

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146855 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **0364/77**

(51) Int.Cl.³: **C 07 G 7/00**
A 61 K 37/04

(22) Indleveringsdag: **28 jan 1977**

(41) Alm. tilgængelig: **31 jul 1977**

(44) Fremlagt: **23 jan 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: **30 jan 1976 US 653973**

(71) Ansøger: ***INSTITUT MERIEUX; 69002 Lyon, FR.**

(72) Opfinder: **Edward *Shanbrom; US.**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et koncentrat af faktor VIII af meget stor renhed**

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et koncentrat af faktor VIII af meget stor renhed, som er i det væsentlige fri for pyrogene materialer og fremmede forurenende proteiner, især fibrinogen, ud fra en plasmaopløsning, et rensset koncentrat af faktor VIII indeholdende pyrogene materialer eller en opløsning af kryobundfald af plasma i en stødpude, fra hvilken opløsning fibrinogenet er blevet fjernet på kendte måder, f.eks. udfældet selektivt ved tilsætning af ca. 4 rumfangsprocent polyol, og faktor VIII koncentreret i opløsningen ved pH på ca. 7,0 ved at hæve koncentrationen af polyol.

DK 146855 B

Der kendes flere forskellige fremgangsmåder til fremstilling af antihæmofilfaktor (AHF eller faktor VIII) med henblik på en terapeutisk anvendelse, f.eks.: Selektiv fældning, absorption og fraktioneret eluering, ekstraktion i svagt ionisk medium og kromatografi. De kemiske stoffer, der hyppigst anvendes til fældningen, omfatter alkohol, garvesyre, ammoniumsulfat, glycin og polyethylenglycol. Selv om rensningen af faktor VIII indebærer fjernelse af et vist antal andre plasmaproteiner, er fibrinogen langt det vigtigste af disse proteiner og det mest generende, især når det er denatureret ved fremgangsmåder, såsom fældning med alkohol, frysning og optøning. Dette denaturerede fibrinogen generer filtreringen af AHF, fremkalder betydelige tab af AHF under rensningstrinnene og formindsker opløseligheden af det lyofiliserede produkt i rekonstitutionsvæsken. Alle fremgangsmåder til rensning af AHF nødvendiggør således fjernelse af betydelige mængder fibrinogen. De ovenfor beskrevne selektive fældningsmetoder er beregnet herpå, men alle har de den ulempe at denaturere fibrinogenet og AHF endnu mere eller at forårsage uønskede tab af AHF.

Fremgangsmåderne, ved hvilke der benyttes simpel fældning i kulden uden kemiske midler (kryofældning), er begrænset til fremstilling af små mængder faktor VIII, sædvanligvis i blodbankerne, og resulterer i forhøjede mængder fibrinogen i blodet ved den terapeutiske anvendelse, hvilket betragtes som uønsket af nogle eksperter.

Fremgangsmåderne, som indebærer ekstraktion af faktor VIII ud fra kryoudfældningen i stødpuder med svag ionstyrke, stadig under formindskelse i en vis grad af indholdet af fibrinogen i slutproduktet, giver desuden et uønsket højt indhold af protein, som nødvendiggør et specialudstyr og centrifugeringsmetoder, er begrænset med hensyn til den samlede mængde AHF, som kan ekstraheres af kryobundfaldet uden at skade rensningen.

Andre problemer, der almindeligvis står i forbindelse med fremstilling af AHF i stor målestok, er især forureningen af slutproduktet med pyrogene stoffer, isohæmaglutininer og virus, som fremkalder hepatitis (hepatitisassocieret antigen HAA). Visse kemiske fældemidler begunstiger tilstedeværelsen af uønskede forureninger. Polyethylenglycol anvendes i øjeblikket almindeligt til fremstilling af koncenterater af faktor VIII med stor renhed, men denne teknik benytter så høje koncentrationer af polymer, at afsluttende vasketrin og genudfældningstrin er nødvendige for fra slutproduktet at fjerne de

