



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324659**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19994138	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.02.18 PCT/AT98/00034
(22)	Inng.dag	1999.08.26	(85)	Videreføringsdag	1999.08.26
(24)	Løpedag	1998.02.18	(30)	Prioritet	1997.02.27, AT, 337/97
(41)	Alm.tilgj	1999.08.26			
(45)	Meddelt	2007.11.26			
(73)	Innehaver	Baxter AG, Industriestrasse 67, 1221 WIEN, AT Friedrich Dörner, Peterlinigasse 17, 1230 WIEN, AT Johann Eibl, Gustav-Tschermakgasse 2, 1180 WIEN, AT Bernhard Fischer, Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien, AT Artur Mitterer, Mannsdorf, AT Christian Fiedler, Wien, AT Øyvind L. Schönberger, Wien, AT			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Utvinning av von Willebrand-faktor ved kationebytterkromatografi samt preparat inneholdende slik faktor og anvendelse derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1-469985, EP-A1-705846			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for utvinning av vWF, hvor vWF bindes på en kationebytter ved en lav saltkonsentrasjon, og vWF med høy spesifikk aktivitet erholdes ved fraksjonert eluering, samt et preparat med rensset vWF som kan erholdes ved denne fremgangsmåte.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte ved utvinning av rensset von Willebrand-faktor (vWF) ved hjelp av kationebytterkromatografi hvor fremgangsmåten er særpreget ved de trekk som går frem av krav 1's karakteriserende del. Oppfinnelsen angår også et preparat som angitt i krav 11 og anvendelse som angitt i krav 17.

- 5 I plasma sirkulerer vWF i en konsentrasjon fra 5-10 mg/l, til dels i form av et ikke-kovalent kompleks med faktor VIII. vWF er et glykoprotein som dannes i forskjellige celler av menneskets kropp og senere frigis i sirkulasjonen. Derved syntetiseres i cellene utgående fra en polypeptidkjede med en molekylvekt rundt 225.000 Da (vWF-monomer), en vWF-dimer (primær vWF-dimer) med en molekylvekt rundt 450.000 Da
10 ved dannelse av flere svovelbroer. Av vWF-dimerene fremstilles i sin tur ytterligere polymerer av vWF med stadig høyere molekylvekt, opptil ca. 20 000 000 Da, ved forbindelse via svovelbroer.

- Et viktig kriterium for karakterisering av vWF er multimerstrukturanalysen ved agarose-elektroforese. Man formoder at spesielt de høymolekylære vWF-polymerer har en
15 vesentlig betydning for blodlevringen. Den funksjonelle aktivitet av vWF bestemmes vanligvis ifølge ristocetin-kofaktor-aktiviteten (vWF:RistCoF). Som kjennetegn for renheten og den spesifikke virksomhet av vWF beregnes forholdet mellom aktiviteten og vWF-antigenkonsentrasjonen (vWF:Ag). Den spesifikke aktivitet av et preparat øker med et økende forhold mellom vWF:RistCoF og vWF:Ag.

- 20 vWF oppfyller viktige funksjoner innen rammen for hemostase. Den sirkulerer i plasma til dels som kompleks med faktor VIII, som støtter blodlevringen som kofaktor. Faktor VIII stabiliseres og beskyttes for proteolytisk spaltning ved kompleksdannelsen med vWF. En ytterligere oppgave av vWF er dens innblanding i trombocyttaggregasjonen, som er et viktig bidrag til den primære hemostase. Derved bindes vWF til
25 glykoproteinene Ib og IIb/IIIa av overflaterseptorene av trombocytter, og fornetter dermed trombocytene til et trombocytt-aggregat. Også av betydning for den primære hemostase er affiniteten av vWF for kollagen, som er en bestanddel av den ekstracellulære matriks, som i intakte blodkar ikke har noen direkte kontakt med blodet fordi det skjermes fra blodstrømmen av et monosjikt av endotelceller. Ved skader i
30 blodkar finner det på lesjonsstedet imidlertid sted en direkte utsettelse av bestanddelene av den ekstracellulære matriks med blodet ved en lokal løsning av endotelcellesjiktet. På grunn av sin affinitet for kollagen har vWF evnen til å fiksere trombocytt-aggregatet som dannes i det skadede blodkarområde, på det blottede subendotel. Dermed finner det sted en første, labil sårlukning, som festes ved den påfølgende blodlevring.

von Willebrand-syndrom kjennetegnes ved en mangel på funksjonell von Willebrand-faktor eller et abnormt spektrum i multimersammensetningen av von Willebrand-faktor. Hos pasienter med von Willebrand-syndrom kan det på tross av en som regel normal syntesehastighet av faktor VIII, foreligge en mangel på faktor VIII som skyldes en manglende stabilisering av faktor VIII på grunnlag av den sterkt nedsatte plasmahalveringstid av denne levringsfaktor. Av denne grunn kan pasienter med von Willebrand-syndrom ha lignende symptomer som hemofili A-pasienter (fenotypisk hemofili). På grunn av at de mangler funksjonelt aktivt vWF, kan det hos pasienter med von Willebrand-syndrom også opptre funksjonsforstyrrelser i trombocyt-aggregasjonen og -adhesjonen, hvorved det kan opptre defekter i den primære hemostase. Betinget av forstyrrelser i disse vWF-formidlede hendelser, oppviser pasienter med von Willebrand-syndrom en forlenget blødningstid.

For behandling av von Willebrand-syndromet må man derfor administrere vWF-preparater som utligner mangelen på funksjonelt aktivt vWF. Med denne hensikt kan preparater brukes som også anvendes for terapi av hemofili A, såsom kryopresipitat eller derav fremstilte faktor VIII-konsentrater, som inneholder komplekser av faktor VIII og vWF. Imidlertid brukes for behandling av hemofili A stadig bedre rensede faktor VIII:C-konsentrater, som ikke inneholder vWF eller kun inneholder spormengder derav. Fordi en supplementering av pasienter med von Willebrand-syndrom, med faktor VIII ikke er nødvendig, og faktor VIII-tilføring er forbundet med faren for en induksjon av inhibitoriske faktor VIII-antistoffer i pasienten, ville et vWF-preparat som i størst mulig grad er fritt for forurensende faktor VIII, være spesielt ønskelig for behandling av von Willebrand-syndromet. Av denne grunn finnes det et behov for rene og virussikre von Willebrand-faktor-preparater med høy spesifikk aktivitet.

