menschlichen Thrombins sind jedoch kostenintensiv, wodurch die Attraktivität seiner Verwendung herabgesetzt wird. Es besteht daher ein Bedarf an kosteneffektiven Mittel für das Reinigen und Aktivieren von Prothrombin zu Thrombin menschlichen Ursprungs.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Aktivierung des Faktors II zum Faktor II_a unter Verwendung eines Faktors V_a und eines Faktors X_a, wobei die Faktoren II, V_a und X_a alle aus einer einzigen unreinen Proteinfraktion stammen.

[0011] Der Aktivierungsprozess umfasst den Schritt des Zugebens des Faktors II zu einem Aktivierungspuffer zum Bereitstellen einer Faktor-II-Lösung. Der Faktor II wird durch Bereitstellen einer wässrigen Lösung der unreinen Proteinfraktion hergestellt. Die Faktoren II, V und X, die in der unreinen Proteinfraktion enthalten sind, werden an einen DEAE-Liganden gebunden und anschließend von dem DEAE-Liganden zurückgewonnen. Die Zurückgewonnene Proteinfraktion der Faktoren II und X wird durch Zugabe von Bariumchlorid ausgefällt. Der Bariumchloridniederschlag wird gelöst und einem chromatographischen Harz ausgesetzt, der mit einem den Faktor X bindenden Liganden verknüpft ist, den Faktor II jedoch, wenn überhaupt, nur schwach bindet. Der Faktor II wird aus der Fraktion zurückgewonnen, die gar nicht oder nur schwach an den den Faktor X bindenden Liganden bindet.

[0012] Der Faktor V wird der Lösung des Faktors II zum Bereistellen einer Faktor II/Faktor V Lösung zugegeben, wobei der Faktor V aus dem Bariumchloridüberstand zurückgewonnen wird, der durch das Faktor-II-Zubereitungsverfahren aus einer unreinen Plasmafraktion erzeugt wurde. Der Faktor V wird während der Faktor-II-Aktivierungsreaktion durch den Faktor II_a aktiviert. Bei der Aktivierungsreaktion wird der Faktor II in Abwesenheit des Faktors V_a äußerst langsam aktiviert. Es werden jedoch geringe Anteile des Faktors II_a erzeugt. Diese geringen Anteile des Faktors II_a stehen anschließend für die Aktivierung des Faktors V zum Faktor V_a zur Verfügung. Etwas Faktor II_a wird während des Reinigungsverfahrens erzeugt. Der auf diese Weise erzeugte Faktor V_a steht anschließend für die Wechselwirkung bei der Faktor-II-Aktivierungsreaktion zur Verfügung, die einen Anstieg der Rate der Faktor-II_a-Synthese bewirkt. Daher ist kein gesonderter Aktivierungsschritt für den Faktor V erforderlich.

[0013] Der Faktor X_a wird der Lösung aus Faktor II/ Faktor V zum Bereitstellen einer Lösung aus Faktor II/Faktor V und Faktor X_a zugegeben. Der Faktor X_a wird durch Gewinnung des Faktors X von dem den Faktor X bindenden Liganden des Faktors II-Zubereitungsverfahrens zurückgewonnen. Der Faktor X wird durch eine spezifische proteolytische Abspaltung aktiviert.

[0014] Phospholipidmembranen und Calciumionen werden der Lösung aus Faktor II/Faktor V und Faktor X_a zugegeben und die erhaltene Mischung zum Aktivieren des Faktors II zum Faktor II_a inkubiert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] Diese Merkmale, Gesichtspunkte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden in Zusammenschau mit der nachfolgenden detaillierten Beschreibung, den anliegenden Ansprüchen und der beigeschlossenen Zeichnung besser verstanden werden, die ein Flussdiagramm darstellt, das ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens zeigt.

Detaillierte Beschreibung

[0016] Das in Übereinstimmung mit der Praxis der vorliegenden Erfindung bereitgestellte Verfahren betrifft die Trennung der Faktoren II, V und X aus einer einzigen unreinen Proteinfraktion. Der hier verwendete Begriff „unreine Proteinfraktion" betrifft eine Proteinfraktion, die zusätzlich zu den Faktoren II, V und X ein oder mehrere Proteine enthält. Der Faktor X wird anschließend aktiviert und einer Aktivierungsreaktion zugegeben, die weiterhin Calciumphospholipide und den Faktor V enthält, um das Faktor-II-Zymogen zu einem aktiven katalytischen Faktor II_a zu aktivieren.

Reinigung der Faktoren II, V und X

[0017] Die in dem Flussdiagramm verdeutlichte Reinigung der Faktoren II, V und X geht von menschlichem Plasma aus, das gemäß einem von der so genannten U.S. Food and Drug Administration anerkannten Verfahren gesammelt und getestet wurde. Das Plasma kann vor dem Reinigungsschritt, falls erwünscht, durch Kälte ausgefällt werden. Die Plasmafraktion kann zur Verringerung der Natriumkonzentration von ihrem ursprünglichen Wert auf zwischen 85 und 105 mM elektrodialysiert werden. Das dialysierte Plasma wird anschließend durch Zusatz von Essigsäure auf einen in etwa neutralen pH-Wert eingestellt.

[0018] Die in dem Plasma mit eingestelltem pH-Wert enthaltenen Faktoren II, V, IX und X werden an neu gebildeter DEAE- (Diethylaminoethyl-) Zellulose, DEAE-Sephadex oder an anderen zweckmäßigen Ionen tauschenden Materialien, also die Faktoren II, V, IX und X bindenden Materialien, absorbiert, die mit einem Puffer beispielsweise mit etwa 0,03 M Natriumphosphat, einem pH-Wert von etwa 6,8 und etwa 0,03 M Natriumcitrat (Phosphat/Citrat-Puffer) äquilibriert wurden. Das DEAE-Harz und das unter Kälte ausgefällte Plasma werden ungefähr 30 Minuten lang vermischt und das DEAE-Harz anschließend durch Zentrifugation gesammelt. Das DEAE-Harz wird mit einem Puffer wie beispielsweise einem Phosphat/Citrat-Puffer gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird verworfen.