overskydende mængder polyethylenglycol. Sådanne fremgangsmåder er beskrevet f.eks. i beskrivelserne til U.S.A. patent nr. 3682881 og dansk patentansøgning nr. 443/74. Disse fremgangsmåder fører så til nye uønskede tab af AHF. Litteratur om dette emne er M. Wickerhauser, large-scale fractionation of Factor VIII - Concentrate from cryoethanol precipitate Thromb-Diath.Haemorrh.Suppl.43, 165 (1971) (reference 1), E.Shanbrom & L.Fekete, Production of stable high-potency human AHF using polyethylene glycol and glycine to fractionate a cryoprecipitate of AHF concentrate, U.S.patent nr. 3.631.018 (reference 2), J.T.Sgouris og M.Wickerhauser, Use of frozen cryoprecipitate for the preparation of clinical Factor VIII concentrate, Transfusion, 13, 399, 1973 (reference 3), Newman, A.J.Johnson, M.H.Karpatkin og S.Puszkun, Methods for the production of clinically effective intermediate and high-purity Factor VIII concentrates, Brit.J.Haemat, 1971, 21, nr. 1 (reference 4), L.F.Fekete og S.L.Holst, Stabilization of AHF using Heparin, U.S.patent nr. 3.803.115 (reference 5).

Den her beskrevne fremgangsmåde eliminerer i praksis de ovennævnte problemer, medfører ikke de ulemper, der står i forbindelse med de tidligere beskrevne metoder til kemisk udfældning, og er baseret på den simple fremgangsmåde bestående i selektiv udfældning i kulden af fibrinogen, dets denatureringsprodukter og nedbrydningsprodukter og selektiv koncentration af faktor VIII med små mængder polyol, f.eks. polyethylenglycol eller polyolen Pluronic[®]. Eliminering af fibrinogen medfører, som forklaret i det følgende, ligeledes eliminering af dets denatureringsprodukter og nedbrydningsprodukter.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et koncentrat af faktor VIII af meget stor renhed, som er i det væsentlige fri for pyrogene materialer og fremmede forurenende proteiner, især fibrinogen, ud fra en plasmaopløsning, et rensat koncentrat af faktor VIII indeholdende pyrogene materialer eller en opløsning af kryobundfald af plasma i en stødpude, fra hvilken opløsning fibrinogenet er blevet fjernet på kendte måder, f.eks. udfældet selektivt ved tilsætning af ca. 4 rumfangsprocent polyol, og faktor VIII koncentreret i opløsningen ved pH på ca. 7,0 ved at hæve koncentrationen af polyol, er ejendommelig ved, at der tilsættes en polyol op til en koncentration på ca. 6% til en stødpudeopløsning af faktor VIII, hvilken stødpudeopløsning indeholder 1-3% proteiner og har en pH på 6,8-7,2, og opløsningen holdes ved en temperatur på ca. 0 til ca. 5°C, indtil der dannes et bundfald, hvorefter dette bundfald af faktor VIII genopløses i en stødpudeopløsning til dannelsen af

koncentratet, som eventuelt renses yderligere ved, at koncentratet holdes ved en temperatur på ca. 0,5 til ca. 5°C i en periode på ca. 12 til ca. 24 timer, hvorefter bundfaldet fjernes.

Selektiv eliminering af fibrinogen uden dermed forbundet tab af faktor VIII har generelt ikke været udført tidligere som praktisk metode til fremstilling i stor målestok af et rensat koncentrat af AHF. Wickerhauser understreger faktisk betydningen af at begrænse varigheden og temperaturen ved ekstraktionen af AHF: "Lidt større udbytter af AHF opnås ved forlænget ekstraktion i stødpuden tris ved 30°C i mere end 60 minutter, men ekstrakten er mere og mere forurennet med fibrinogenaggregater, hvilket gør det endelige koncentrat vanskeligt at filtrere".

En teknik, der anvender selektiv udfældning af fibrinogen ved lav temperatur til fremstilling i stor målestok med et forhøjet udbytte af koncentrat af faktor VIII med stor renhed, er genstand for ansøgning nr. 3570/76 (reference 7). Det er anført, at præparatet kunne raffineres og koncentreres yderligere ved at anvende en udfældning med polyethylenglycol (PEG) i kulden.