I litteraturen beskrives forskjellige fremgangsmåter for rensing og utvinning av vWF.

EP 0 503 991 beskriver rensing av vWF fra humant kryopresipitat ved tre suksessive kromatografiske trinn: 1. anionebytterkromatografi på TSK-DEAE-fractogel og eluering av vWF gjennom 0,15 M NaCl; 2. gjentatt anionebytterkromatografi på TSK-DEAE-fractogel og eluering av vWF gjennom 0,17 M NaCl; og 3. affinitetskromatografi på gelatin-sepharose for fjerning av det forurensende fibrinogen. Herved brukes aminosyre- og kalsiumione-holdige buffere.

WO 89/12065 beskriver separasjon av plasmatisk vWF fra faktor VIII og ytterligere proteiner ved binding av proteinene på en anionebytter og en trinnvis eluering ved

heving av saltkonsentrasjonen. Den vWF-holdige fraksjon ble kromatografert en andre gang over en anionebytter, og erholdt som konsentrat.

5 EP 0 469 985 beskriver rensing av plasmatiske vWF fra kryopresipitat, hvor i et første trinn faktor VIII bindes selektivt på en anionebytter ved en saltkonsentrasjon på 250 mM, mens vWF blir igjen i supernatanten. Etter nedsettelse av saltkonsentrasjonen i den vWF-holdige supernatant til en saltkonsentrasjon mellom 100 mM og 150 mM, bindes vWF på en andre anionebytter, og elueres ved pH 6,6 med 300-350 mM NaCl. Derved erholdes vWF med en aktivitet på minst 50 U/mg som inneholder en andel av faktor VIII < 2 %.

10 DE 39.04.354 beskriver utvinning av plasmatiske vWF fra kryopresipitat og separasjon av vWF fra faktor VIII ved selektiv adsorpsjon av faktor VIII på en anionebytter, mens vWF holdes i oppløsning. Herved erholdes en oppløsning som inneholder 160 U/ml vWF.

15 US 5 006 642 beskriver utvinning av vWF fra en oppløsning av vWF og chaotrop agens som opptrer som biprodukt i henhold til US 4 361 509, ved dialyse mot en egnet buffer eller avsalting av oppløsningen ved et ytterligere kromatografisk trinn.

20 EP 0 383 234 beskriver fremstilling av et vWF-konsentrat ved anionebytterkromatografi, hvor et faktor VIII/vWF-kompleks som foreligger i en oppløsning, dissosieres ved tilsetning av en kalsium- og aminosyreholdig buffer, og det erholdes et vWF-konsentrat.

WO 96/10584 beskriver en fremgangsmåte ved utvinning av høyrent rekombinant vWF ved kombinert anionebytter/heparin-affinitetskromatografi, og EP 0 705 846 beskriver separasjon av høy- og lavmolekylære fraksjoner av rekombinant vWF ved heparin-affinitetskromatografi.

25 EP 469 985 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av vWF-fraksjon som kan benyttes til behandling av hemofili A, og EP 705 846 beskriver utvinning av vWF ved kationebutting og fraksjonær eluering.

30 For å erholde et rensede vWF-preparat med høy spesifikk aktivitet, var det hittil nødvendig å kombinere flere kromatografiske trinn. Spesielt fremstilling av preparater som spesielt inneholdt høymolekylære vWF-multimerer, var hittil kun mulig ved

heparin-affinitetskromatografi. Heparin er imidlertid et relativt dyrt kromatografimateriale.

Det er en oppgave for foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for utvinning av rensed vWF med en forbedret spesifikk aktivitet, hvilken fremgangsmåte er
5 egnet for en storteknisk anvendelse i industriell skala. Fremgangsmåten bør kunne anvendes for rensing av både rekombinant og plasmatisk vWF.

Ifølge oppfinnelsen løses oppgaven ved at det tilveiebringes en fremgangsmåte ved utvinning av vWF, hvor vWF bindes på en kationebytter ved en lav saltkonsentrasjon, og vWF som spesielt består av høymolekylære vWF-multimerer med høy spesifikk
10 aktivitet, utvinnes ved en trinnvis, fraksjonert eluering idet vWF bindes på kationebytteren ved en saltkonsentrasjon $<250\text{mM}$ og vWF-fraksjoner som spesielt inneholder høymolekylære vWF-multimerer, elueres ved en saltkonsentrasjon $\geq 300\text{mM}$. Utvinningen og anrikningen av vWF med forbedret aktivitet og stabilitet utføres spesielt ved en trinnvis heving av saltkonsentrasjonen, hvor først fraksjoner som inneholder
15 lavmolekylære vWF-multimerer, inaktive spaltningsprodukter og uspesifikke ledsagende proteiner, fjernes ved en midlere saltkonsentrasjon, og fraksjoner som inneholder høymolekylære vWF-multimerer med høy spesifikk aktivitet, utvinnes ved en høyere saltkonsentrasjon.

vWF renses på grunn av sitt sure isoelektriske punkt ($\text{IEP} = 5,5$ til 6) og den derav
20 resulterende negative nettoladning, vanligvis i et svakt syrlig til basisk miljø over positivt ladede anionebyttere. På grunnlag av de hittil beskrevne fremgangsmåter ved rensing av faktor vWF ved hjelp av positivt ladede anionebyttere, kunne man derfor ikke forvente at vWF også ved en pH-verdi som ligger over IEP-verdien for vWF, og en lav saltkonsentrasjon bindes på en negativt ladet gelmatriks av en kationebytter og kan
25 elueres selektivt fra gelmatriksen ved heving av saltkonsentrasjonen. Man kunne heller ikke forvente at man ved trinnvis eluering ved en saltkonsentrasjon $\geq 300\text{ mM}$ erholder vWF som spesielt består av høymolekylære vWF-multimerer.

Innen rammen for foreliggende oppfinnelse ble det fastslått at man ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og utgående fra et urent biologisk materiale, erholder rensede
30 fraksjoner som i hovedsak er frie for forurensende nukleinsyrer. Dermed fjernes ved fremgangsmåten, foruten de uspesifikke ledsagende proteiner, også nukleinsyrer fra proteinpreparater. Denne virkning kan ikke vises med kjente fremgangsmåter som benytter seg av anionebyttere, fordi nukleinsyrene på grunn av sin negative ladning

bindes på anionebytteren og ved heving av saltkonsentrasjonen igjen løses fra anionebytteren og havner i eluatet.

