

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

**AT 408 443 B**

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 866/98  
(22) Anmeldetag: 20.05.1998  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.04.2001  
(45) Ausgabetag: 26.11.2001

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C07K 14/755**  
//B01J 39/00, 39/04

(30) Priorität:  
27.02.1998 WO PCT/AT98/00043 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:  
P. HARRISON ET AL., THROMB. RES. 1988, 50(2),  
SEITEN 295-304  
DE 3504385A1

(73) Patentinhaber:  
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:  
LINNAU YENDRA DR.  
WIEN (AT).  
SCHÖNHOFER WOLFGANG DIPL.ING.  
ST. PÖLTEN, NIEDERÖSTERREICH (AT).

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON GEREINIGTEM FAKTOR VIII:C/vWF-KOMPLEX

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII:C/vWF-Komplex aus Plasma oder einer Plasmafraktion durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher, wobei der Faktor VIII:C/vWF-Komplex mit einer mindestens 300-fachen Reinheit bezogen auf Plasma und einer Ausbeute von mindestens 50% des Faktor VIII:C und vWF gegenüber Kryopräzipitat oder analoger Plasmafraktionen erhalten wird.

**AT 408 443 B**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII:C/vWF-Komplex aus Plasma oder einer Plasmafraktion durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher.

5 Zur Therapie von Hämophilie-Erkrankungen werden Faktor VIII-Präparate seit mehr als 30 Jahren eingesetzt. Der Faktor VIII:C/vWF-Komplex besteht aus zwei Molekülen, dem Antihämophilie-Faktor (Faktor VIII:C) und dem von Willebrand-Faktor (vWF). Beide Proteine werden unter der Kontrolle von verschiedenen Genen synthetisiert, zirkulieren aber im Plasma als nicht-kovalent gebundener Komplex (Faktor VIII:C/vWF-Komplex).

10 Der Antihämophilie-Faktor ist ein Glykoprotein, welches in Hämophilie A-Patienten defekt ist, bzw. fehlt. Der von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein multimeres Glykoprotein, welches in an von Willebrand-Krankheit erkrankten Patienten in reduzierter Menge oder qualitativ abnorm vorliegt. Die Plasmakonzentration von Faktor VIII:C beträgt etwa zwischen 100 und 200 ng/ml, während die Konzentration von vWF ungefähr 10 µg/ml beträgt.

15 Die Herstellung eines pharmazeutisch gut verträglichen FVIII:C/vWF-Komplexes sollte sich zum Ziele setzen, ein stabiles, vor allem aber auch ein von unerwünschten Begleitproteinen befreites Produkt zu liefern. Jede unnötige Proteinfracht birgt das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen in sich.

Im Stand der Technik sind verschiedene chromatographische Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII:C/vWF-Komplex beschrieben, beispielsweise mittels Anionenaustausch, Hydrophober- oder Affinitäts-Chromatographie.

20 Ein Verfahren zur Gewinnung des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes aus humanem Plasma unter Verwendung einer Kationenaustausch-Chromatographie ist aus der EP-0 600 480 A bekannt. Dabei werden mehrere Schritte zur Vorreinigung vorgenommen, darunter zwei chromatographische Reinigungen an einem Anionenaustauscher, die Kationenaustausch-Chromatographie wird terminal durchgeführt. Bei der mehrstufigen Reinigung werden erhebliche Aktivitätsverluste in Kauf genommen.

30 In der US-5 278 289 A ist ein Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem und stabilisiertem Faktor VIII aus einer biologischen Probe beschrieben. Dabei wurde die biologische Probe auf eine Kationenaustauscher-Säule aufgetragen, wobei aber nur ein unvollständig gereinigtes Protein erhalten wurde. Die vollständige Reinigung wird erst durch die nachgeschaltete Anionenaustauscher-Säule erzielt. Das Produkt enthält FVIII:C, der durch Dissoziation des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes erhalten wurde.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, den Faktor VIII:C/ vWF-Komplex bzw. eine Faktor VIII:C/vWF-Komplex-Präparation durch ein einfaches chromatographisches Verfahren in hoher Reinheit und gleichzeitig mit hoher Ausbeute zur Verfügung zu stellen.

35 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Herstellungsverfahren unter Einsatz der Kationenaustausch-Chromatographie zur Adsorption und Reinigung von plasmatischem Faktor VIII:C/vWF-Komplex an einem Kationenaustauscher, wobei der Faktor VIII:C/vWF-Komplex mit einer mindestens 300-fachen Reinheit bezogen auf Plasma und einer Ausbeute von mindestens 50% des FVIII:C und vWF gegenüber Kryopräzipitat oder analoger Plasmafraktionen erhalten wird.