Indtil for nylig nødvendiggør alle fremgangsmåderne, der anvender PEG til fremstilling af koncentrat af AHF et yderligere vasketrin og/eller genudfældningstrin med glycin eller alkohol, fordi den polymere anvendes i høj koncentration (10-12%), (se de ovennævnte referencer). Man har for nylig anvendt den idé at udfælde i kulden med PEG. C. Vermeer, B.A.M. Soute og H.G.J. Brummelhuis: Improvement of the preparation of Factor VIII Concentrates. Proc. of Int. Soc. Haemostasis and Thrombosis, Paris, juli 1975 (reference 8). Den koncentration af PEG, der anvendes til at udfælde fibrinogenet, er imidlertid kun 2 1/2%, hvilket fører til, at der fås et mindre rent produkt. Forfatterne har endvidere ikke anset koncentrationen af proteinerne for vigtig, men de har anvendt mandelat (et salt af mandelsyre) for at undgå en irreversibel udfældning af fibrinogen, og har derfor fået et produkt, der er betydeligt mindre rent, og et mindre udbytte. På lignende måde anven-

der fremgangsmåden ifølge Shanbrom og Fekete (ovenstående artikel) en relativ lille koncentration af proteiner under udfældningstrinnene med PEG, dvs. i rumfang bundfald i 10 rumfang opløsende stødpude, og dette fører til et meget lille udbytte og en begrænset renhed. Disse forfattere har ligesom Johnson med flere (reference 4) og Johnson med flere "Antihemophilic factor prepared from blood plasma using polyethylene glycol, U.S. patent nr. 3.652.530 (reference 6) anvendt 10-12% PEG til den endelige koncentration af AHF, hvilket har nødvendiggjort et supplerende opløsningstrin og genudfældningstrin med glycin eller med ethanol i kulden for at nedsætte indholdet af PEG i slutproduktet.

Et andet bevis for at koncentrationen af proteiner og udfældningen med PEG i kulden er vigtige og fører til et originalt produkt ligger i den omstændighed, at de ufuldstændige isohæmagglutiner (antistoffer) praktisk taget elimineres, hvorved undgås risikoen for hæmolytiske reaktioner, som kunne dukke op, når massive injektioner af koncentreter, der faktisk findes i handelen, er nødvendige. (Se: R.A. Seeler, M. Telischi, P.L. Langehennig og J.B. Ashenhurst: Anti-A and Anti-B titers in coagulation concentrates. Abst. Of Int. Soc. of Blood Transf., Helsinki, 1975, (reference 9)).

En anden ejendommelighed ved produktet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er den høje renhedsgrad (d.v.s. det lave indhold af protein), især hvad angår den målelige mængde fibrinogen. Denne høje renhedsgrad giver et meget opløseligt produkt, faktisk så opløseligt, at der ikke er noget uopløst materiale tilbage i flasken efter rekonstitution. Dette eliminerer behovet for at anvende et specialfilter eller en filterkanyler for at fjerne protein, der ikke er opløst før injektionen i patienten. Man undgår således forurening af koncentratet af faktor VIII med metalpartikler (I.A.Couper, J.H.McAdam, M.S.MacKenzie og J.F.Davidson: Contamination of Factor VIII Concentrates with metal particles, Lancet, december 21, 1974, side 1515 (reference 10)).

Den beskrevne fremgangsmåde eller en del af den er ligeledes anvendelig til genbehandling af pyrogene partier af koncentrat af faktor VIII fremstillet ved alle andre fremgangsmåder, idet den omdanner den uanvendelige kostbare pyrogene faktor VIII til et værdifuldt terapeutisk middel. Det genbehandlede produkt befries for pyrogent materiale, enten i et enkelt trin ved fældning i kulden med 6% PEG eller i to trin ved den fremgangsmåde, der er beskrevet i enkeltheder i den foreliggende ansøgning.

De uventede og stærkt forbedrede resultater, der opnås, og som er beskrevet i den foreliggende ansøgning, står i modstrid med den tidligere kendte tekniks lære og er opdaget mere ved en tilfældighed end ved systematisk undersøgelse.