[0019] Das gewaschene DEAE-Harz wird in einem Puffer wie einem Phosphat/Citrat-Puffer suspendiert. Die erhaltene Suspension wird anschließend auf eine Säule gegeben und das Eluat verworfen. Das DEAE-Harz wird mit einem Puffer, wie einem Phosphat/Citrat-Puffer, gewaschen und diese Waschflüssigkeit ebenfalls verworfen. Die Faktoren II, V, IX und X werden durch Waschen des DEAE-Harzes mit einem eluierenden Puffer, der etwa 0,03 M Natriumphosphat, einen pH-Wert von etwa 6,8 und etwa 0,03 M Natriumcitrat sowie etwa 0,2 M NaCl aufweist, heraus gewaschen. Das Eluat wird gesammelt und die die Faktoren II, V, IX und X enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einer Gesamtlösung gesammelt. Es werden zweckmäßige Tests der gesammelten Fraktionen durchgeführt und anschließend der pH-Wert der Gesamtlösung in etwa auf neutral eingestellt. Die Lösung wird mittels einer sterilen, Bakterien zurückhaltenden Kartusche oder Membran gefiltert, um so eine Gesamtlösung der Faktoren II, V, IX und X herzustellen. Die Gesamtlösung wird bis zu ihrer Weiterbehandlung tief gefroren.

[0020] Zur Weiterbehandlung wird die Gesamtlösung aufgetaut und kann unter Verwendung eines von der Millipore Corp. aus Bedford, MA bereitgestellten Millipore Pillicon Konzentrators zum Konzentrieren des Eluats auf etwa 10 g des Proteins pro Liter diafiltriert werden. In einem beispielhaften Ausführungsbeispiel wird die die Faktoren II, V, IX und X enthaltende Gesamtlösung zur Inaktivierung jeglicher viralen Konterminierung der Lösung behandelt. Der virale Inaktivierungsschritt (der auch als Lösungsmittel-Detergens- oder D-S-Behandlung bezeichnet wird) wird durch Vermischen der diafiltrierten Gesamtlösung mit einer wässrigen Lösung durchgeführt, die etwa 3% (V/V) Tri-(n)butylphosphat und etwa 10% Polysorbat 80 enthält. Je Kilogramm der Gesamtlösung werden etwa 0,08 bis 0,14 kg der Tri(n)butylphosphat-/Polysorbat 80-Lösung zugesetzt. Die erhaltende Lösung wird bei etwa 27°C etwa 6 bis etwa 8 Stunden lang gemischt.

[0021] Die behandelte die Faktoren II-, V-, IX- und X-enthaltende Lösung wird anschließend gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung weiterbehandelt.

Reinigung der Faktoren II, V und X durch Barium/Citrat-Niederschlag

[0022] Bei einem beispielhaften Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird die wie oben beschrieben hergestellte viral inaktivierte, die Faktoren II-, V-, IX- und X-enthaltende Lösung ungefähr 2 bis 10 mal mit einem verdünnenden Puffer (0,02 M Natriumcitrat mit einem pH-Wert von etwa 7,3 bis 7,5) verdünnt. Falls erwünscht, kann eine die Faktoren II-, V-, IX- und X enthaltende Lösung verwendet werden, die nicht viral inaktiviert oder die mit einem anderen als dem oben beschriebenen Verfahren viral inaktiviert wurde.

[0023] Ein zum Ausfällen der Faktoren II, IX und X ausreichendes Volumen einer 0,5 bis 2 M Bariumchloridlösung wird der verdünnten die Faktoren II, V, IX und X enthaltenden Lösung zugesetzt. Die sich ergebende Bariumchloridkonzentration liegt etwa bei 0,1 bis etwa 0,2 M. Der Niederschlag (auch Barium- oder Ba-Niederschlag genannt) wird gesammelt und in einer Lösung von 0,2 bis 0,6 M EDTA ((Ethylendinitrilo)-tetraessigsäure) gelöst und mit einem wenig Natrium enthaltenden Puffer (0 bis etwa 0,2 M NaCl in einer gepufferten Lösung mit einem pH-Wert zwischen etwa 6,0 und etwa 9,0), wie zuvor beschrieben, diafiltriert, um Barium und EDTA zu beseitigen und um eine wunschgemäß niedrige Natriumkonzentration für das weitere Verfahren zu erhalten. Ein für die Diafiltration geeigneter Puffer enthält etwa 0,02 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von etwa 6,6 bis etwa 7 und etwa 0,05 M NaCl.

[0024] Der den Faktor V enthaltende Überstand wird gesondert mit einem Puffer, der etwa 0,06 M Tris, pH 7,2, 0,09 M NaCl und 0,01 M $CaCl_2$ enthält, wie zuvor beschrieben, diafiltriert. Die den Faktor V enthaltende Lösung wird gefroren, bis sie für einen Einsatz benötigt wird.

[0025] Es wurde ermittelt, dass der Bariumchloridniederschlag einen Anstieg der spezifischen Aktivität der Faktoren II, IX und X auf etwa das 1,2 bis etwa 3-fache hervorruft.

[0026] Der diafiltrierte aufgelöste Bariumniederschlag wird auf eine Säule gegeben, die ein an Dextransulfat (DSS) gekoppeltes Silika-Harz enthält.

Zubereitung des Dextransulfat-Silika-Harzes

[0027] Bei einem beispielhaften Ausführungsbeispiel zur Herstellung eines im Rahmen der Prinzipien der vorliegenden Erfindung geeigneten DSS-Harzes wurde ein von „SERVA Fine Biochemicals Inc." aus Westbury, NY unter dem Handelsnamen CNBR SP500 vertriebener aktivierter Silika-Harz, wie in dem U.S. Patent mit der Nummer 4,725,673 beschrieben, eingesetzt.