Ved rensing av faktor vWF bør man spesielt ta hensyn til at på grunn av at vWF har en størrelse fra 500.000 til flere millioner, tilveiebringer kun slike bærermaterialer som ikke hindrer faktor vWF-molekylets diffusjon og fordeling i de brukte bærermaterialer, en god rensing og et godt utbytte. Ved gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for rensing av vWF med høy spesifikk aktivitet ved hjelp av en kationebytter, brukes en gelmatriks som ikke bare har en høy ladningskapasitet, er robust ved håndtering og viser en skarp elueringsprofil, men som også lønnsomt kan brukes i industriell skala. På denne måte blir fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen interessant spesielt for utvinning av rensset vWF i storteknisk skala.

For utføring av fremgangsmåten kan hvilken som helst kjente kationebytter benyttes, hvorved man foretrekker kationebyttere med en bærer som er konjugert med sulfopropyl- eller karboksymetylgrupper. Spesielt har f.eks. SP-"Sephacrose" Fast Flow og CM-"Sephacrose" Fast Flow (Pharmacia), "Fractogel" EMD-SO₃ og "Fractogel" EMD COOH (Merck), "Poros" 10 SP og "Poros" 10 S (Perseptive Biosystems) og "Toyopearl" SP 550 C og "Toyopearl" CM-650 (M) (TosoHaas) vist seg å være godt egnet.

En storporert gel med tentakkelstruktur av typen "Fractogel" EMD-SO₃ og "Fractogel" EMD COOH (Merck) har vist seg å være spesielt gunstig for utvinning av rensset vWF.

Adsorpsjonen av vWF på kationebytteren skjer fortrinnsvis ved en saltkonsentrasjon i bufferen ≤ 250 mM. Foretrukne adsorpsjonsbufferer oppviser derfor en saltkonsentrasjon fra 50 til 250 mM, spesielt i området fra 150 til 250 mM (f.eks. 150 mM). Ved en trinnvis heving av saltkonsentrasjonen i bufferen kan vWF som i det vesentlige inneholder høymolekylære vWF-multimerer, selektivt elueres ved en saltkonsentrasjon ≥ 300 mM. Lavmolekylære vWF-multimerer og proteolytiske vWF-spaltingsprodukter som foreligger i den vWF-holdige oppløsning og som har en lav spesifikk aktivitet med hensyn til vWF-aktiviteten, spesielt til ristocetin-kofaktor-aktiviteten, kollenbindingsaktiviteten og den spesifikke blodplateagglutinasjonsaktivitet, elueres fra kationebytteren og fjernes ved en saltkonsentrasjon mellom ≥ 250 mM og ≤ 300 mM, fortrinnsvis ved 300 mM.

Adsorpsjonen og desorpsjonen av vWF kan utføres i en buffer som inneholder et ett- eller toverdig metallion som salt, hvor man fortrinnsvis anvender NaCl som salt.

I fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes fortrinnsvis en bufferoppløsning bestående av buffersubstanser, spesielt glycin, fosfatbuffer eller citratbuffer, og salt, som buffersystem for eluering av proteinene som er bundet på kationebytteren. Den anvendte buffer inneholder da fortrinnsvis ingen Ca-ioner.

- 5 Elueringsbufferen kan ha en pH-verdi i området mellom 5,0 og 8,5, fortrinnsvis mellom 6,0 og 8,0.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan utføres som batch-metode eller som søylekromatografi.

- 10 De optimale parametere såsom saltkonsentrasjon, pH-verdi og temperatur for utføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er imidlertid hver avhengig av kationebyttermaterialet som brukes. Det ligger imidlertid innen evnene for fagmannen å optimere betingelsene for gjennomføring av fremgangsmåten som tilveiebringes innen rammen for foreliggende oppfinnelse, for den bestemte kationebytterttype som skal brukes.

- 15 Med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utvinnes og anrikes spesielt en vWF som spesielt består av høymolekylære vWF-multimerer. Lavmolekylære vWF-multimerer og vWF-fragmenter med lav spesifikk blodplateagglutinasjonsaktivitet fjernes selektivt, slik at det erholdes fraksjoner som spesielt inneholder høymolekylære vWF-multimerer med høy aktivitet og spesifisitet.

- 20 Den eller de erholdte vWF-fraksjoner er i det vesentlige fri(e) for lavmolekylære vWF-multimerer, vWF-fragmenter med lav spesifikk aktivitet, faktor VIII-kompleks, faktor VIII:C, uspesifikke ledsagende proteiner og forurensende nukleinsyrer.

- 25 Som utgangsstoff for utvinning av rensset vWF med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan hvilken som helst vWF-holdige oppløsning brukes. Utgangsstoffer er spesielt biologiske materialer, såsom plasma, en plasmafraksjon, et kryopresipitat eller en supernatant eller et ekstrakt fra en rekombinant cellekultur.

- 30 vWF-holdige oppløsninger kan imidlertid også være anrikede proteinoppløsninger som er forhåndsrenset ved et tidligere rensetrinn, f.eks. gelfiltrasjon, anionebytterkromatografi, affinitetskromatografi eller en kombinasjon derav. Ved disse forutgående fremgangsmåter oppnås spesielt at vWF anrikes og uspesifikke ledsagende proteiner, spesielt faktor VIII eller faktor VIII-kompleks, fjernes selektivt.

Ifølge en spesiell utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes en vWF-holdig fraksjon som er blitt anrikt over en anionebytter, som utgangsstoff.

Ved anionebytterkromatografi kan, avhengig av gjennomføringsmåten av anionebytterkromatografien, vWF enten passere anionebytteren fritt i form av ubundet materiale, eller adsorberes på denne. Slik blir vWF f.eks. utvunnet og anrikt fra en plasmafraksjon ved at både vWF og faktor VIII/vWF-kompleks bindes på en anionebytter ved lav ionestyrke og saltkonsentrasjon i et svakt surt miljø. vWF elueres deretter selektivt fra anionebytteren ved en midlere saltkonsentrasjon fra 150 mM til 250 mM, mens faktor VIII-kompleks og fri, ikke kompleksdannet faktor VIII først desorberes ved en høy saltkonsentrasjon > 300 mM.