Den foreliggende opfindelse er en specifik fremgangsmåde til fremstilling i stor målestok af et koncentrat af faktor VIII med meget stor renhed. Blandt det mest karakteristiske ved opfindelsen kan nævnes den selektive udfældning af overskudsmængder af fibrinogen og denatureringsprodukter og nedbrydningsprodukter, fjernelse af andre uønskede proteiner såsom isohæmaglutininer og koncentration i et enkelt trin af faktor VIII ved fældning i kulden med en polyol uden uønsket tab af AHF-aktivitet. Andet bemærkelsesværdigt er det overraskende store udbytte af faktor VIII på 20-40% af den teoretisk anvendte plasmamængde. Til trods for det forøgede udbytte af AHF, er indholdet af protein endvidere formindsket på bemærkelsesværdig måde, især indholdet af fibrinogen sammenlignet med andre produkter. Dette er illustreret i nedenstående tabel. Behovet for et højere udbytte af koncentreret lyofiliseret AHF med stor renhed er universelt anerkendt og har fået opmærksomhed på internationalt plan. Man kan her nævne: Recent Advances in Hemophilia. Ann. New York, Acedemi of Science 240, 1975, (reference 11), J.G. Pool: Recent chapters in the Factor VIII saga: perils of a protein. West J. of Med., 122:406, 1975 (reference 12), og det indrømmes alment, at de i handlen værende koncenterater sædvanligt giver mindre end 20% af den AHF, der teoretisk findes i plasmaen, medens udbytterne af de højt rensede produkter er endnu lavere (reference 11, side 156 og 208, og referencerne 5 og 8).

I nedenstående tabel er de anførte data med undtagelse af de, der vedrører resultaterne fremkommet ved fremgangsmåden ifølge ansøgningen, hentet fra artiklen af Robert Breckenridge: "Recent advances in hemophilia" Ann. New York, Academi of Science, 240, 1975.

Tabel 1.

Egenskaber af koncenterater af faktor VIII (a)

Produkt	Enheder af faktor VIII/ml	Totalt rumfang administreret (ml)	Totalt enheder af faktor VIII	Totalt proteiner (g)	Kilde
Frisk fros- sen plasma	0,5	8000	4000	240	Blodbank
Kryoudfæld- ning	10 (b)	400	4000	20	Blodbank
Faktor VIII	10	400	4000	14	Armor Pharmaceu- tical
AHF	10	400	4000	20	Abbott Laboratory
Hemofil	25	160	4000	5,6	Hyland
AHF	10	400	4000	6,0	(d)
AHF	10	400	4000	2,0	(e)

- a) Tallene er baseret på erfaringer fra Hemophilia Center of Rochester and Monroe County og er udtrykt i totale mængder nødvendige til at behandle en patient på 70 kg, henført til én enhed pr. ml. De forudsætter en udnyttelsesgrad på 80% in vivo.
- b) Variabel, men sædvanligvis mellem 7 og 12 µ/ml.
- d) Produkt beskrevet i ansøgning nr. 3570/76.
- e) Produkt som beskrevet i den foreliggende ansøgning.

Stødpuderne er citratstødpuder.

Polyolerne, der er anvendelige, omfatter polyethylenglycoler, især polyethylenglycol 4000, og sekvenscopolymerer af typen α -hydroxy- ω -hydroxy, poly (oxyethylen) poly (oxypropylen) poly (oxyethylen). Blandt disse sekvenscopolymerer kan især nævnes de, der betegnes med navnet Pluronic[®] (WYANDOTTE CHEMICALS og UGINE KUHLMANN), og især Pluronic[®] F68, som er en copolymer, der har følgende egenskaber: Molekylvægt af den grundlæggende poly (oxypropylen) gruppe: ca. 1750 vægt% poly (oxyethylen): ca. 80%.

Udfældning af faktor VIII i nærværelse af 6% polyol udføres fortrinsvis ved pH 6,8-7,2,

Den indledende udfældning af fibrinogen i nærværelse af 4% polyol udføres fortrinsvis ved pH 6,0-6,5 og ved en temperatur på ca. 20-30°C.

Opløsningen, som skal renses, indeholder fortrinsvis 2 til 3% protein.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres fortrinsvis på den måde, at rumfangsforholdet mellem kryobundfald og stødpude er ca. 1 til ca. 3.