[0028] Kurz gesagt wurde ein Kilogramm des Harzes, der in seiner CNBr-aktivierten Form ausgeliefert wird, allmählich mit zwei Kilogramm destilliertem Wasser aufgeschlämmt und in einem so genannten „Buchner Trichter" zur Feuchte angesaugt. Der Aufschlämm-/Waschschritt wurde zweimal oder mehrmals wiederholt. Eine Dextran-Sulfatlösung wurde durch Auflösen von 10 bis 200 g Dextran-Sulfat in einer gepufferten Lösung, vorzugsweise mit etwa 0,1 M $NaHCO_3$ und einem pH-Wert von etwa 8,3, hergestellt. Das gewaschene Silika-Harz und die Dextran-Sulfatlösungen wurden zur Bindung des Dextran-Sulfat-Liganden an dem aktivierten Silika-Harz miteinander kombiniert und 1 bis etwa 24 Stunden lang miteinander vermischt. Das mit dem Liganden versehene Harz wurde anschließend dreimal mit einem oder mehreren Volumen destillierten Wassers in einem Buchner Trichter gewaschen und bis zur Feuchte angesaugt. Das mit dem Liganden versehene Harz wurde anschließend mehrere Male mit einer Lösung weiter gewaschen, die etwa 2,0 bis 4,0 M NaCl bei einem pH-Wert von etwa 6 bis 8 enthielt, wobei ein Buchner Trichter verwendet wurde. Das Harz wurde anschließend zur Feuchte angesaugt. Das Harz wurde weiter durch ähnliches Waschen und Ansaugen mit einem oder mit mehreren Volumen einer gepufferten Lösung, die einen pH-Wert von etwa 6 bis 8 und etwa 0 bis etwa 0,2 M NaCl aufwies, weiter gewaschen.

[0029] Das gewaschene mit Ligand versehene Harz wurde anschließend durch Mischen über 1 bis 10 Stunden hinweg mit mehreren Volumen des Serums Albumin weiterbehandelt, um alle „freien" Bindungsgruppen zu blockieren. Das blockierte, mit Ligand versehene Harz wurde mehrere Male mit destilliertem Wasser in einem Buchner Trichter zur Beseitigung überschüssiger blockierender Wirkstoffe gewaschen. Das blockierte, mit Ligand versehene Harz wurde anschließend mehrere Male mit einem oder mehreren Volumen einer Lösung gewaschen, die etwa 2,0 bis etwa 4,0 M NaCl bei einem pH von etwas 6 bis etwa 8 enthielt. Ein abschließender Waschvorgang mit destilliertem Wasser wurde durchgeführt und das Harz bis zur Feuchte angesaugt.

[0030] Der abschließende Zubereitungsschritt für das mit Ligand versehene Harz schließt sich wiederholende Waschvorgänge mit mehreren Harzvolumen an „Alcaton" (einer Lösung mit 50 Volumenprozent Aceton, 35 Volumenprozent Ethanol und 15 Volumenprozent Wasser) ein. Die Aufschlämmung wurde vor ihrer Verwendung bei 2°C bis 8°C aufbewahrt. Das Harz wurde von dem Alcaton dekantiert und mit destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von etwa 6,8 gewaschen, auf eine Säule gegeben und mit etwa 0 und etwa 0,05 M NaCl bei einem pH von etwa 6 bis etwa 9 vor seinem Gebrauch äquilibriert. Ein geeigneter Puffer zum Äquilibrieren des chromatographischen Harzes umfasst etwa 0,02 M Natriumcitrat bei einem pH von etwa 6,6 bis etwa 7 und etwa 0,05 M NaCl.

Trennung der Faktoren II und X

[0031] Gewöhnlich sind zwischen 2 und 5 Liter des Dextran-Sulfatsilika-Harzes für je 5 kg der hergestellten, viral inaktivierten, die Faktoren II, IX und X enthaltenden Lösung erforderlich. Das Dextran-Sulfatsilika-Harz wird bevorzugt, da Silika-Harz sich bei einer Verwendung in Säulen-Chromatographie-Verfahren nicht leicht zusammenpressen lässt und die gewünschten Durchflussraten bei solchen Schritten ermöglicht. Es können jedoch auch andere Harze, wie beispielsweise Sepharose, eingesetzt werden. Ferner können, obwohl insbesondere Dextran-Sulfat beschrieben ist, auch andere Liganden, wie Heparin, eingesetzt werden.

[0032] Eine den diafiltrierten Bariumniederschlag enthaltende Lösung wird wie oben beschrieben hergestellt. Die Lösung wird anschließend durch das Dextran-Sulfatsilika-Harz der Säule gepumpt, so dass die in der Lösung enthaltenden Faktoren IX und X an dem Harz absorbiert werden. Der Faktor II wird nicht oder nur lose absorbiert und durch die durchströmende Waschflüssigkeit oder in den sich anschließenden frühen Elutionsschritten heraus gewaschen. Nach Abschluss des Absorptionsschrittes wird das mit den Faktoren IX, X versehene Harz mit einem Volumen Waschpuffer gewaschen, das in etwa dem dreifachen Volumen des Harzes in der Säule entspricht. Ein geeigneter Waschpuffer umfasst etwa 0,02 M Natriumcitrat bei einem pH von etwa 6,6 bis etwa 7 und etwa 0,05 M NaCl. Die Waschflüssigkeit und die Waschlösungen mit einem A_{280} oberhalb des Grundrauschens (d. h. dem A_{280}-Wert, der für den von der Säule während des Äquibrierungsprozesses eluierten Puffer erhalten wurde), die beide den Faktor II enthalten, werden vereinigt. Die den Faktor II enthaltenden Fraktionen werden entweder sofort weiter behandelt oder gefroren und für eine spätere Behandlung bereitgestellt.