40 Als Kationenaustauschermaterialien können bevorzugterweise handelsübliche Kationenaustauschermaterialien mit Carboxy- oder Sulfhydrylgruppen verwendet werden. Vorzugsweise können S- oder CM-Sepharose® (quervernetzte Agarose mit Sulfopropyl- oder -O-CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>-Gruppen) (Fa. Amersham Pharmacia), Fractogel® EMD-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (quervernetztes Polymethacrylat mit endständigen SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gruppen) oder COO<sup>-</sup> (Fa. Merck, Darmstadt) oder SP- oder CM-Toyopearl (Copolymerisate aus Ethylenglykol und Methacrylat-Polymeren mit -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> oder -O-CH<sub>2</sub>COOH-Gruppen) (Fa. Tosohaas) verwendet werden.

45 Als Ausgangsmaterial kann Plasma oder eine Plasmafraktion verwendet werden. Als Plasmafraktion kann beispielsweise ein Kryopräzipitat, eventuell nach vorheriger Adsorptionsbehandlung zur Entfernung von Prothrombinkomplex-Faktoren, oder eine analoge Plasmafraktion, z.B. eine Cohn-Fraktion, wie Cohn I, oder eine entsprechende Fraktion nach Pool et al. (New England Journal of Medicine 273, Seiten 1443-1447) eingesetzt werden. Gegebenenfalls kann Fibrinogen durch Fällung entfernt sein.

50 Vorzugsweise wird das Ausgangsmaterial in einem Puffer gelöst, der Kalziumionen enthält. Der Puffer kann auch Detergentien enthalten. Der elektrische Leitwert als Maß für die Ionenstärke des

Auftragepuffers beträgt im allgemeinen 0 - 10 mS, bevorzugt 6 - 8 mS. Falls der adsorbierte FVIII:C/vWF-Komplex gewaschen wird, wird dies bevorzugt mit einem Waschpuffer durchgeführt, dessen elektr. Leitwert über der des Adsorptionspuffers liegt. Die Elution des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes, der vorzugsweise nicht fraktioniert ist, wird durch diese Erhöhung der elektr. Leitwertes (und somit der Ionenstärke) erreicht. Die Leitfähigkeit des Elutionspuffers beträgt üblicherweise 10 - 100 mS, bevorzugt 25 - 60 mS. Als Elutionspuffer können z.B. Acetatpuffer, Zitratpuffer oder Histidin-hältige Puffer eingesetzt werden. Vorzugsweise wird ein Natriumchlorid-hältiger Elutionspuffer verwendet. Der pH sollte während der Reinigung etwa neutral, z.B. in einem Bereich von pH 6 - 8 gehalten werden.

Um eine etwaige Dissoziation des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes während der chromatographischen Reinigung zu verhindern, wird bevorzugt ein Puffer (z.B. als Auftrags- und/oder Elutionspuffer) mit einer Kalziumionenkonzentration von z.B. 0,5 - 10 mM verwendet.

Zur Vermeidung des Risikos der Übertragung von humanpathogenen Infektionserregern, darunter von Blut übertragbare Viren, wie HIV und Hepatitisviren, z.B. HAV, HBV, HCV, HGV und Parvoviren, aber auch die infektiösen Erreger von BSE und CJD, kann eine Reihe von Maßnahmen vorgenommen werden. Der Faktor VIII:C/vWF-Komplex kann vor oder nach der chromatographischen Reinigung einem Verfahren zur Inaktivierung bzw. Abreicherung der Humanpathogene unterzogen werden. Die Methoden unter Einsatz von viruziden chemischen Substanzen werden vorzugsweise vor bzw. während des chromatographischen Reinigungsverfahrens vorgenommen, damit gleichzeitig mit der Reinigung des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes auch das viruzide Mittel effektiv entfernt werden kann. Vorzugsweise werden mindestens zwei Maßnahmen vorgenommen, die die Inaktivierung bzw. Abreicherung der Viren aufgrund eines unterschiedlichen Mechanismus bewirken. Dazu zählen chemische, chemisch-physikalische und physikalische Methoden.

Zu den effektiven Maßnahmen zur Inaktivierung von Viren zählen beispielsweise die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Detergentien (EP-0 131 740 A, EP-0 050 061 A), die Behandlung mit chaotropen Mitteln (EP-0 431 129 A), Hitzebehandlungsverfahren, vorzugsweise in lyophilisiertem, trockenem oder feuchtem Zustand, wie in der EP-0 159 311 A beschrieben, Kombinationsverfahren, wie das der EP-0 519 901 A und physikalische Methoden. Letztere bewirken die Inaktivierung von Viren beispielsweise mit Licht, etwa in Gegenwart von Photosensibilisatoren (EP-0 471 794 A oder WO 97/37686 A).