En anrikt vWF-fraksjon kan også beholdes ved at en vWF-holdig oppløsning behandles med en anionebytter ved en midlere saltkonsentrasjon mellom 100 mM og 200 mM, hvor faktor VIII-kompleks bindes på anionebytteren mens vWF holdes i oppløsning. Bundet faktor VIII-kompleks kan deretter utvinnes fra anionebytteren ved heving av saltkonsentrasjonen.

I henhold til en spesiell utførelsesform utvinnes vWF'et som foreligger i en anrikt oppløsning med en saltkonsentrasjon ≤ 250 mM, direkte fra gjennomløpet eller eluatet hhv. som supernatant (i batch-metoder), og bindes eventuelt uten endring av ionestyrken eller saltkonsentrasjonen, på kationebytteren. Saltkonsentrasjonen kan imidlertid om nødvendig også senkes ved fortynning.

Denne utførelsesform har den spesielle fordel at en enkel kombinasjon av anione/-kationebytterkromatografi muliggjøres, uten noen komplisert ombufring, dialyse eller lignende av de anrikede proteiner.

Hermed kan man ved et første kromatografiske trinn erholde en anrikt vWF-holdig fraksjon, og ved en påfølgende kationebytterkromatografi oppnå en rensing og separasjon av høymolekylære og lavmolekylære vWF-fraksjoner. Det er imidlertid også mulig med andre kombinasjoner, såsom f.eks. affinitets/kationebytterkromatografi, anionebytter/affinitets/kationebytterkromatografi, for å oppnå en ytterligere anrikning og selektiv utvinning av vWF med høy spesifikk aktivitet.

Med den ovenfor beskrevne fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen anrikes vWF med en høy spesifikk aktivitet, minst 80-foldig fra et urent vWF-holdig materiale.

På grunn av at i prinsippet hvilket som helst biologiske materiale kan være forurensset med smittekimer, blir den utvunne vWF-holdige fraksjon behandlet for å inaktivere hhv. utarme virus, for å fremstille et virussikkert preparat. Med denne hensikt kan alle fremgangsmåter som er kjent i teknikkens stand, såsom kjemisk/fysikalske metoder, inaktivering ved kombinasjon av en fotoaktiv substans og lys, eller utarming ved
 5 filtrasjon, brukes. For inaktivering av virus er egner seg spesielt en varmebehandling i oppløsning hhv. i fast tilstand, hvilket på sikker måte kan inaktivere både lipidinnkapslede og ikke-lipidinnkapslede virus. Virusutarming utføres fortrinnsvis ved filtrasjon over nanofilter.

10 Ifølge et ytterligere trekk tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et preparat som inneholder rensset vWF med en høy spesifikk aktivitet og som spesielt består av høymolekylære vWF-multimerer, som kan erholdes fra en vWF-holdig oppløsning ved kationebytterkromatografi hvor preparatet er særpreget ved at det inneholder vWF med en spesifikk kollagenbindingsaktivitet på minst 65 U/mg protein. vWF med høy spe-
 15 sifikk aktivitet anrikes utgående fra et utgangsmateriale som bl.a. inneholder vWF med lav renhet og lav spesifikk aktivitet, og ledsagende proteiner, spesielt faktor VIII hhv. faktor VIII-kompleks, som inneholder lavmolekylære vWF-multimerer, fjernes selektivt. På denne måte utvinnes spesielt et preparat som inneholder rensset vWF som spesielt består av høymolekylære vWF-multimerer og i det vesentlige ikke inneholder
 20 noen lavmolekylære vWF-multimerer eller vWF-spalttingsprodukter.

Preparatet ifølge oppfinnelsen oppviser spesielt en spesifikk blodplateagglutinasjonsaktivitet av vWF på minst 65 U/mg protein og en spesifikk kollagenbindingsaktivitet på minst 65 U/ml protein. Likeledes kjennetegnes preparatet ved at det i det vesentlige er fritt for faktor VIII og oppviser et faktor VIII-innhold på
 25 < 0,1% beregnet på forholdet mellom aktivitet vWF og faktor VIII.

Et ytterligere kriterium for renheten og en lav smitteevne av et produkt er også fraværet av forurensende nukleinsyrer. Preparatet ifølge oppfinnelsen er derfor i det vesentlige fritt for nukleinsyrer. "I det vesentlige" betyr her at innholdet av nukleinsyre er $\leq 0,7$ beregnet på forholdet 260/280 nm. Nukleinsyren kan imidlertid også kvantifiseres i
 30 henhold til en fremgangsmåte som f.eks. beskrives i EP 0 714 987 og EP 0 714 988.

Ved utvinning og fremstilling av preparatet ifølge oppfinnelsen fra et utgangsstoff av plasmatiske vWF, men også med rekombinant vWF, utføres det slik det ble beskrevet ovenfor, eventuelt en virusutarmings- eller inaktiveringsmetode for å fjerne smittende partikler, hvorved en virusinaktivering og/eller virusutarming i prinsippet kan utføres

før eller etter hvert renseskritt utgående fra utgangsstoffet til den produserte farmasøytiske sammensetning. Dermed er preparatet ifølge oppfinnelsen i hvert tilfelle virussikkert.

5 Ifølge en foretrukket utførelsesform foreligger preparatet ifølge oppfinnelsen i en lagerstabil form. Preparatet som inneholder rensed vWF med høy spesifikk aktivitet, kan tilveiebringes i form av en ferdig oppløsning, et lyofilisat eller dypfrosset. På grunn av preparatets renhet, er det spesielt stabilt. Det har vist seg at preparatet ifølge oppfinnelsen er stabilt i minst 6 måneder ved -20 °C, i minst 4 uker ved 4 °C i oppløsning, og i minst 1 år som lyofilisat. Det viste seg at vWF-aktiviteten nedsettes 10 med maksimalt 10 % i løpet av de nevnte tidsrom, og at multimermønstret av vWF-multimerene heller ikke oppviser noen vesentlige endringer.

Formuleringen av preparatet ifølge oppfinnelsen kan utføres på i og for seg kjent og vanlig måte. Den rensede vWF som foreligger i preparatet ifølge oppfinnelsen, blandes med en buffer som inneholder salter såsom NaCl, trinnatriumcitratdihydrat og/eller 15 CaCl₂, og aminosyrer såsom glycin og lysin, ved en pH-verdi i området 6-8, og formuleres som farmasøytisk preparat.

Preparatet kan brukes ved fremstilling av et legemiddel for behandling av pasienter med fenotypisk hemofili og vWD.