[0033] Die Faktoren IX und X werden von dem Harz mittels eines linearen Salz(NaCl)-Gradienten von 0,05

M bis etwa 0,6 M NaCl in einer Pufferlösung, die etwa 0,02 M Natriumcitrat und einen pH-Wert von etwa 6,6 bis etwa 7 aufweist, von dem Harz eluiert. Bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,2 M, wird der Faktor X von der Säule eluiert. Die den Faktor X enthaltenden Fraktionen werden miteinander vereinigt und entweder sofort weiterbehandelt oder gefroren und für eine spätere Behandlung gelagert. Falls erwünscht, können die Faktor X-Fraktionen mit dem DSS-Harz wieder verwendet und wie zuvor beschrieben zur weiteren Reinigung eluiert werden. Die Faktor-X-Eluate können vor der Weiterbehandlung oder dem Einfrieren gefiltert werden. Nachdem die getrennt vereinigten Fraktionen mit den Faktoren II, IX und X aus mehreren Durchläufen gesammelt wurden, werden Fraktionen weiter behandelt.

[0034] Sobald der Salzgradient eine Konzentration von etwa 0,25 M bis etwa 0,4 M erreicht, werden beide Faktoren IX und X eluiert. Bei einer Konzentration oberhalb von etwa 0,4 M wird der Faktor IX allein eluiert. Die die Faktoren IX enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und entweder sofort weiter behandelt oder tief gefroren und für eine spätere Behandlung bereitgestellt.

[0035] Zur Weiterbehandlung werden die den Faktor X enthaltenden Fraktionen aufgetaut (falls gefroren) und miteinander kombiniert, wobei der pH-Wert auf neutral eingestellt wird. Diese kombinierte Vereinigung wird anschließend gegenüber einem Aktivierungspuffer, wie beispielsweise etwa 0,02 M HEPES (4(2-Hydroxy-ethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure) bei einem pH-Wert von etwa 7,4 und etwa 0,15 M NaCl diafiltriert, um die richtigen Zielparameter der Faktor-X-Aktivität und der Natriumkonzentration zu erhalten, die vorzugsweise 0,02 M HEPES, pH 7,4 und 0,15 M NaCl sind.

[0036] Der sterile den Faktor X enthaltende Hauptanteil wird auf die Faktor X-Aktivität hin überprüft. Der Faktor X kann bis zu seiner Verwendung gefroren werden.

[0037] Zur Weiterbehandlung werden die den Faktor II enthaltenden Fraktionen aufgetaut (falls gefroren) und kombiniert und der pH-Wert auf etwa neutral eingestellt. Diese kombinierten Vereinigungen werden dann ultrafiltriert, um den Faktor II zu konzentrieren und um die richtigen Zielparameter der Faktor-II-Aktivität sowie der Natriumkonzentration zu erhalten. Der pH-Wert wird überprüft und falls notwendig, noch einmal eingestellt. Falls erwünscht, können andere Verfahren zur Konzentration des Faktors II, wie beispielsweise eine Ammoniumsulfatfällung an die sich eine Diafiltrierung anschließt, oder andere aus dem Stand der Technik bekannte geeignete Mittel angewendet werden.

[0038] Der Faktor II wird bis zu seiner Verwendung gefroren oder gefriergetrocknet.

Aktivierung des Faktors X zum Faktor X_a

[0039] Im Blut wird der Faktor X bei der intrinsischen Kaskade durch den Faktor IX_a in Anwesenheit des Faktors VIII_a sowie in Anwesenheit von Calciumionen und Phospholipiden und auf dem extrinsischen Weg durch den Faktor VII_a in Anwesenheit des Faktors III, von Phospholipiden und Calciumionen aktiviert. Die Aktivierung des Faktors X kann gemäß der vorliegenden Erfindung durch die Wirkung dieser Blutfaktoren erzielt werden. Abweichend davon können andere proteolytischen Enzyme, wie Russells Vipergift verwendet werden.

[0040] Vorzugsweise wird der durch das oben beschriebene Verfahren gereinigte Faktor X durch Inkubation mit Schlangengiftproteinase, die aus so genannten Russells Vipergift (Vipera russelli) stammt, zu seiner aktiven katalytischen Form aktiviert.

[0041] Etwa 2 g des Faktors X werden mit 0,5 bis 10 mg/ml von Russels Vipergift und 0,005 M $CaCl_2$ bei 37°C 30 Minuten lang zur Umwandlung des Faktors X zum Faktor X_a inkubiert. Nach Abschluss dieser Aktivierung wird die Schlangengiftproteinase durch Säulenchromatographie an Benzamidin-Sepharose (geliefert von Pharmacia aus Uppsala, Schweden) entfernt. Die Benzamidin-Sepharose wird mit einem Aktivierungspuffer wie 0,02 M HEPES, pH 7,4 und 0,15 M NaCl äquilibriert. Der aktivierte Faktor X wird eingesetzt und an die Benzamidin-Sepharose gebunden. Nicht gebundene Materialien werden von dem Chromatographiemedium mit Aktivierungspuffer herunter gewaschen. Der Faktor X_a wird von dem Chromatographiemedium mit etwa 0,005 M Benzamidin in Aktivierungspuffer ausgewaschen. Der eluierte Faktor X_a wird gesammelt und mit 0,02 M TRIS HCl, pH 5,5 und 0,15 M NaCl diafiltriert und kann durch Zusatz von 0,1% (Gew./Gew.) Albumin und 1% (Gew./Gew.) Polyethylenglycol oder Glycerol stabilisiert werden. Der Faktor X_a kann bis zu seinem Gebrauch tiefgefroren gelagert werden.

Aktivierung des Faktors II zum Faktor II_a.

[0042] Die Aktivierung des Faktors II zum Faktor II_a wird durch die Wirkung beider Faktoren X_a und V_a in Anwesenheit von Phospholipidmembranen und Calcium durchgeführt.

[0043] Phospholipidmembranen werden aus individuellen Phospholipiden synthetisiert oder durch Phospholipid/Fettemulsionen wie beispielsweise solche, die unter dem Handelsnamen SOYACAL und FLUOSOL von Alphatherapeutic Corporation aus Los Angeles, Ca. vertrieben werden, bereitgestellt. Phospholipidmembranen werden aus individuellen Phospholipiden wie Phosphotidylserin und Phosphotidylcholin mittels Ultraschall synthetisiert.