De følgende eksempler illustrerer opfindelsen.

Eksempel 1.

Frossen plasma, f.eks. 100 til 3000 liter ved en temperatur på ca. -5°C optøs ved ca. +2°C og optages i en passende beholder. Man kan behandle større rumfang, men operationerne vil blive vanskeligere. Den i kulden uopløselige fraktion (kryobundfaldet) opsamles, fortrinsvis i en kontinuerlig centrifuge (Sharpless-centrifuge eller lignende apparat) ved en temperatur under 3°C. Andre opsamlingsmetoder kan anvendes, men er mindre effektive. Kryobundfaldet vejes, skæres i småstykker eller blandes i en blander af Waring-typen i nogle sekunder for at fremstille en pasta eller emulsion. Disse styk-

ker af kryobundfald eller denne pasta opløses så i 2 til 4 rumfang stødpude dannet af 0,02 M trinatriumcitrat, 0,1 M glycin, og man indstiller pH-værdien til 6,9 med citronsyre ved en temperatur på 20 til 30°C. Efter fuldstændig opløsning udfældes fibrinogenet selektivt ved tilsætning af 4% polyethylenglycol 4000 eller Pluronic® F-68 ved pH 6,0 til 6,5 og en temperatur på ca. 25°C. Bundfaldet fjernes ved kontinuerlig centrifugering i et apparat af Sharpless-typen, og den overliggende væske indstilles til en pH-værdi på 6,8 til 7,2. En supplerende mængde på 2% PEG eller Pluronic® F-68 tilsættes, og suspensionen afkøles til 0-5°C, indtil der danner sig et synligt bundfald.

Man anvender en dobbeltvægget reaktionsbeholder til alle trinnene med genopløsning og udfældning under omrøring, idet der drages omsorg for at undgå skumning.

Det andet udfældningstrin foretages ved kontinuerlig centrifugering ved 1-2°C, og man fjerner den overliggende væske. Man opløser derefter bundfaldet i en stødpude af glycerin-citrat eller en citratstødpude, idet rumfanget afhænger af kvaliteten af kryobundfaldet og antallet af enheder af AHF, der findes i udgangsopløsningen. De to metoder til at beregne dette rumfang er følgende:

1. Det endelige bundfald opløses i et rumfang stødpude, der er lig med en hundrededel af rumfanget af den oprindelige plasma.
2. Det endelige bundfald opløses i et rumfang stødpude, der er 15-25 gange vægten af bundfaldet.

Opløsningen indstilles så til en pH-værdi på 6,7-6,9 ved hjælp af citronsyre, klares og steriliseres så ved at føre væsken gennem filtre med mikroporemembraner (filterhøjde 293 mm eller ækvivalent filterpatron), der har f.eks. porer med en diameter på 1,2-0,65-0,45 og 0,3 mikron. Den fremkomne sterile opløsning indeholdende ca. 20-40% af faktor VIII i udgangsplasmaen lyofiliseres på sædvanlig måde med henblik på lagring.

Man kan anvende varianter af fremstillingsteknikken ved at benytte især genfrossen kryobundfald eller varianter af Cohn's fraktion I, selv om udbyttet af faktor VIII under sådanne betingelser er mindre og afhænger af koncentrationen i udgangsmaterialet. Genopløsningen eller den indledende ekstraktion af AHF kan bevirkes i destilleret vand eller i stødpuder med svag ionstyrke, såsom stødpuden tris. Afkølingstiden kan ligeledes variere og enten forøges eller foretages på serievis, uden at der afviges fra opfindelsen. Ligeledes kan den indledende ekstraktionstid forøges til 24 timer i den beskrevne fremgangsmåde. Desuden kan fremgangsmåden afbrydes på ethvert trin og genoptages en anden dag. Alle disse varianter kan bevirke en vis formindskelse af det samlede udbytte af AHF fra udgangsplasmaen.

Eksempel 2.

