

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 3454

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.04.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.04.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/00108430**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.05.2003**
(Věstník č. 5/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/03819**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/079260**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 1/36
C 07 K 14/745
A 61 K 38/36
A 61 P 7/04

(71) Přihlašovatel:

OCTAPHARMA AG, Lachen, CH;

(72) Původce:

Josic Djuro, Wien, AT;

Stadler Monika, Wienerherberg, AT;

Gruber Gerhard, Wien, AT;

(74) Zástupce:

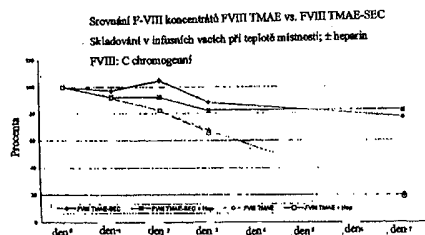
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Přípravek obsahující hemostaticky aktivní vWF
a způsob jeho přípravy**

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob přípravy hemostaticky aktivního prostředku obsahujícího von Willebrandův faktor (vWF) z frakce lidské plasmy chromatografickým přečištěním plasmatické frakce obsahující vWF na aniontoměničovém materiálu, který obsahuje aniontoměničové skupiny na roubovaných polymerních strukturách (materiály s vysunutými skupinami), odběr frakce obsahující vWF, přečištění uvedené frakce za použití promytí gelu pro přípravu přečištěného termálně stabilního prostředku obsahujícího vWF; a zahřívání prostředku pro inaktivaci virů.



FVIII koncentráty byly rekonstituovány v Aqua pro inj. a Aqua pro inj. obsahující 5 IU heparinu/ml, v příslušném pořadí. Po přenosu do infúzních vask se vzorky ukládaly při teplotě místnosti. V uvedených časech se odebraly vzorky, které se vyšetřily na aktivitu FVIII:C (chromograní). Zisk FVIII je vyjádřen v procentech počáteční aktivity.

Přípravek obsahující hemostaticky aktivní vWF a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy virem-inaktivovaného hemostaticky aktivního přípravku obsahujícího von Willebrandův faktor (vWF) z frakce lidské plasmy, a přípravku obsahujícího hemostaticky aktivní vWF, který lze získat způsobem podle předkládaného vynálezu.

Dosavadní stav techniky

Von Willebrandova nemoc je porucha krevní srážlivosti, která se - na rozdíl od hemofilie A nebo B, manifestuje sama jako krvácení do měkkých tkání, zejména do sliznic. Deficit v takzvaném von Willebrandově faktoru (vWF) byl určen jako příčina tohoto onemocnění. Dosud byl tento faktor podáván pacientů v přípravcích obsahujících faktor VIII, které také obsahují vWF, ale často v neuspokojivé kvalitě a v nežádoucím množství. Ačkoliv byla příprava vWF technikami genetického inženýrství úspěšná, existuje stále potřeba vylepšených přečišťovacích metod pro přípravu vWF z krve nebo plasmy dárců.

V EP-A-O 934 748 je popsán vysoce přečištěný vWF mající obsah alespoň 15% vWF multimerů, které se skládají z 13 nebo více multimerů (HMW-VWF multimerů). Tento se získá vícestupňovým chromatografickým přečištěním, při kterém může být gelová filtrace v modu skupinové separace provedena místo kryoprecipitace. Pro inaktivaci virů je uváděno například zpracování rozpouštědly a detergenty a ošetření teplem v lyofilizovaném stavu po dobu 72 h při 80 °C.

Josic et al., "Purification of factor VIII and vWF factor from human plasma by anion-exchange chromatography", Journal of Chromatography B, 662 (1994), 131-190, a Schwinn et al., "A Solvent/detergent Treated, Pasteurized and Highly Purified Factor VIII Concentrate", Arzneimittel-Forschung 1 Drug Research 44 (1), 2, 188-191 (1994), se týkají přečištění komplexu faktor VIII/vWF, kde toto přečištění se provede přes iontoměničový materiál a provedou se dva nezávislé kroky pro inaktivaci virů. Provede se reakce s rozpouštědlem/detergentním činidlem a pasteurizace (10 h při 63 °C) za přítomnosti stabilizačních činidel. Ačkoliv je faktor VIII silně denaturován pasteurizací (95 % zbytkové aktivity), mění se aktivita vWF a dochází ke změně distribuce multimerů (85% zbytkový antigen) a ke ztrátě multimer s vysokou molekulovou hmotností, což vede k zisku vWF antigenu s poměrem aktivity 2,2 (aktivita k antigenu = 0,5).