Oppfinnelsen skal beskrives nærmere ved hjelp av de følgende eksempler og de 20 vedlagte tegninger, men er ikke begrenset til disse utførelseseksempler.

Figur 1 viser en multimeranalyse av rvWF før og etter rensing ved kationebytterkromatografi,

Figur 2 viser en multimeranalyse av vWF fra kryopresipitat før og etter rensing ved kombinert anion/kationebytterkromatografi under betingelser under hvilke vWF bindes 25 på anionebytteren (eksempel 2A) og

Figur 3 viser en multimeranalyse av vWF fra kryopresipitat før og etter rensing ved kombinert anion/kationebytterkromatografi under betingelser under hvilke vWF ikke bindes på anionebytteren (eksempel 2B).

Eksempel 1 beskriver rensing av rvWF fra kultursupernatanter av rekombinante celler 30 ved kationebytterkromatografi; eksempel 2 beskriver rensing av plasmatisk vWF ved

kationebytterkromatografi og forutgående anionebytterkromatografi; eksempel 3 beskriver rensing av rekombinant vWF ved kombinert anionebytter/immunoaffinitets- og kationebytterkromatografi.

Eksempel 1:

5 Rensing av vWF fra kultursupernatanter av rekombinante celler ved kationebytterkromatografi

vWF ble produsert i rekombinante CHO-celler i et vanlig kulturmedium. Etter fermentering av de transformerte celler ble kulturmediet fjernet, og celler og cellebruddstykker ble fjernet ved sentrifugering. Deretter ble oppløsningen klarnet gjennom et
10 filter med porestørrelsen 0,4 μ m for å fjerne lavmolekylære bestanddeler, så som membranbruddstykker.

En kromatografisøyle (50 ml) ble fylt med en kationebytter ("Fractogel" EMD-SO3) og skylt med buffer (30 mM glycin-NaCl-buffer). Deretter ble kationebyttersøylen ladet med den cellefrie kultursupernatant, hvor proteiner som ikke bindes på bytteren,
15 erholdes i gjennomløpet (fraksjon 1). Bundne uspesifikke ledsagende proteiner ble fjernet ved å skylle søylen med buffer som inneholdt 0,3 M NaCl (fraksjon 2). Deretter ble bundet vWF desorbert fra bytteren med buffer som inneholdt 0,5 M NaCl, og erholdt i eluatet (fraksjon 3).

Alle fraksjoner ble undersøkt med hensyn til deres proteininnhold, vWF-antigeninnhold
20 (vWF:Ag) og vWF-aktivitet (ristocetin-kofaktor-aktivitet, vWF:RistCoF), og underkastet en vWF-multimeranalyse. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved Bradford-metoden (M. Bradford (1976), Anal. Biochem., 72: 248-254). Innholdet av vWF ble bestemt ved hjelp av et handelstilgjengelig ELISA-system ("ASSERACHROM" vWF, Boehringer Mannheim). Ristocetin-kofaktor-aktiviteten ble
25 bestemt ved hjelp av et vanlig testsystem ("v-Willebrand-Reagenz", Behringwerke). Resultatene av kationebytterkromatografien er sammenfattet i tabell 1. Fig. 1 viser vWF-multimeranalysen før og etter rensing over kationebytteren.

Fra tabell 1 er det synlig at all vWF med ristocetin-kofaktor-aktivitet som foreligger i utgangsmaterialet, bindes av kationebytteren. Ved skylling av kationebyttersøylen med
30 en buffer som inneholder 0,3 M NaCl (fraksjon 2), fjernes vWF som ikke har noen målbar aktivitet. Ved eluering med 0,5 M NaCl (fraksjon 3), erholdes vWF med nærmest hele ristocetin-kofaktor-aktiviteten. I tillegg erholdes en høy utarming fra DNA

av supernatanten: absorpsjonsforholdet 260 nm / 280 nm faller fra 1,2 til 0,7. Med dette kromatografiske trinn oppnås rensingsfaktor 10.

Figur 1 viser multimeranalysen av vWF før og etter rensing ved kationebytterkromatografi. På fig. 1 viser spor A urensset rvWF, i spor B vises vWF-multimerene av fraksjon 1 i gjennomløpet; i spor C vises vWF-multimerene av fraksjon 2 (0,3 M NaCl-eluat) og i spor D vises de av fraksjon 3 (0,5 M NaCl-eluat). Fra fig. 1 fremgår at man ved kationebytterkromatografi og selektiv eluering erholder en vWF som spesielt inneholder høymolekylære multimerstrukturer. Lavmolekylære vWF-multimerer hhv. vWF-spalttingsprodukter bindes enten ikke på kationebytteren (fraksjon 1), eller fjernes selektivt ved eluering med 0,3 M NaCl (fraksjon 2).

Tabell 1 Rensing av rekombinant vWF (rvWF) ved kationebytterkromatografi

Probe	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (g/ml)	UV-absorpsjonsforhold 260 nm / 280 nm
Urenset vWF	0,338	120,36	1,2
Fraksjon 1 (ikke bundet)	0	2,8	1,5
Fraksjon 2 (eluat 0,3 M NaCl)	0	10,7	0,7
Fraksjon 3 (eluat 0,5 M NaCl)	0,450	48,9	0,7

Eksempel 2:

Rensing av plasmatisk vWF over kationebytter, med forutgående rensing over anionebytter

A. Anionebytterkromatografi under betingelser hvor vWF bindes på anionebytteren, og selektiv eluering av vWF

Kryopresipitat fra human plasma ble løst opp i en buffer av 7 mM Tris, 100 mM Na-acetat, 100 mM lysin ved pH 6,7. For forbehandling ble $Al(OH)_3$ rørt inn. Deretter ble felningen fjernet ved sentrifugering.

Kryopresipitat som var blitt forhåndsbehandlet på denne måte, ble ført på en "Fractogel" EMD-TMAE-søyle. Svakt bundne proteiner ble fjernet ved å skylle søylen med en 160

mM NaCl-holdig buffer. Ved eluering med 250 mM NaCl i bufferen, ble hovedsaklig vWF eluert fra bytteren (fraksjon 1). Ved eluering med 400 mM NaCl ble deretter FVIII-kompleks eluert (fraksjon 2). Beregnet på kryopresipitatet, beholdt fraksjon 1 68 % av hele vWF-aktiviteten, men kun 10 % av den samlede FVIII-aktivitet. Resten av vWF-aktiviteten og 80 % av FVIII-aktiviteten foreligger i fraksjon 2.