Pyrogene partier af koncentrat af faktor VIII med middelrenhed fremstillet på alle andre fremgangsmåder, såsom ekstraktion med stødpude af svag ionstyrke, udfældning med glycin, udfældning med PEG osv. kan behandles efter det skema, der er vist i eksempel 1. Lyofiliserede flasker rekonstitueres i et rumfang vand, der er fri for pyrogener, og som er tilstrækkelig til at fremstille et indhold af proteiner på 1-3 %, og flaskernes indhold forenes derefter i en beholder og underkastes igen behandling efter de trin, der er vist i eksempel 1.

Hvis pyrogenmængden kun er moderat forhøjet, og hvis produktet allerede har en forøget renhed, kan som en variant et enkelt udfældningstrin være tilstrækkeligt. Flaskerne rekonstitueres som ovenfor beskrevet, og man tilsætter 6% PEG ved en pH-værdi på 6,8-7,2 og en temperatur på 0-5°C. Det dannede bundfald behandles derefter som før, og den overliggende væske indeholdende det opløseliggjorte pyrogene materiale fjernes.

Eksempel 3.

Fremgangsmåden udføres som beskrevet i eksempel 1.

Før udførelsen af de endelige filtreringstrin anbringes produktet imidlertid i et koldt kammer ($0,5$ til 5°C), og man lader det henstå i 12-24 timer. Det hvide flokkulerende materiale, som dannes efter denne hvileperiode, fjernes ved dekantering, centrifugering eller filtrering og bortkastes. Slutproduktet steriliseres ved filtrering som tidligere beskrevet og underkastes de samme lyofiliseringsprocesser. Dette produkt er endnu mere rensset end de foregående produkter, og derfor lettere at filtrere. Der fås intet tab af faktor VIII på grund af dette supplerende trin.

De fremkomne produkter kan lagres ved $+5^{\circ}\text{C}$ i en længere periode på 1 til 2 år og kan rekonstitueres i destilleret vand eller en fysiologisk serum. På grund af den meget store renhed og det yderst lille indhold af fibrinogen, kan det lyofiliserede produkt opløses meget hurtigt (1-2 minutter). Da den samlede behandlingstid er meget kort sammenlignet med andre fremstillingsmetoder fra det øjeblik, hvor plasmaposen åbnes, er bakterieudviklingen begrænset. Den omstændighed, at den indledende opløsning udføres i små mængder af kun stødpude, formindsker den mængde γ -globulin, som kan komme ind i opløsningen, og den optimale udfældning af overskud af fibrinogen sker ved anvendelse af en koncentration af polyol på 4%. Endvidere indeslutter det tunge flokkulerende bundfald af fibrinogen sandsynligvis det pyrogene materiale, som er til stede, og nedsætter mængderne af hepatitisassocieret antigen (HAA eller hepatitisvirus). Ved kun at anvende 6% polyol til udfældningstrinnet i kulden, bliver de uønskede proteiner, især isohæmaglutininernerne, som kan være blevet opløst selv i de mindre rumfang stødpude, ikke udfældet med AHF og fjernes sammen med den overliggende væske. Man får således et produkt, der er 200 til 400 gange rensset i forhold til plasmaen, og som indeholder meget lidt fibrinogen og isohæmaglutininerner. Koncentraterne af faktor VIII fremstillet med meget større rumfang stødpude til ekstraktionen, f.eks. 10 rumfang (reference 2), frembyder ikke samme renhedsgrad eller samme udbytte af AHF (referencerne 1, 2, 3, 4, 8), sandsynligvis på grund af, at det optimale forhold mellem protein og polymer til medudfældning ikke opnås. Hvis man ønsker det, kan dette produkt stadig renses og koncentrerer ved kendte metoder eller nye metoder. En stor fordel ved den foreliggende opfindelse ligger i den omstændighed, at man kan udføre fremstillingen i stor målestok af AHF, der er meget ren, på halvdelen eller to trediedele af den tid, der kræves ved de andre fremgangsmåder.