Zu den Abreicherungsverfahren der Humanpathogene zählen insbesondere auch die Filtration unter Verwendung von Ultrafiltern, Tiefenfiltern oder Nanofiltern (AT-PS 406 873). Aber auch Fällungsschritte bzw. andere Proteinreinigungsmaßnahmen, wie die der Adsorption, tragen zur Abreicherung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen bei.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich hervorragend zur Reinigung des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes aus einer Plasmafraktion im industriellen Maßstab, da aufgrund der effektiven einstufigen Reinigung eine Vielzahl von weiteren Reinigungsschritten, wie z.B. weitere chromatographische Reinigungsschritte, nicht erforderlich sind. Gerade bei der großtechnischen Herstellung von biologischen Präparaten ist ein einfaches, einstufiges Verfahren, wie das erfindungsgemäße Verfahren, bei welchem derart hohe Ausbeuten und eine derart hohe Reinheit erzielt werden können, besonders erwünscht.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß der Faktor VIII:C/vWF-Komplex durch die einfache Kationenaustausch-Chromatographie mit einer mindestens 300-fachen Reinheit gegenüber Plasma, vorzugsweise mindestens 400-fachen Reinheit, erhalten werden kann, mit einer gleichzeitig hohen Ausbeute an FVIII:C und vWF von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, am meisten bevorzugt mindestens 65%, bezogen auf Kryopräzipitat oder analoge Plasmafraktionen. Es ist weiters bevorzugt, das Reinigungsverfahren derart zu gestalten, daß nur eine einzige chromatographische Reinigung vorgenommen wird, nämlich die an dem Kationenaustauscher.

Es hat sich gezeigt, daß die Ausbeute des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes von mehr als 50% bezogen auf die Aktivität vor der Chromatographie erhalten werden kann. Daher kann sogar während der chromatographischen Reinigung auf übliche Stabilisatoren des Faktor VIII:C/vWF-Komplexes, wie z.B. Antithrombin III und/oder Heparin verzichtet werden, ohne beträchtliche Verluste durch Denaturierung befürchten zu müssen.

Die Aktivität des Faktor VIII:C bzw. vWF wird durch die Kationenaustausch-Chromatographie

kaum beeinträchtigt. Faktor VIII:C-Aktivität kann z.B. mittels chromogenem Assay (Immunochrom® FVIII:C, Fa. IMMUNO AG) bestimmt werden. Die Aktivität des vWF kann durch einen Collagenbindungs-Test nach Thomas et al. (Haemostaseologie, 14, Seiten 133-139 (1994)) oder mittels ELISA bestimmt werden.

Zur Formulierung einer pharmazeutischen Faktor VIII:C/vWF-Komplex-Präparation wird üblicherweise diafiltriert und sterilfiltriert, sowie gegebenenfalls lyophilisiert.

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels noch näher erläutert.

### Beispiel 1:

#### Isolierung des FVIII/vWF-Komplexes über Kationenaustausch

#### Beispiel 1A:

210 g Kryopräzipitat werden in 950 ml CaCl<sub>2</sub>-heparinhaltigem Citratpuffer gelöst und auf pH 6,0 gestellt. Unlösliche Anteile, hauptsächlich Fibrinogen, wurden abtrennt. Zur Inaktivierung von eventuell vorhandenen pathogenen Viren wird die klare Lösung mit 1 % Triton X100 und 0,3 % TNBP (Tri(n-butyl)phosphat) behandelt. 100 ml Fractogel® EMD-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-650(M) der Fa. Merck, Darmstadt (DE), wird zur Adsorption des virusinaktivierten FVIII herangezogen, das zuvor bei pH 6,0 in einer acetatgepufferten NaCl-Lösung mit einem elektr. Leitwert von 10 mS/cm äquilibriert wurde. Der FVIII wird durch Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM NaCl eluiert; wobei zuvor mit 500 ml 150 mM NaCl-Lösung gewaschen wurde.

#### Beispiel 1B:

Statt Fractogel® EMD-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> wurde in diesem Beispiel Toyopearl® SP-550C verwendet.

#### Ergebnisse:

	Ausbeute/Plasma		Reinheitsgrad gegenüber
	FVIIIc	vWF	Plasma
Beispiel 1A	62 %	68 %	450 X
Beispiel 1B	56 %	62 %	370 X

FVIIIc und vWF sind in derselben Fraktion gewonnen worden.

Ausbeute in %                      Aktivität  
in Plasma

### PATENTANSPRÜCHE:

- Verfahren zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII:C/vWF-Komplex aus Plasma oder einer Plasmafraktion durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher, wobei der Faktor VIII:C/vWF-Komplex mit einer mindestens 300-fachen Reinheit bezogen auf Plasma und einer Ausbeute von mindestens 50% des Faktor VIII:C und vWF gegenüber Kryopräzipitat oder analoger Plasmafraktionen erhalten wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der FVIII:C und vWF in einer Ausbeute von mindestens 60 % gegenüber Kryopräzipitat oder analoger Plasmafraktionen erhalten wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VIII:C/vWF-Komplex mit einer Ausbeute von mehr als 50% bezogen auf die Faktor VIII-Aktivität vor der Chromatographie erhalten wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie an einem Kationenaustauscher als einzige chromatographische Reinigung vorgenommen wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Chroma-

tographie in Gegenwart von viruziden Substanzen vorgenommen wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Faktor VIII:C/vWF-Komplexes einstufig eluiert wird.

5

**KEINE ZEICHNUNG**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55