Tabell 2 Anrikning av vWF ved anionebytterkromatografi

Probe	vWF:RistCoF-aktivitet (U/ml)	FVIII:C-aktivitet (U/ml)
Kryopresipitat	13,5	13,6
Fraksjon 1 (eluert 250 mM NaCl)	5,4	2,8
Fraksjon 2 (eluert 400 mM NaCl)	4,5	11,8

Den vWF-holdige fraksjon 1 ble deretter påført på en "Fractogel" EMD-SO₃-kationebyttersøyle. Svakt bundne proteiner ble fjernet ved skylling av søylen med 100 mM NaCl. Deretter ble det trinnvis eluert med 200 mM NaCl (fraksjon 1), 300 mM NaCl (fraksjon 2) og 400 mM NaCl (fraksjon 3). Over 70 % av den samlede vWF-aktivitet ble funnet i 400 mM NaCl-fraksjonen. Man fant ingen FVIII:C-aktivitet. Resultatene er sammenfattet i tabell 3.

Tabell 3 Trinnvis eluering av vWF-fraksjoner fra kationebytteren

Probe	vWF:RistCoF-aktivitet (U/ml)
vWF-fraksjon 1 (tab. 2)	5,4
Fraksjon 1 (eluert 200 mM NaCl)	0
Fraksjon 2 (eluert 300 mM NaCl)	0,2
Fraksjon 3 (eluert 400 mM NaCl)	3,75

Mens den spesifikke aktivitet av vWF i kryopresipitatet var 0,6 U/mg protein, er den i 400 mM NaCl-eluatet etter kationebytterkromatografi 65 U/ml. Den spesifikke kollagenbindingsaktivitet steg fra 0,7 U/mg protein i kryopresipitatet til 65 U/mg protein i 400 mM NaCl-eluatet etter kationebytterkromatografi. I forhold til kryopresipitatet ble renheten av vWF hevet 100-foldig.

Figur 2 viser vWF-multimeranalysen under den kombinerte anione/-kationebytterkromatografi. Sporene A til E viser rensingen over anionebytteren, og sporene F til K rensingen over kationebytteren. På figur 2 viser spor A vWF-multimer-mønstret av vWF i kryopresipitatet, spor B viser dette etter filtrering, spor C i gjennomløpet, spor D 250 mM NaCl-eluatet (fraksjon 1, tabell 2), spor E 400 mM NaCl-eluatet (fraksjon 2, tabell 2), spor F 250 mM NaCl-eluatet (fraksjon 1, tabell 2) før kationebytterkromatografien, spor G gjennomløpet, spor H 200 mM NaCl-eluatet (fraksjon 1, tabell 3), spor I 300 mM NaCl-eluatet (fraksjon 2, tabell 3) og spor K 400 mM NaCl-eluatet (fraksjon 3, tabell 3). Fra spor H og I fremgår det at kun lavmolekylære vWF-multimerer fjernes fra kationebytteren ved eluering med 200 mM NaCl hhv. 300 mM NaCl. Eluering av kationebytteren med 400 mM NaCl, spor K, gav vWF som spesielt inneholdt høymolekylære vWF-multimerer.

B. Anionebytterkromatografi under betingelser hvor vWF ikke bindes på anionebytteren, og holdes i oppløsning

Kryopresipitat fra humant plasma ble løst opp i en buffer av 7 mM Tris, 100 mM Na-acetat, 100 mM lysin, 120 mM NaCl ved pH 6,7. Som forbehandling ble $\text{Al}(\text{OH})_3$ rørt inn. Deretter ble felningen fjernet ved sentrifugering.

Kryopresipitat som var blitt forbehandlet på denne måte, ble påført på en "Fractogel" EMD-TMAE-søyle. Ikke bundne proteiner ble beholdt ved å skylle søylen med oppløsningsbuffer (fraksjon 1). Denne fraksjon 1 inneholdt 60 % av vWF-aktiviteten og kun 10 % av FVIII-aktiviteten. Ved eluering av søylen med 400 mM NaCl (fraksjon 2), beholdt man deretter FVIII-kompleks.

Tabell 4 Anrikning av vWF ved anionebytterkromatografi

Probe	vWF:RistCoF-aktivitet (U/ml)	FVIII:C-aktivitet (U/ml)
Kryopresipitat	12,5	12,2
Fraksjon 1 (vWF ikke bundet)	3,5	0,7
Fraksjon 2 Eluat 400 mM NaCl	2,5	14,5

Den vWF-holdige fraksjon 1 ble deretter påført på en kationebyttersøyle ("Fractogel" EMD-SO3). Svakt bundne proteiner ble fjernet ved å skylle søylen med 100 mM NaCl. Deretter ble søylen eluert trinnvis med 200 mM NaCl (fraksjon 1), 300 mM NaCl

(fraksjon 2) og 400 mM NaCl (fraksjon 3). Over 70 % av vWF-aktiviteten ble funnet i 400 mM NaCl-fraksjonen. Man fant hverken faktor VIII-antigen eller FVIII:C-aktivitet. Resultatene er sammenfattet i tabell 5.

Tabell 5 Trinnvis eluering av vWF-fraksjoner fra kationebytteren

Probe	vWF:RistCoF-aktivitet (U/ml)
vWF (fraksjon 1, tab. 4)	3,5
Fraksjon 1 (eluert 200 mM NaCl)	0
Fraksjon 2 (eluert 300 mM NaCl)	0,2
Fraksjon 3 (eluert 400 mM NaCl)	3,75

5

Mens den spesifikke aktivitet av vWF i kryopresipitatet var 0,6 U/mg protein, er denne i 400 mM NaCl-eluatet etter kationebytterkromatografi 47 U/mg. Den spesifikke kollagenbindingsaktivitet steg fra 0,7 U/mg protein i kryopresipitatet til 51 U/mg protein i 400 mM NaCl-eluatet etter kationebytterkromatografi. I forhold til

10

Figur 3 viser vWF-multimeranalysen under den kombinerte anion-/kationebytterkromatografi. Sporene a til c viser rensing over anionebytteren, og sporene d til h rensingen over kationebytteren. På figur 3 viser spor a vWF-multimermønsteret av vWF i kryopresipitatet, spor b i gjennomløpet, spor c i 400 mM NaCl-eluatet (fraksjon 2, tabell 4), spor d i gjennomløpet (fraksjon 1, tabell 4) før kationebytterkromatografien, spor e gjennomløpet over kationebytteren, spor f 200 mM NaCl-eluatet (fraksjon 1, tabell 5), spor g 300 mM NaCl-eluatet (fraksjon 2, tabell 5) og spor h 400 mM NaCl-eluatet (fraksjon 3, tabell 5). vWF-multimerstrukturen av vWF i fraksjonene som ble

15

20

erholdt med 200 mM NaCl (spor f) hhv. 300 mM NaCl (spor g) samt 400 mM NaCl (spor h) etter kationebytterkromatografi, vises tilsvarende. 400 mM NaCl-eluatet (spor h) viser et høymolekylært vWF-multimermønster, og inneholder over 70 % av vWF-aktiviteten.