De foregående eksempler er de optimale fremgangsmåder, der kendes i øjeblikket til udførelse af opfindelsen. Det er imidlertid klart, at opfindelsen kan udføres ved anvendelse af sædvanlig behandlingsteknik og sædvanlige materialer i overensstemmelse med opfindelsens principper. Selv om det f.eks. ikke generelt er økonomisk at begynde med mindre end ca. 100 liter plasma eller kryobundfald fra denne mængde plasma, er det klart ikke nogen ulempe at anvende større eller mindre mængder end de rumfang, der er vist i eksemplerne, og varianter med 50% eller lignende af disse værdier vil ikke være skadelig for opfindelsen. Fremgangsmåderne i det optimale eksempel udføres ved anvendelse af kendte anlæg, der er let tilgængelige, såsom en Sharpless-centrifuge, en Waring-blender osv., men det er klart, at disse trin i sig selv isoleret fra opfindelsens princip og de indbefattede anlæg ikke er væsentlige, og et stort antal varianter står til fagmandens disposition, uden at der afviges fra opfindelsen. Når først man har fået konzentratet indeholdende faktor VIII i et godt udbytte, behandler man det på sædvanlig måde med henblik på lagring og rekonstitution. For eksempel klares og steriliseres det gennem et standardfilter med mikroporer, lyofiliseres for at koncentrere faktor VIII, og et lille rumfang, der let kan lagres, rekonstitueres ved at anvende sædvanlige væsker, f.eks. pyrogenfrit destilleret vand eller en fysiologisk serum.

Opfindelsen er ikke begrænset af enkelthederne ved fremgangsmåden, der er givet som eksempler. Det fremkomne produkt har originale egenskaber, der er gavnlige for patienten, og som er forskellige fra egenskaberne af alle andre konzentratere af faktor VIII, der fabrikeres:

- 1) Højere renhed og derfor større specifik aktivitet.
- 2) Større opløselighed for så vidt angår hastigheden og den endelige opløselighed, hvilket gør det ideelt til behandling i nødstilfælde.
- 3) Det meget lavere indhold af protein, hvilket formindsker uønskede sekundære reaktioner.
- 4) Det mindre indhold af immunoglobuliner, hvilket formindsker allergiske reaktioner.

- 5) Indholdet af isohæmaglutininer er negligeabelt, hvilket eliminerer hæmolytiske reaktioner.
- 6) Det lavere indhold af fibrinogen, hvilket formindsker komplikationer med hyperfibrinogenemi.
- 7) En filterkanyle er ikke nødvendigt, og faren for tilstedeværelse af fremmedpartikler er derfor fjernet.
- 8) Fjernelsen af pyrogenerne under processen bevarer anvendeligheden af faktor VIII.

Eksempel 4

Man opløser 696 g delvis rensset faktor VIII indeholdende pyrogener i 16 liter destilleret vand.

Udgangsproduktet faktor VIII indeholder:

350 g proteiner totalt.

529.426 internationale enheder faktor VIII, dvs. 1512 μ /g PT (dvs. 1512 internationale enheder pr. gram proteiner totalt.

Man indstiller pH-værdien til 6,9 ved tilsætning af 13 ml af en normal natriumhydroxidopløsning.

Man tilsætter derefter under omrøring polyethylenglykol 4000 til en koncentration på 6%.

Man afkøler opløsningen til +2°C og holder den ved denne temperatur i 30 minutter.

Derefter centrifugeres, og man opsamler bundfaldet, 436 g, som genopløses i citratstødpude.

Efter steriliserende membranfiltrering fås 16 liter opløsning indeholdende 20,6 μ /ml, dvs. ialt 329.600 enheder af faktor VIII. Man foretager de klassiske prøver, som viser, at pyrogener er fraværende.

Den fremkomne opløsning indeholder:

170,6 g proteiner totalt.

Udbyttet af enheder af faktor VIII er derfor 62%, medens udbyttet af totale proteiner er 49%, hvilket svarer til en rensning af faktor VIII.

Formindskelsen af indholdet af totale protiner i forbindelse med fjernelsen af pyrogener viser betydningen af denne enkelte behandling med 6% polyethylenglykol til rensning af faktor VIII.

Eksempel 5-7

I disse eksempler er udgangsproduktet et kryobundfald.

Man underkaster udgangsopløsningen en indledende behandling med 2% polyethylenglykol, fjerner bundfaldet ved centrifugering og tilsætter derpå polyethylenglykol til væsken til en koncentration på 6% og opsamler ved centrifugering det dannede bundfald, som man genopløser i en citratstødpude med henblik på endelig lyofilisering.

