



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323861**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

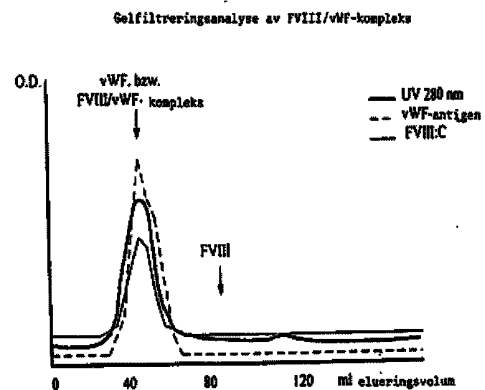
C07K 14/755 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19994084	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.02.18 PCT/AT98/00033
(22)	Inng.dag	1999.08.24	(85)	Videreføringsdag	1999.08.24
(24)	Løpedag	1998.02.18	(30)	Prioritet	1997.02.27, AT, 339/97
(41)	Alm.tilgj	1999.10.19			
(45)	Meddelt	2007.07.16			
(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			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte ved utvinning av høyren vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks			
(56)	Anførte publikasjoner	Hornsey VS et al., Thromb. Haemost., 1987 feb. 3.; 57(1):102-105 US 4774323			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet en fremgangsmåte ved utvinning av høyren vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks ved hjelp av immunaффinitetskromatografi som er særpreget ved at en til en immunadsorbens bundet vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks elueres med et elueringsmiddel hvilket inneholder et zwitterion som vesentlig aktiv bestanddel ved opprettholdelse av den molekulære integritet av vWF hhv. faktor VIII/vWF-komplekset. Dessuten er det beskrevet et preparat hvilket inneholder høyren vWF med en spesifikk aktivitet på minst 100 U/mg protein som oppnås ved immunaффinitetskromatografi, samt anvendelsen av dette preparat ved fremstilling av et legemiddel til behandling av vWD eller fenotypisk hemofili A..



Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte ved utvinning av høyren vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks fra biologisk utgangsmateriale ved hjelp av immunaffinitetskromatografi, hvor fremgangsmåten omfatter de trekk som er angitt i krav 1's karakteriserende del.

Blodkoaguleringen er en kompleks prosess som omfatter den sekvensielle interaksjon av en rekke komponenter, spesielt fibrinogen, faktor II, faktor V, faktor VII, faktor VIII, faktor IX, faktor X, faktor XI og faktor XII. Tapet av en av disse komponenter eller inhibering av dens funksjonalitet, fører til en forsterket blodkoaguleringstilbøyelighet som hos noen pasienter kan være livsfarlig.

Von Willebrand Faktor (vWF) sirkulerer i plasma komplekst med faktor VIII, idet faktor VIII understøtter blodkoaguleringen, og vWF i kompleks med faktor VIII stabiliserer denne og beskytter den mot proteolytisk nedbrytning. Gjennom sin funksjon ved plateaggregering griper vWF også direkte inn i blodkoaguleringen. vWF eksisterer i plasma i en serie av multimere former med en molekylvekt på 1×10^6 til 20×10^6 dalton. vWF er et glykoprotein som dannes fortrinnsvis i endotelceller hos pattedyr og deretter settes fri til sirkulasjon. Herved dannes en vWF-dimer med en molekylvekt på 550 kD i cellene ut fra en polypeptidkjede med en molekylvekt på ca. 220 kD ved dannelse av flere svovelbroer. Fra vWF-dimeren fremstilles derefter ved sammenknytning, ytterligere polymerer av vWF med stadig høyere molekylvekt inntil 20 mill. dalton. Man antar at spesielt den høymolekulære vWF-multimer har en essensiell betydning ved blodkoaguleringen.