[0044] Gereinigter Faktor V wird wie oben beschrieben erhalten. Abweichend davon kann unreines und unfraktioniertes Plasma verwendet werden. Der Faktor V wird während des Faktor-II-Aktivierungsverfahrens durch den Faktor II_a aktiviert. Bei der Aktivierungsreaktion wird der Faktor II bei Abwesenheit des Faktor V_a nur sehr langsam aktiviert. Jedoch werden geringe Mengen an Faktor II_a erzeugt. Diese geringen Mengen des Faktors II_a stehen zum Aktivieren des Faktors V zum Faktor V_a zur Verfügung, wobei ein wenig Faktor V_a auch während des Reinigungsverfahrens erzeugt wird. Der auf diese Weise erzeugte Faktor V_a steht dann zur Wechselwirkung in der Faktor-II-Aktivierungsreaktion zur Verfügung, die einen Anstieg der Syntheserate des Faktors II_a herbeiführt. Daher ist für den Faktor V kein gesonderter Aktivierungsschritt erforderlich.
[0045] Zum Aktivieren des Faktors II wird der wie oben beschrieben erhaltene Faktor II auf etwa 2 bis etwa 20 A_{280}-Einheiten in einem etwa 0,06 M Tris-Puffer mit einem pH-Wert von etwa 7,3 verdünnt, wobei etwa 0,09 M NaCl, etwa 0,1 mg/ml einer Faktor-X_a-Fraktion, etwa 30 bis 200 mg einer Faktor-V-Fraktion, etwa 5 bis 50 nmol/ml Phospholipid etwa 2 bis 20 M $CaCl_2$-Konzentration, etwa 0,3%Tri-(n) butylphosphat und etwa 1% (Gew./Gew.) Polysorbat 80 (Endkonzentration) zugegeben werden. Die Mischung wird bei etwa 24° C bis etwa 30°C etwa sechs Stunden lang inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wird der pH-Wert der Mischung auf etwa 6,5 eingestellt. Die Lösung kann ferner durch Zusatz von etwa 5% (Gew./Gew.) PEG (Endkonzentration) und Zentrifugieren aufgeklärt werden.
[0046] Der Faktor II_a wird von dem Überstand mittels Chromatographie an Sulfapropyl-Sephdex, die von Pharmacia aus Upsala, Schweden geliefert wird, oder einem geeignetem Chromatographieharz gewonnen. Das Chromatographiemedium wird mit einem Puffer wie beispielsweise etwa 0,01 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,5 äquilibriert. Nachdem die den Faktor II_a enthaltende Mischung dem Chromatographiemedium ausgesetzt wurde, wird das Chromatographiemedium mit etwa 0,01 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von etwa 6,5 oder einem anderen geeignetem Puffer gewaschen. Der Faktor II_a wird von dem Chromatographiemedium mit einem Puffer wie beispielsweise etwa 0,1 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von etwa 6,7 eluiert. Der Faktor II_a wird gefiltert und zum Einstellen der Zusammensetzung auf etwa 5 bis 10 mM Histidin, pH-6,7, etwa 0,1 bis 0,2% Calciumionen und etwa 0,1 bis 0,2 M NaCl diafiltriert. Die Lösung wird anschließend unter Verwendung von zuvor sterilisierten, Bakterien zurückhaltenden Kartuschen oder Membranfiltern steril filtriert und gefriergetrocknet.

Beispiel 1

Reinigung der Faktoren II, V IX und X

[0047] Gemäß einem praktischem Beispiel der Erfindung zur Reinigung der Faktoren II, V, IX und X wurden die in dem mit Kälte ausgefällten Plasma enthaltenden Faktoren II, V, IX und X an DEAE-Zellulose absorbiert, die zuvor mit 0,03 M Natriumphosphat und 0,03 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,8 äquilibriert wurde. Die DEAE-Zellulose und das Plasma wurden ungefähr 30 Minuten lang miteinander vermischt und die durch Zentrifugieren gesammelte DEAE-Zellulose mit 0,03 M Natriumphosphat, 0,03 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,8 gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde verworfen.
[0048] Die ausgewaschene DEAE-Zellulose wurde in 0,03 M Natriumphosphat und 0,03 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,8 gewaschen und auf eine Säule gegeben. Das Eluat wurde verworfen. Die DEAE-Zellulose wurde mit 0,03 M Natriumphosphat und 0,03 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,8 gewaschen und diese Waschflüssigkeit ebenso verworfen. Die Faktoren II, V, IX und X wurden durch Waschen der DEAE-Zellulose mit 0,03 M Natriumphosphat und 0,03 M Natriumcitrat mit einem pH-Wert von 6,8 und 0,2 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und die die Faktoren II, V, IX und X enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einer Gesamtlösung gesammelt. Die Lösung wurde mittels einer sterilen Bakterien zurückhaltenden Kartusche gefiltert und anschließend Lyophiliert. Das lypophilierte Pulver wurde durch Suspension in n-Heptan und Erzhitzen bei 60°C über 20 Stunden hinweg viral inaktiviert. Das Heptan wurde durch Trocknen entfernt.
[0049] Etwa 2,04 kg des getrockneten Pulvers wurden mit etwa 64,5 kg kaltem Wasser zur Injektion (CWFI) wieder hergestellt. Das wieder hergestellte Pulver wurde mit 266,6 kg von 0,02 M Natriumcitrat mit einem pH-Wert 7,4 und 0,25 M NaCl bei 4°C verdünnt und 20 Minuten lang bei 2°C bis 4°C vermischt.
[0050] Etwa 53,4 kg der 1,0 M Bariumchloridlösung (4°C) wurden über eine Dauer von 2 Stunden zugesetzt und die Mischung über eine weitere Stunde hinweg gerührt. Die Mischung wurde während des Zusatzes des Bariumchlorids und während des Mischens zwischen 0°C und 4°C gehalten. Nach dem Mischen wurde die Lösung in einer so genannten „Sharples Zentrifuge" zentrifugiert, wobei die Durchflussrate durch die Zentrifuge zwischen 0,2 und 0,6 Litern pro Minute und die Temperatur der Lösung zwischen 0°C und 4°C gehalten wurde. Etwa 10 kg des Bariumchloridniederschlags wurden auf diese Weise gesammelt. Der den Faktor V enthaltende Überstand wurde gesammelt.
[0051] Der den Faktor V enthaltende Überstand wurde mittels eines Millipore TP Kartuschenfilters zur Beseitigung jeglicher Schwebeteilchen gefiltert. Die Lösung wurde durch einen so genannten „Millipore Pellicon Konzentrator" geschickt und auf 1/30 bis 1/50 ihres ursprünglichen Volumens konzentriert. Die konzentrierte Lö-