Eksempel 3:Rensing av rekombinant vWF ved kombinert anionebytter/immunoaffinitets- og kationebytterkromatografi

vWF ble produsert av rekombinante CHO-celler i et vanlig kulturmedium. Etter fermentering av de transformerte celler ble kulturmediet fjernet, celler og cellebruddstykker ble fjernet ved sentrifugering. Deretter ble oppløsningen filtrert gjennom et filter med porestørrelsen 0,4 μ m for å fjerne lavmolekylære bestanddeler så som membranbruddstykker.

Anionebytterkromatografi

1000 ml cellefri kultursupernatant ble filtrert med strømningshastigheten 0,7 cm/min over en søyle (7,1 cm² $\times$ 8 cm, fylt med 57 ml av anionebytteren "Fractogel" EMD-TMAE 650 M (Merck)). Gelen ble først ekvilibrert med 20 mM Tris-HCl-buffer (pH 7,0). Deretter ble søylen vasket med 20 mM Tris-HCl-buffer (pH 7,0) som inneholdt 0,1 M NaCl. Ledsagende stoffer og vWF med lav RistCoF-aktivitet ble fjernet ved å vaske søylen med buffer som inneholdt 200 mM NaCl. r-vWF ble deretter eluert fra bæreren med 280 mM NaCl i 20 mM Tris-HCl-buffer (pH 7,0).

Immunoaffinitetskromatografi

280 mM NaCl-eluatet fra anionebyttertrinnet ble ladet på en immobilisert antistoffharpiks (søyledimensjoner: 19,6 cm² $\times$ 5,6 cm; gelsjiktvolum: 110 ml; harpiksmatriks: Sepharose CL2B; antistoff: Fab-fragmenter av det murine monoklonale antistoff AvW8/2) som var blitt ekvilibrert med 20 mM Na-acetat, 300 mM NaCl, (pH 7,0), med strømningshastigheten 0,255 cm/min. Deretter ble søylen skylt med 20 mM Na-acetat, 300 mM NaCl (pH 7,0) som var blitt tilsatt 0,5 % Tween 80. r-vWF ble eluert ved pH 8,0 med 20 mM glycinbuffer som var blitt tilsatt 10 % sakkarose. Etter 80 % av søylevolumet ble strømningshastigheten redusert omtrent 20-foldig.

Kationebytterkromatografi

En kromatografisøyle (7,1 cm² $\times$ 8 cm, fylt med 57 ml "Fractogel" EMD-SO3) ble skylt med buffer (30 mM glycin-NaCl-buffer; pH 5,0). Deretter ble eluatet fra immunoaffinitetskromatografien filtrert gjennom kationebyttersøylen. Etter en gjentatt vasking av søylen med 30 mM glycin-NaCl-buffer ble ledsagende materialer og vWF med lav spesifikk aktivitet som var bundne på kationebytteren, fjernet ved å skylle

søylen med bufret 0,3 M NaCl-oppløsning. Deretter erholdt man vWF fra byttersøylen i fraksjon 3, ved eluering med buffer som inneholdt 0,5 M NaCl.

Etter de enkelte kromatografiske trinn ble proteinkonsentrasjonen, innholdet av rvWF-antigen (vWF:Ag) og ristocetin-kofaktor-aktiviteten (vWF:RistCoF) bestemt.

- 5 Man fant at rvWF anrikes med faktor 2,3 ved anionebytterkromatografien. I den følgende immunoaffinitetskromatografi fant det sted en ytterligere anrikning med faktor 3,6. Ved den påfølgende kationebytterkromatografi kunne vWF igjen anrikes med faktor 5,2. I tillegg kunne man i dette trinn fjerne sporene av murine antistoffer som forelå i eluatet fra immunoaffinitetssøylen ($< 0,02$ mg/1000 U vWF RistCoF-aktivitet),
10 praktisk talt fullstendig. Ved den påfølgende kationebytterkromatografi skjedde det en fjerning av lavmolekylære vWF-multimerer og anrikning av vWF med høymolekylære multimerstrukturer, hvorved forholdet mellom vWF:RistCoF- og vWF:Ag-aktiviteten ble hevet med faktor 4.

- Resultatene av rensingen av rvWF i de forskjellige trinn av denne sekvensielle
15 rensemetode er oppført i tabell 6.

Tabell 6 Rensing av rekombinant vWF ved kombinert anionebytter/immunoaffinitets- og kationebytterkromatografi

Probe	Protein (mg/ml)	vWF:RistCoF (U/ml)	vWF:Ag (mg/ml)	vW:RistCoF/protein (U/mg)
Urenset vWF	0,626	1,013	0,116	1,62
Eluat anionebytter	0,684	2,588	0,322	3,78
Eluat immunoaffinitet	0,198	2,700	0,348	13,64
Eluat kationebytter	0,046	2,250	0,074	59,20