Ved hemofili er blodkoaguleringen forstyrret av mangel på bestemte plasmatiske blodkoaguleringsfaktorer. Ved hemofili A skyldes blødningstilbøyeligheten mangel på faktor VIII hhv. mangel av vWF som utgjør en vesentlig bestanddel av faktor VIII. Behandlingen av hemofili A skjer i første rekke ved å erstatte den manglende koaguleringsfaktor med

faktorkonsentrater, f.eks. ved infusjon av faktor VIII, faktor VIII-kompleks eller vWF.

5 vWF-syndromet har flere sykdomsbilder som kan føres tilbake til en under- eller overproduksjon av vWF. Således fører en overproduksjon av vWF til en øket tilbøyelighet til tromboser. En underforsyning på grunn av fraværet eller en reduksjon av høymolekylære former av vWF, manifesterer seg i en øket blødningstilbøyelighet og en forlenget blødnings-
10 tid som skyldes inhiberingen av plateaggregeringen og sårlukningen.

Mangel på vWF kan også frembringe en fenotypisk hemofili A, da vWF er en vesentlig bestanddel av den funksjonelle faktor VIII. I disse tilfeller er faktor VIIIs halverings-
15 tid nedsatt slik at dens funksjon i blodkoaguleringskaskaden blir påvirket. Pasienter med von Willebrand-syndrom (vWD) har således ofte en faktor VIII-mangel. Hos disse pasienter er den reduserte faktor VIII-aktivitet ikke
20 en kosekvens av en defekt i det X-kromosomale gen, men en indirekte følge av den kvantitative og kvalitative forandring av vWF i plasmaet. Å skille mellom hemofili A og vWD kan normalt skje ved måling av vWF-antigenet eller ved bestemmelse av ristocetin-kofaktor-aktiviteten. Såvel vWF-
25 antigeninnholdet som ristocetin-kofaktor-aktiviteten er nedsatt hos de fleste vWD-pasienter, mens den er normal hos hemofili A-pasienter.

Ved konvensjonelle behandlingsmetoder av von Willebrand-syndromet brukes plasma dannet av vWF, idet det finnes en rekke blandinger for behandling av vWD-pasienter med renset vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks. Utviklingen av monoklonale og polyklonale antistoffer mot blodfaktorer, spesielt mot vWF, muliggjorde en forbedret isolering og
30 rensing av vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks fra plasma eller andre biologiske kilder.

Rensingen av faktor VIII hhv. faktor VIII/vWF-kompleks fra plasma blir vanskeliggjort spesielt ved at faktor VIII bare
40 forekommer i meget små mengder, er ekstremt labil, og

assosiasjonen av faktor VIII med vWF er reversibel under spesifikke betingelser.

Ved ekspresjon av faktor VIII i rekombinante celler (Wood
5 et al., Nature 312: 330-337, 1984) kunne faktor VIII
fremstilles genteknisk, men først ved tilsetning eller
koekspresjon av vWF kunne det oppnås et kommersielt
brukbart utbytte av rekombinant faktor VIII. Likeledes ble
vWF fremstilt ved gentekniske fremgangsmåter og eksprimert
10 i rekombinante celler (Fischer et al., 1994, FEBS Letters
351: 345-348).

Utvinningsprosessen av rensset faktor VIII, vWF eller faktor
VIII/vWF-kompleks fra plasma eller faktor VIII hhv. vWF fra
15 rekombinante celler ved hjelp av forskjellige rensingspro-
sesser er likeledes beskrevet.

Zimmerman et al. (US 4,361,509) beskriver en fremgangsmåte
for rensing av faktor VIII, idet faktor VIII/vWF-kompleks
20 bindes til et monoklonalt anti-vWF-antistoff og faktor VIII
dissosieres fra komplekset ved hjelp av CaCl_2 -ioner. Den
således oppnådde faktor VIII utvinnes derefter i ren form
via et ytterligere kromatografitrinn. Immunaffinitets-
bæreren som vWF fremdeles er adsorbert på, regenereres med
25 en agens, spesielt NaSCN , idet en vWF/ NaSCN -løsning dannes
som biprodukt og kastes.