sung wurde anschließend fünfmal mit 0,06 M Tris, 0,09 M NaCl bei pH 7,2 („TBS"-Lösung) verdünnt. Nach dieser Verdünnung wurde das Material wieder auf sein Volumen vor der TBS-Verdünnung konzentriert. Diese Konzentration und der TBS-Verdünnungsschritt wurden drei weitere Male wiederholt. Die den Faktor V enthaltende Lösung wurde ein letztes Mal konzentriert, anschließend auf 1/10 bis 1/30 ihres ursprünglichen Volumens mit TBS konzentriert, wobei die Leitfähigkeit der Lösung zu diesem Zeitpunkt ungefähr gleich derjenigen der TBS-Lösung war. Zum Bariumchloridniederschlag wurden etwa 66,7 kg einer 0,4 M EDTA-Lösung bei 20°C bis 25°C zur Auflösung des Niederschlags gegeben. Der Niederschlag wurde mittels eines Millipore-TP-Kartuschefilters zur Beseitigung von Schwebeteilchen gefiltert. Nach der Filtration wurde die Lösung durch einen Millipore-Pellicon-Konzentrator geschickt und auf 1/5 bis 1/10 ihres ursprünglichen Volumens konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde anschließend auf ihr ursprüngliches Volumen mit 0,02 M Natriumcitrat und 0,05 M NaCl verdünnt. Die Konzentrations- und Verdünnungsschritte wurden sechs weitere Male wiederholt, wobei an diesem Punkt die Leitfähigkeit der Lösung in etwa gleich derjenigen der Lösung aus 0,02 M Natriumcitrat und 0,05 M Natriumchlorid war.

[0052] Nach der letzten Verdünnung betrug das Gewicht des diafiltrierten Materials 76,4 kg. Der wieder aufgelöste Niederschlag enthielt die Faktoren II, IX und X.

[0053] Die Hälfte des diafiltrierten Materials (38,6 kg), das die Faktoren II, IX und X enthielt, wurde bei einer Flussrate von etwa 170 ml/min einer so genannten „Moduline" Chromatographiesäule, 18 cm × 94 cm, ausgesetzt, welche Dextransulfat-Silikaharz (DSS) enthielt und mit einem Waschpuffer (0,02 M Natriumcitrat und 0,05 M Natriumchlorid, pH 6,8) äquilibriert wurde. Der den Faktor II enthaltende Ausfluss wurde gesammelt. Anschließend wurden 425 kg des Waschpuffers durch die Säule geschickt.

[0054] Ungefähr 25 Liter (ein Säulenvolumen der Waschung) der ursprünglichen Waschung wurden mit dem Faktor-II-Ausfluss kombiniert. Die Faktor-II-Vereinigung wurde durch Diafiltration unter Verwendung des Millipore-Pellicon-Konzentrators konzentriert. Nach dem Konzentrieren wurde das Faktor-II-Eluat mittels eines (sterilen) 0,2 Mirometer großen Filters filtriert und anschließend gefroren.

[0055] Unmittelbar nachdem die Säule, wie oben beschrieben, gewaschen wurde, wurden 150 Liter eines linearen Salzgradienten von 0,05 M NaCl bis 0,6 M NaCl in 0,2 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,8 mit einer Flussrate von 650 ml/min auf die Säule gegeben. Aliquote von 3,25 Litern des Eluats der Säule wurden während der Anwendung des Gradienten gesammelt und jede dritte Fraktion zur Bestimmung ihrer Faktor-IX- und Faktor-X-Aktivität überprüft. Die Aliquote mit einer vergleichsweise hohen Faktor-X-Aktivität, jedoch mit einer geringen Faktor-IX-Aktivität wurden zu einer Faktor-X-Eluatvereinigung vereinigt. Die Faktor-X-Eluat-Vereinigung wurde durch Diafiltration unter Verwendung des Millipore-Pellicon-Konzentrators diafiltriert. Nach der Konzentration wurde das Faktor-X-Eluat mittels eines (sterilen) 0,2 Mikrometer großen Filters filtriert und anschließend gefroren.

[0056] Anteile des ursprünglichen, die Faktoren II, IX, X enthaltenden Konzentrats und der konzentrierten Faktor-II-Vereinigung wurden auf die Faktor-II-Aktivität und den Proteinanteil hin überprüft. Das die ursprünglichen Faktoren II, V, IX und X enthaltende Konzentrat und die konzentrierte Faktor-X-Aliquotevereinigung wurden auf die Faktor-X-Aktivität und den Proteinanteil untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

	Gesamteinheiten	Ausbeute[2] %	Spezifische Aktivität Einheiten/A_{280}
Faktor II			
Plasma Fraktion	$1,4 \times 10^6$ *	--	4,79
DSS Konz.[1]	$8,91 \times 10^5$	63,6%	5,38
Faktor X			
Plasma Fraktion	$6,3 \times 10^5$ *	--	2,2
DSS Konz.	$6,67 \times 10^4$	10,6%	20,5
Faktor V **			
Plasma Fraktion	NB	--	0,017
Ba Überstand	NB	46%	0,027

*Abgeschätzt aus den mittleren Verhältnissen von Faktor II/Faktor IX und Faktor X/Faktor IX, die aus 45 unabhängigen Zubereitungen stammten,
**Faktor-V-Ergebnisse, die auf unabhängigen Laborexperimenten unter Verwendung anderer Verfahren basieren. Es waren keine Daten der in Beispiel 1 beschrieben Zubereitung verfügbar. NB= nicht bestimmt.
[1]Eluat aus dem Dextran-Sulfat-Chromatographieschritt.
[2] Ausbeute in % ist die Anzahl der in dem Schritt wieder gewonnenen Einheiten bezogen auf die Anzahl der Einheiten des Ausgangsmaterials multipliziert mit 100.