Egenskaberne af udgangsproduktet, mellemproduktet og slutproduktet er vist i følgende tabel.

	Eksempel 5	Eksempel 6	Eksempel 7
<u>1) Fremstilling af udgangsoopløsning</u>			
Vægt af kryobundfald	224 g	164 g	487 g
Rumfang af citratstødpudeopløsning	627 ml	492 ml	1461 ml
Total rumfang	889 ml	671 ml	1907 ml
Analyse af udgangsoopløsning:			
Faktor VIII	10,6 µ/ml	10 µ/ml	12 µ/ml
Proteiner	29,37 g/l	29 g/l	31 g/l
Fibrinogen (middel)	19,5 g/l	24,5 g/l	21,5 g/l
Specifik aktivitet pr. g PT	362 µ	340 µ	394 µ
<u>2) Første udfældning</u>			
pH-indstilling	6,3	6,3	6,3
% tilsat PEG	2%	2%	2%
Temperaturindstilling	+2°C	+2°C	+2°C
Rumfang efter centrifugering	800 ml	570 ml	1670 ml
Analyse af væske			
Faktor VIII	6,1 µ/ml	6,1 µ/ml	8 µ/ml
Totale proteiner (PT)	7,1 g/l	5,7 g/l	7,4 g/l
Fibrinogen (middel)	0,9 g/l	0,75 g/l	0,95 g/l
Specifik Aktivitet pr. g PT	839 µ	1070 µ	1081 µ
<u>3) Udfældning med 6% PEG</u>			
pH-indstilling	6,9	6,9	6,9
Temperatur	+2°C	+2°C	+2°C
Væskerumfang	740 ml	570 ml	1730 ml
Vægt af udfældet PEG	5 g	6,5 g	14 g
<u>4) Fremstilling af opløsning til lyofilisering</u>			
Rumfang af opløsning i stødpude	94 ml	93 ml	280 ml
Analyse af opløsning			
Faktor VIII	40,5 µ/ml	28 µ/ml	24,7 µ/ml
Totale proteiner	9,25 g/l	7,25 g/l	5,95 g/l
Fibrinogen	3,8 g/l	2,5 g/l	2,7 g/l
Specifik Aktivitet pr. g PT	4324 µ	3860 µ	4151 µ
Vægt af fibrinogen (mg) til 1000 µ			
Faktor VIII	93,8	89,2	109

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et koncentrat af faktor VIII af meget stor renhed, som er i det væsentlige fri for pyrogene materialer og fremmede forurenende proteiner, især fibrinogen, ud fra en plasmaopløsning, et rensat koncentrat af faktor VIII indeholdende pyrogene materialer eller en opløsning af kryobundfald af plasma i en stødpude, fra hvilken opløsning fibrinogenet er blevet fjernet på kendte måder, f.eks. udfældet selektivt ved tilsætning af ca. 4 rumfangsprocent polyol, og faktor VIII koncentreret i opløsningen ved pH på ca. 7,0 ved at hæve koncentrationen af polyol, k e n d e t e g n e t ved, at der tilsættes en polyol op til en koncentration på ca. 6% til en stødpudeopløsning af faktor VIII, hvilken stødepudeopløsning indeholder 1-3% proteiner og har en pH på 6,8-7,2, og opløsningen holdes ved en temperatur på ca. 0 til ca. 5°C, indtil der dannes et bundfald, hvorefter dette bundfald af faktor VIII genopløses i en stødpudeopløsning til dannelselse af koncentratet, som eventuelt renses yderligere ved, at koncentratet holdes ved en temperatur på ca. 0,5 til ca. 5°C i en periode på ca. 12 til ca. 24 timer, hvorefter bundfaldet fjernes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en udgangsopløsning, som har et proteinindhold på 2-3%.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at kilden til faktor VIII er et kryobundfald opløst i ca. 2 til ca. 4 gange sit rumfang stødpude.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at rumfangsforholdet mellem kryobundfald og stødpude er ca. 1 til ca. 3.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 443/74

US patenter nr. 3652530, 3682881.