US-A-5,714,590 popisuje přečištění komplexu faktoru VIII iontoměničovou chromatografií. Tak je použit EMD-TMAE-Fractogel materiál pro kolonu, který se také použije pro promývání gelu. Pro inaktivaci virů je navrženo zpracování rozpouštědlem, detergentním činidlem. Není uváděno tepelné zpracování. Získaný produkt také obsahuje vWF, ale je uvedena pouze antigenicita vWF.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí nového způsobu pro přečištění vWF z lidské plasmy. Takový způsob vede k zisku vWF vyšší kvality a účinnosti.

Předmět předkládaného vynálezu je dosažen způsobem pro přípravu hemostaticky aktivního přípravku obsahujícího von

Willebrandův faktor (vWF) z frakce lidské plasmy, který je charakteristický tím, že je provedeno chromatografické přečištění plasmatické frakce obsahující vWF na aniontoměničovém materiálu, který má také aniontoměničové skupiny na roubovaných polymerních strukturách (materiály s vysunutými skupinami), a potom se odebere frakce obsahující vWF a provede se přečištění frakce za použití promytí gelu a přípravek se zpracuje teplem pro inaktivaci virů. Materiály s vysunutými skupinami, které mohou být použity ve způsobu podle předkládaného vynálezu jsou popsány, například, v EP-A-0 337 144. Tato publikace je zde uvedena jako odkaz. Uvedenými materiály jsou výhodně polyakrylamidové polymery s vysunutými skupinami roubované na dioly Fractogelu, který je dodáván Merck, Darmstadt, Germany.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr.1 ukazuje stabilitu produktu získaného způsobem podle předkládaného vynálezu ve srovnání s produkty přečištěnými pouze aniontoměničovou chromatografií.

Tento postup překvapivě vede k zisku produktů majících vysoký obsah vWF ve srovnání s F VIII. V důsledku promytí gelu vede způsob podle předkládaného vynálezu k eliminaci inter- α -trypsinového inhibitoru, stejně jako jiných faktorů, které mohou přispívat k redukci kvality produktu při použití známých způsobů. Sekvence chromatografických stupňů podle předkládaného vynálezu vede k zisku vWF přípravku, který je překvapivě stabilní. Překvapivě, frakce vWF získatelná za použití způsobu podle předkládaného vynálezu, je v podstatě stabilní ve vodném roztoku při teplotě místnosti po dlouhou dobu (měření bylo provedeno po

dobu delší než je jeden týden). Kromě toho, přípravek podle předkládaného vynálezu obsahuje vWF v přirozené formě a bez fragmentů.

Výhodně vykazuje termálně stabilní přípravek a teplem zpracovaný přípravek pouze jeden pík při HPLC gelové filtrační analýze.

Konkrétně, termálně stabilní přípravek může být zahříván při teplotě více než 80 °C v lyofilizovaném stavu při použití způsobu podle předkládaného vynálezu. V dalším provedení způsobu podle předkládaného vynálezu je přípravek zahříván při teplotě více než 90 °C, konkrétně 100 °C. Podle předkládaného vynálezu je zahřívání výhodně prováděno po dobu alespoň 1 h až 5 h, lépe 2 až 3 h. Tak jsou všechny viry relevantní pro transfusi, zejména viry bez lipidového potahu, jako jsou parvoviry nebo viry hepatidy A, inaktivovány. Produkt získaný způsobem podle předkládaného vynálezu odolává tomuto tepelnému zpracování bez významné ztráty aktivity.

Podle předkládaného vynálezu může být přečištění frakce obsahující vWF dále provedeno alespoň jednou adsorpční- a/nebo afinitní-chromatografickou technikou.

V předkládaném vynálezu může být také použita frakce obsahující vWF, která je získána z lidské plasmy a která je přečištěna způsobem podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález se také týká hemostaticky aktivního přípravku obsahujícího vWF získaného způsobem podle předkládaného vynálezu.

Přípravek podle předkládaného vynálezu neobsahuje

infekční krví přenosné viry, zejména HIV, HBV, HCV, HAV a parvoviry.

Konkrétně, přípravek podle předkládaného vynálezu obsahuje vWF ve formě s vyšší molekulovou hmotností, který vykazuje minimálně 13 až 16 multimerových proužků po elektroforetické analýze. Počet multimerů a jejich charakter distribuce určuje podobnost vWF přípravku s přirozeným vWF v plasmě. Dále, poměr ristocitinového kofaktoru jako markeru pro aktivitu vWF k vWF antigenu v přípravku podle předkládaného vynálezu je alespoň 0,8. Toto je dalším měřením integrity vWF molekuly.

Přípravek podle předkládaného vynálezu výhodně dále obsahuje faktor VIII v přirozené formě. Použití komplexů F VIII a vWF pro léčbu von Willebrandovi nemoci je zejména užitečné pro klinickou praxi.

Dále, následující proteiny byly odstraněny z přípravku podle předkládaného vynálezu na hodnoty nižší než jsou detekční limity pro imunochemickou detekci: imunoglobuliny, fibrinogen, fibronectin a inter- α -trypsinový inhibitor. Toto je pravděpodobně příčinnou mimořádné stability produktu podle předkládaného vynálezu.