[0057] Die Reinheit (spezifische Aktivität) des Faktors II wurde durch die Dextransulfatchromatographie um 12% gesteigert. Die Reinheit des Faktors V wurde durch die Bariumfällung um 60% gesteigert. Die Reinheit des Faktors X wurde durch die Dextransulfatchromatographie auf das 10-fache gesteigert.

Beispiel 2

Aktivierung des Faktors X zu Faktor X_a

[0058] Etwa 460 mg des in Übereinstimmung mit dem Verfahren des Beispiels 1 hergestellten Faktors X wurden zur Umwandlung des Faktors X zu Faktor X_a mit 1 bis 2 mg von Russels Viperschlangengift und 5 mM $CaCl_2$ in einem Gesamtvolumen von 1.300 ml bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Nach Beendigung der Aktivierung wurde die Schlangengiftproteinase durch Säulenchromatographie auf Benzamidin-Sepharose beseitigt. Die Benzamidin-Sepharose wurde mit 0,02 M HEPS, pH 7,4, 0,15 M NaCl äquilibriert. Der aktivierte Faktor X wurde auf die Benzamidin-Sepharose gegeben und an diese gebunden. Ungebundene Materialien wurden von dem Chromatographiemedium mit 0,02 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl gewaschen. Der Faktor X_a wurde von dem Chromatographiemedium mit 0,02 M HEPES, pH 7,4, 0,005 M Benzamidin eluiert. Der eluierte Faktor X_a wurde gesammelt mit 0,02 M Tris, pH 5,5, 0,15 M NaCl dialysiert und durch Zusatz von 0,1% (Gew./Gew.) Albumin und 1,0% (Gew./Gew.) Polyethylenglykol stabilisiert.
[0059] Die Aktivierung und Reinigung ergab einen Faktor X_a mit einer spezifischen Aktivität von etwa 1.200 Einheiten/mg.

Beispiel 3

Zubereitung von Phospholipidmembranen

[0060] 57 mg Phosphotidylserin und 225 mg Phosphotidylcholin wurden miteinander vermischt und zur Erzeugung von synthetischen Phospholipidmembranen 30 bis 40 Minuten bei 4°C einem Ultraschall ausgesetzt.

Beispiel 4

Mit einem kleinen Ansatz durchgeführte Aktivierung des Faktors II zu Faktor II_a

[0061] 200 mg des in Übereinstimmung mit dem Verfahren des Beispiels 1 hergestellten Faktors II wurden auf 5 mg/ml in 0,06 M Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,3 und 0,09 M NaCl verdünnt. 4 µg des in Übereinstimmung mit dem Verfahren des Beispiels 2 hergestellten Faktors X_a, 400 µl Bariumchloridüberstand, der den gemäß dem Verfahren des Beispiels 1 hergestellten Faktor V enthielt, 10 nmol/ml Phospholipide, die gemäß dem Verfahren des Beispiels 3 hergestellt wurden, 7 mM $CaCl_2$, 0,3%(Gew./Gew.) Tri-(n)-butylphosphat und 1% (Gew./Gew.) Polysorbat 80 wurden ferner zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 6 Stunden lang inkubiert.

[0062] Nach Beendigung der Inkubation wurde der pH-Wert der Mischung auf 6,7 eingestellt und durch Zugabe von PEG auf eine Endkonzentration von 5% PEG (Gew./Gew.) gebracht und zum Auflösen des PEG 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gemischt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 3.000 UpM 30 Minuten lang entfernt. Der sich ergebende PEG-Überstand wurde mit einem gleichen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt und mit 9,2 ml Sulfapropyl-Sephadex (der mit 0,01 M Natriumcitrat, bei einem pH-Wert von 6,5 äquilibriert wurde) eine Stunde lang bei 40°C vermischt. Das den Faktor II enthaltende Sulfapropyl-Sephadex wurde anschließend auf eine Säule gegeben und mit 0,01 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,7 gewaschen. Der Faktor II_a wurde anschließend mit 0,1 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,5 eluiert. Faktor II_a mit einer spezifischen Aktivität von 1.220 Einheiten/A_{280}-Einheiten wurde bei dem mit einem kleinen Ansatz durchgeführten Aktivierungsverfahren mit einer Ausbeute von 85% erzeugt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II

Schritt	Gesamteinheiten (x 10^{-6})	Ausbeute * %	Spezifische Aktivität Einheiten/A_{280}Einheiten
Inkubierte Reaktions-mischung	157.000	100	560
PEG-Überstand	130.000	83	500
SP-Sephadex-eluat	134.000	85	1.220

*Ausbeute in % ist die Anzahl der in dem Schritt wieder gewonnenen Einheiten bezogen auf die Anzahl der Einheiten des Ausgangsmaterials multipliziert mit 100