Patentkrav

1. Fremgangsmåte ved utvinning av vWF,
karakterisert ved at vWF bindes på en kationebytter ved lav
saltkonsentrasjon, og vWF med høy spesifikk aktivitet utvinnes ved en fraksjonert
5 eluering idet vWF bindes på kationebytteren ved en saltkonsentrasjon ≤ 250 mM, og
vWF-fraksjoner som spesielt inneholder høymolekylære vWF-multimerer, elueres ved
en saltkonsentrasjon ≥ 300 mM.
2. Fremgangsmåte ifølge et av krav 1,
karakterisert ved at vWF-holdige fraksjoner som inneholder
10 høymolekylære vWF-multimerer, elueres i en buffer med en pH-verdi i området mellom
5,0 og 8,5, fortrinnsvis mellom 6,0 og 8,0.
3. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-2,
karakterisert ved at lavmolekylære vWF-multimerer,
proteolytiske vWF-spalttingsprodukter med lav spesifikk aktivitet og uspesifikke
15 ledsagende proteiner fjernes ved en saltkonsentrasjon mellom ≥ 250 mM og ≤ 300 mM.
4. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-3,
karakterisert ved at kationebytteren er en sulfopropyl- eller
karboksymetylgruppe-konjugert bærer.
5. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-4,
20 karakterisert ved at det erholdes én eller flere vWF-holdige
fraksjoner som spesielt inneholder høymolekylære vWF-multimerer, med en spesifikk
blodplateagglutinasjonsaktivitet på minst 65 U/mg protein og en spesifikk
kollagenbindingsaktivitet på minst 65 U/mg protein.
6. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-5,
25 karakterisert ved at den eller de erholdte vWF-holdige
fraksjoner i det vesentlige er fri(e) for lavmolekylære vWF-multimerer, vWF-
fragmenter med lav spesifikk vWF-aktivitet og forurensende nukleinsyrer.
7. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-6,
karakterisert ved at vWF med høy spesifikk aktivitet utvinnes
30 fra plasma, en plasmafraksjon, et kryopresipitat, supernatanten eller ekstraktet av en
rekombinant cellekultur eller en anriket proteinoppløsning.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den anrikede proteinoppløsning erholdes ved et forutgående rensetrinn.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 8,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den anrikede proteinoppløsning erholdes ved en kromatografisk metode såsom anionebytter- eller affinitetskromatografi eller en kombinasjon derav.
10. Fremgangsmåte ifølge et av kravene 1-9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den eller de erholdte vWF-holdige
10 fraksjoner behandles for å inaktivere hhv. utarme virusser.
11. Preparat som inneholder renset vWF som spesielt inneholder høymolekylære vWF-multimerer, som kan erholdes fra en vWF-holdig proteinoppløsning ved kationebytterkromatografi,
k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet inneholder vWF med en spesifikk blodplate-
15 agglutinasjonsaktivitet på minst 65 U/mg protein og en spesifikk kollagenbindingsaktivitet på minst 65 U/mg protein.
12. Preparat ifølge krav 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det i det vesentlige ikke inneholder noen lavmolekylære vWF-multimerer, inaktive vWF-spalttingsprodukter eller forurensende
20 nukleinsyrer.
13. Preparat ifølge et av kravene 11-12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det i det vesentlige er fritt for faktor VIII og oppviser et faktor VIII-innhold på $< 0,1\%$ beregnet på forholdet mellom vWF-aktivitet og faktor VIII:C-aktivitet.
- 25 14. Preparat ifølge et av kravene 11-13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er virussikkert.
15. Preparat ifølge et av kravene 11-14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det foreligger i en lagringsstabil form.
16. Preparat ifølge et av kravene 11-15,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er formulert som farmasøytisk preparat.

17. Anvendelse av et vWF-holdig preparat ifølge et av kravene 11-16 ved fremstilling av et legemiddel for behandling av pasienter med fenotypisk hemofili og vWD.

1/3

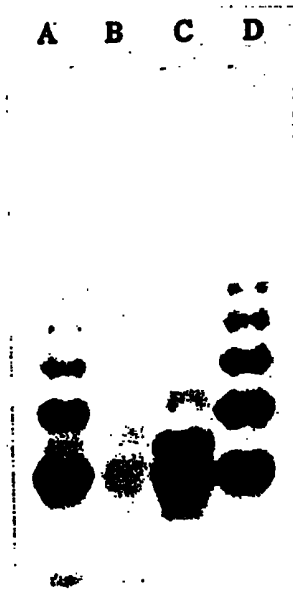


FIG. 1

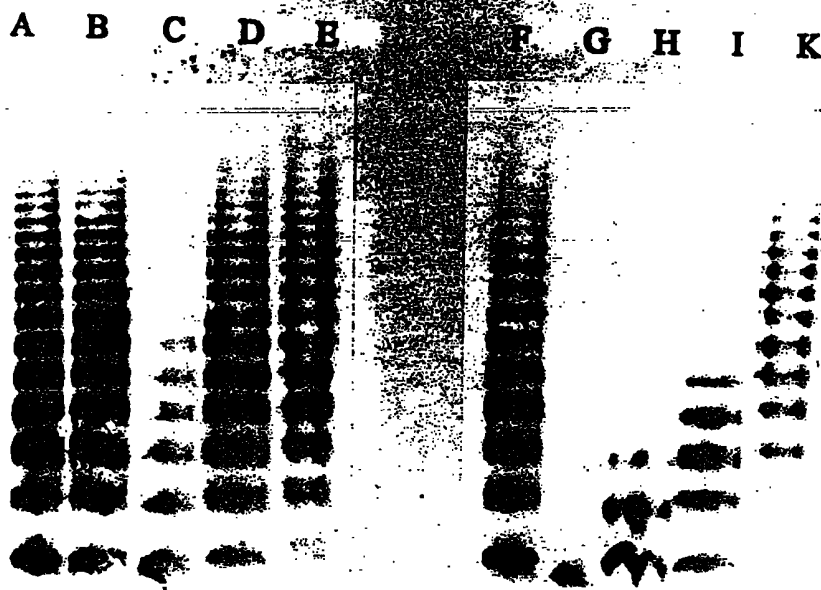


FIG. 2

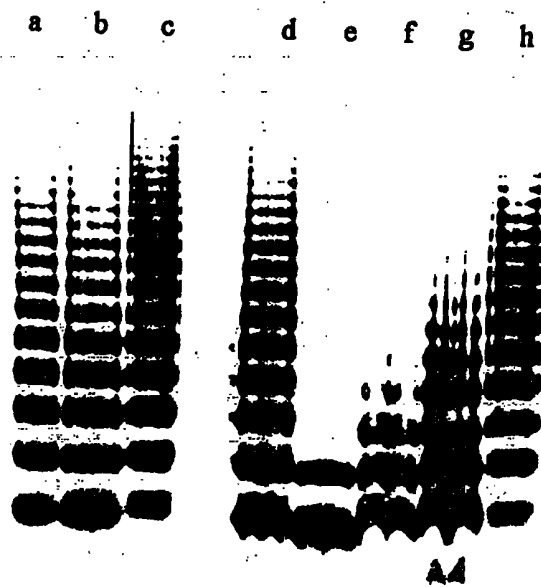


FIG. 3