Vynález bude dále dokreslen následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

Přibližně 47 kg kryosraženiny se zpracuje 15% (hmot./hmot.) 2% (hmot./hmot.) roztoku hydroxidu hlinitého. Po odstředění se vzorek inkativuje z hlediska virů pomocí 0,3% TnBP/1% Triton X 100. Po olejové extrakci se provede aniontoměničová chromatografie na Fractogel EMD TMAE

s vysunutými skupinami od Merck, Darmstadt, Germany).

Pufr pro reakci má následující složení:

Pufr AM, první promytí:

120 mM NaCl, 10 mM Na-citrát, osmolalita: 360-400 mosmol/kg, 120 mM glycin, 1 mM CaCl₂, pH 6,9-7,1;

Pufr BM, druhé promytí:

235 mM NaCl, 10 mM Na-citrát, osmolalita: 570-610 mosmol/kg, 120 mM glycin, 1 mM CaCl₂, pH 6,9-7,1;

Pufr CM, eluce:

700 mM NaCl, 10 mM Na-citrát, 120 mM glycin, 1 mM CaCl₂, pH 6,9-7,1; osmolalita: 1380-1430 mosmol/kg.

Pufr DM, třetí promytí:

1,5 M NaCl.

Frakce vykazující vWF/FVIII aktivitu se zpracují chromatografií s vylučováním podle velikosti na Fractogel EMD Bio SEC (gel od Merck, Darmstadt, Germany). Po ultra-/diafiltraci se připraví prostředek následujícího složení: 400 mM NaCl, 10 mM Na-citrát, 1 mM CaCl₂, 133 mM glycin, 1% sacharosa.

Potom se provede sterilní filtrace. Přípravek se naplní do fiol a lyofilizuje se a potom se provede tepelné zpracování při teplotě 100 °C. Toto tepelné zpracování trvá 120 minut.

Obr.1 ukazuje stabilitu produktu získaného způsobem podle předkládaného vynálezu ve srovnání s produkty získanými pouze aniontoměničovou chromatografií. Po aniontoměničové

chromatografii se produkt získaný způsobem podle předkládaného vynálezu zpracuje chromatografií s vylučováním podle velikosti. Bylo zjištěno, že produkt podle předkládaného vynálezu má stále ještě 80% aktivitu po skladování s nebo bez heparinu ve vodném roztoku při teplotě místnosti, zatímco produkty nezpracované chromatografií s vylučováním podle velikosti mají po 7 dnech pouze 20% aktivitu.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Způsob přípravy hemostaticky aktivního prostředku obsahujícího von Willebrandův faktor (vWF) z frakce lidské plasmy v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

- I. chromatografické přečištění plasmatické frakce obsahující vWF na aniontoměničovém materiálu, který obsahuje aniontoměničové skupiny na roubovaných polymerních strukturách (materiály s vysunutými skupinami), odběr frakce obsahující vWF; potom
- II. přečištění uvedené frakce za použití promytí gelu pro přípravu přečištěného termálně stabilního prostředku obsahujícího vWF; a
- III. zahřívání prostředku pro inaktivaci virů.

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že termálně stabilní přípravek a teplem zpracovaný přípravek pouze jeden pík při HPLC gelové filtrační analýze.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že termálně stabilní prostředek je zahříván při teplotě více než 80 °C v lyofilizovaném stavu.

4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že prostředek je zahříván při teplotě více než 90 °C, zejména při teplotě 100 °C.

5. Způsob podle nároku 3 nebo 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že prostředek je zahříván po dobu alespoň 1 hodiny až 5 hodin, výhodně po dobu 2-3 h.

6. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1-5

v y z n a č u j í c í s e t í m, že frakce je potom přečištěna alespoň jednou adsorpční a/nebo afinitní chromatografií.

7. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1-6

v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené přečištění promytím gelu je provedeno jako konečné měření přečištění proteinu.

8. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1-7

v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená frakce je přečištěna z kombinované lidské plasmy.

9. Hemostaticky aktivní prostředek obsahující vWF

v y z n a č u j í c í s e t í m, že je získán způsobem podle jakéhokoliv z nároků 1-8.

10. Prostředek podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e

t í m, že uvedený prostředek neobsahuje žádné krví přenosné viry, jako je HIV, HBV, HCV, HAV a parvoviry.

11. Prostředek podle nároku 9 nebo 10 v y z n a č u j í c í

s e t í m, že obsahuje vWF ve formě s vyšší molekulovou hmotností, která vykazuje minimálně 13 až 16 multimerových proužků po elektroforetické analýze

12. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 9-11

v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr vWF aktivity měřený jako poměr ristocitinového kofaktoru k vWF antigenu je alespoň 0,8.

13. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 9-12

v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje faktor

VIII v přirozené formě.

14. Prostředek podle jakéhokoliv z nároků 9-13
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje
imunoglobuliny, fibrinogen, fibronectin a inter- α -trypsinový
inhibitor v koncentraci pod limitem imunochemické detekce.

15. Přípravek podle jakéhokoliv z nároků 9-14
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vWF
v přirozené formě a bez fragmentů.

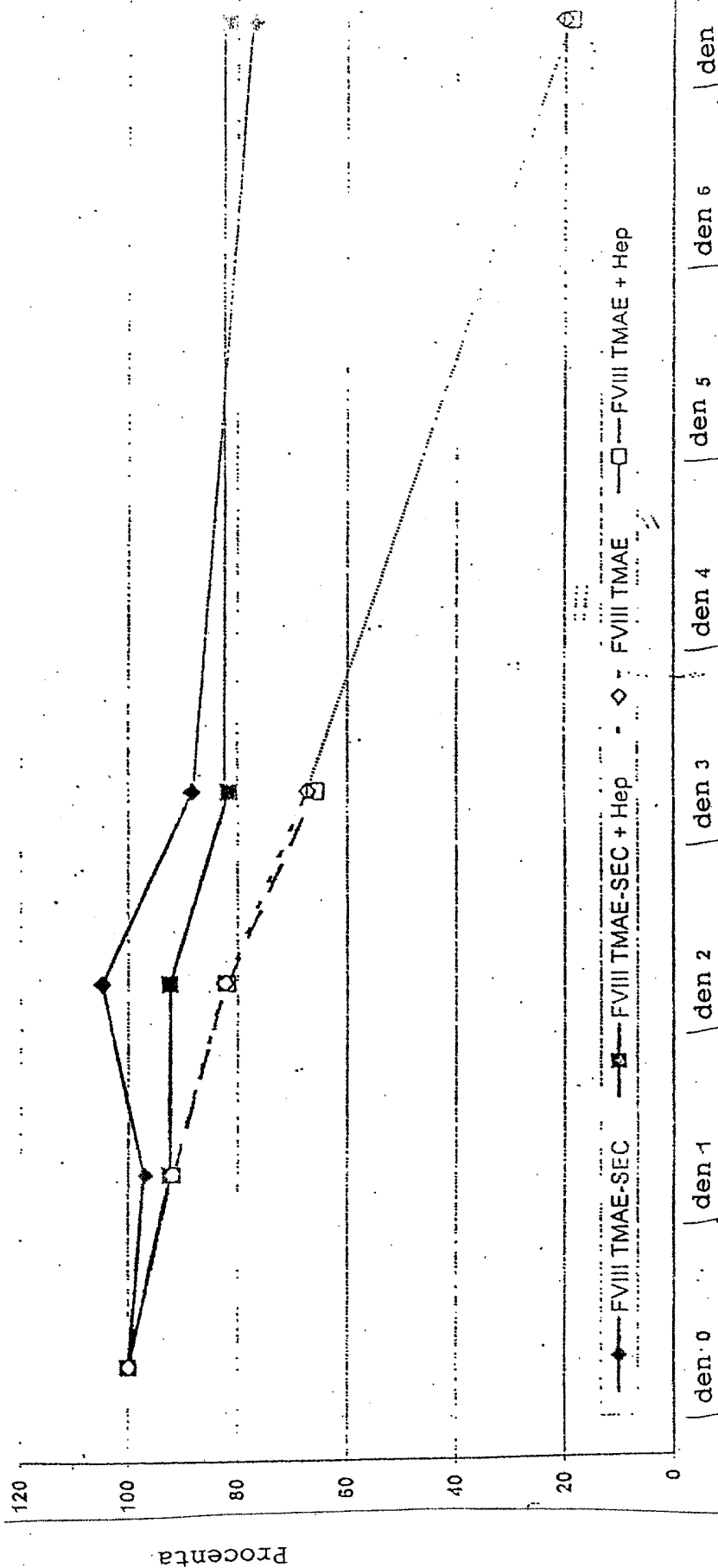
000000

PV 2002-3454

Srovnání F-VIII koncentrátů FVIII TMAE vs. FVIII TMAE-SEC
Skladování v infusních vacích při teplotě místnosti; $\pm$
heparin

FVIII: C chromogenní

Obr. 1



FVIII koncentráty byly rekonstituovány v Aqua pro inj. a Aqua pro inj. obsahující 5 IU heparinu/ml, v příslušném pořadí. Po přenosu do infusních vaků se vzorky uskladnily při teplotě místnosti. V uvedených časech se odebraly vzorky, které se vyšetřily na aktivitu FVIII:C (chromogenní). Zisk FVIII je vyjádřen v procentech počáteční