Beispiel 5

Im Versuchsansatz durchgeführte Aktivierung von Faktor II zu Faktor II_a

[0063] 20 g des gemäß dem Verfahren des Beispiels 1 hergestellten Faktors II wurden auf 5 mg/ml in 0,06 M Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,3 und 0,09 M NaCl verdünnt. 0,4 mg des gemäß dem Verfahren des Beispiels 2 hergestellten Faktors X_a und 100 ml Bariumchloridüberstand, der den Faktor V enthielt und der gemäß dem Verfahren i des Beispiels 1 hergestellt wurde, wurden zugegeben, die Lösung auf ihre Endkonzentration gebracht und 28 nmol/ml des Phospholipids, das gemäß dem Verfahren des Beispiels 3 hergestellt wurde, 7 mM $CaCl_2$, 0,3% (Gew./Gew.) Tri-(n)-butylphosphat und 1% (Gew./Gew.) Polysorbat 80 zugesetzt. Die Aktivierungsmischung wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde der pH-Wert der Mischung auf 6,5 eingestellt, durch den Zusatz von festem PEG auf eine Endkonzentration von 5% PEG (Gew./Gew.) gebracht und zur Auflösung des PEG bei Raumtemperatur 30 Minuten lang vermischt. Die Mischung wurde anschließend zur Beseitigung des PEG-Niederschlages bei 300 UpM 30 Minuten lang zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt

und mit einem Liter Sulfapropyl-Sephadex (das mit 0,01 M Natriumcitrat bei einem pH-Wert von 6,5 äquilibriert wurde) eine Stunde lang bei 4°C vermischt. Das den Faktor II enthaltende Sulfapropyl-Sephadex wurde anschließend auf eine Säule gegeben und mit 0,01 M Natriumcitrat mit einem pH-Wert von 6,5 gewaschen. Der Faktor II_a wurde anschließend mit 0,1 M Natriumcitrat mit einem pH-Wert von 6,7 eluiert. Durch das im Versuchsansatz durchgeführte Aktivierungsverfahren wurde Faktor II mit einer spezifischen Aktivität von 1.100 Einheiten/ml und mit einer Ausbeute von etwa 74% erzeugt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III

Schritt	Gesamteinheiten (x 10^{-6})	Ausbeute * %	Spezifische Aktivität Einheiten/A_{280}Einheiten
Inkubierte Aktivierungs-mischung	21	100	520
PEG-Überstand	17,9	85,2	480
SP-Sephadex-eluat	15,7	74,8	1.100

*Ausbeute in % ist die Anzahl der in dem Schritt wieder gewonnenen Einheiten bezogen auf die Anzahl der Einheiten des Ausgangsmaterials multipliziert mit 100.

[0064] Die vorausgehende Beschreibung beispielhafter Ausführungsbeispiele zur Reinigung der Faktoren II, V, IX und X und zur Aktivierung des Faktors X zu X_a dient der Verdeutlichung. Aufgrund von Variationen, die dem Fachmann offensichtlich sind, ist eine Begrenzung der Erfindung auf die oben beschriebenen besonderen Ausführungs beispiele nicht beabsichtigt. Weiterhin kann die offenbarte Erfindung in Abwesenheit eines beliebigen Elements, das nicht insbesondere in der Beschreibung offenbart ist, durchgeführt werden. Der Schutzbereich der Erfindung ist durch die nachfolgenden Patentansprüche bestimmt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aktivierung von Faktor II zu Faktor II_a, unter Verwendung von Faktor X und Faktor V, wobei alle die Faktoren II, V und X aus einer einzigen unreinen Proteinfraktion gereinigt werden, das folgendes umfasst:
Verdünnen von Faktor II in einem Aktivierungspuffer, um eine Faktor-II-Lösung bereitzustellen, wobei der Faktor II durch das Verfahren zubereitet wird, das folgendes umfasst:
Bereitstellen einer wässerigen Lösung der unreinen Proteinfraktion, die aus den Faktoren II, V und X besteht;
In Kontakt bringen der wässerigen Lösung mit einem ersten Liganden, um die Faktoren II, V und X an den ersten Ligand zu binden;
Wiedergewinnen einer Proteinfraktion mit den Faktoren II, V und X von dem ersten Liganden;
Hinzufügen von Bariumchlorid zur wiedergewonnenen Proteinfraktion der Faktoren II, V und X, um eine Bariumfällung bereitzustellen, die aus den Faktoren II und X und einem Bariumüberstand besteht, der den Faktor V enthält;
Lösen der Bariumfällung in einer wässerigen Lösung, um eine die Faktoren II und X enthaltende Lösung zu gewinnen;
Anwenden der, die Faktoren II und X enthaltenden, Lösung auf ein chromatographisches Harz, das mit einem zweiten Liganden gekoppelt ist, der den Faktor X bindet, aber der den Faktor II schwach oder überhaupt nicht bindet; und
Wiedergewinnen des Faktors II aus den Fraktionen, die an dem den Faktor X bindenden, sulfatierten Polysaccharid-Liganden ungebunden, oder schwach gebunden, bleiben;
Hinzufügen des den Faktor V enthaltenden Bariumüberstands zur Faktor-II-Lösung, um eine Faktor-II-/Faktor-V-Lösung bereitzustellen;

Hinzufügen des Faktors X_a zu der Faktor-II-/Faktor-V-Lösung, um eine Faktor-II/Faktor-V/Faktor-X_a-Lösung bereitzustellen, wobei der Faktor X_a zubereitet wird durch: Wiedergewinnen des Faktors X aus dem zweiten Liganden der Faktor-II-Zubereitungsprozedur; und
Aktivieren des Faktors X durch spezifische proteolytische Spaltung;
Hinzufügen von Phospholipidmembranen und Calciumionen zur Faktor-II-/Faktor-V-/Faktor-X_a-Lösung; und
Inkubieren der resultierenden Lösung ab Raumtemperatur auf 30°C zum Aktivieren des Faktors II zu Faktor II_a.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der erste Ligand ein DEAE-Ligand ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Faktor-II-, V- und X-Proteinfraktion aus dem DEAE-Liganden durch Eluieren mit etwa 0,2 M NaCl wiedergewonnen wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Faktor-II-, V- und X-Proteinfraktion durch Hinzufügen von Bariumchlorid zu einer endgültigen Konzentration von etwa 0,1 M bis ca. 0,2 M ausgefällt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der zweite Ligand aus Dextransulfat oder Heparin ausgewählt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Faktor X durch Eluieren mit 0,2 M NaCl von dem zweiten Liganden wiedergewonnen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Faktor X durch Inkubieren mit "Russells" Vipergift in Gegenwart von Calciumionen aktiviert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Phospholipidkonzentration etwa 5 bis etwa 50 nmol/ml beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Calciumkonzentration etwa 2 bis etwa 20 mM beträgt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