US 5,006,642 beskriver utvinningen av vWF fra en ifølge US
4,361,509 som biprodukt dannet løsning av vWF og kaotrop
30 agens ved dialyse mot en egnet buffer eller ved avsalting
av en løsning ved hjelp av et ytterligere kromatografisk
trinn.

EP 0 383 234 beskriver fremstillingen av et vWF-konsentrat
35 ved hjelp av anionebytterkromatografi, idet et faktor
VIII/vWF-kompleks som foreligger i en løsning, dissosieres
ved tilsetning av en kalsium- og aminosyreholdig buffer, og
et vWF-konsentrat utvinnes.

EP 0 469 985 beskriver en fremgangsmåte ved fremstilling av vWF fra plasma-kryopresipitat som for det meste er fritt for faktor VIII, hvor vWF skilles fra faktor VIII i et første rensetrinn, idet faktor VIII binder til en

5 anionebytter, mens vWF ikke blir bundet. I et andre trinn minskes saltkonsentrasjonen av det vWF-holdige eluat slik at vWF kan binde seg til en andre anionebytter. vWF elueres derefter ved økning av ionestyrken.

- 10 For anvendelse i terapi av pasienter med von Willebrand-syndromet, men også pasienter med fenotypisk hemofili A, er en renset vWF, som eventuelt er kompleksert med faktor VIII, ønskelig. Dessuten oppnås en bedre lagringsstabilitet av faktor VIII-preparater ved den stabiliserende effekt av
- 15 vWF.

For rensing av faktor VIII/vWF-komplekset ble det foreslått å felle ut kontaminerende proteiner, såsom f.eks. fibrinogen, med høye konsentrasjoner av aminosyrer, spesielt

20 glysin (WO 82/04395, EP 0 383 234).

EP 0 600 480 beskriver rensingen av faktor VIII/vWF-komplekset fra plasma ved hjelp av en kombinasjon av anion/kationebytterkromatografi, idet faktor VIII/vWF-

25 komplekset stabiliseres med heparin, og eventuelt lysin tilsettes som antiprotease.

EP 0 295 645 beskriver rensing av faktor VIII/vWF-komplekset på en affinitetsmatrise, idet spesifikke

30 peptider som binder til vWF anvendes som affinitetsbærere, som komplekset binder seg til og som deretter elueres med en pH-gradient.

WO 96/10584 beskriver en fremgangsmåte for utvinning av

35 høyren rekombinant vWF ved hjelp av kombinerte anionebytter/heparin-affinitetskromatografi, og EP 0 705 846 beskriver separasjonen mellom høy- og lav-molekylære fraksjoner av vWF.

Mejan et al. (1988, Throm. Haemost. 59: 364-371) har foreslått å rense faktor VIII/vWF-kompleks fra plasma ved hjelp av immun-affinitet. Ved anvendelse av et vWF-spesifikt antistoff, koblet til en bærer, bindes under

5 fysiologiske betingelser faktor VIII/vWF-kompleks til bæreren og komplekset elueres under alkaliske betingelser ved en pH-verdi på 10,2. Eluatet blandes straks med 2 M eddiksyre for å nøytralisere det alkaliske miljø, stabiliseres med humant serumalbumin og lyofiliseres

10 derefter. Det svakt alkaliske elueringsmiljø ble valgt spesielt for å forhindre en dissosiasjon av faktor VIII/vWF-komplekset og en inaktivering av faktor VIII.

Imidlertid blir det alltid fremhevet at det ved rensing av

15 komplekset er spesielt vanskelig å oppnå assosiasjonen av proteinene, da komplekset av de to komponenter er ustabilt. Mejan et al. (1988, Throm. Haemost. 59: 364-371) oppnådde med sin fremgangsmåte en 50% gjenvinning av faktor VIII/vWF-komplekset med en spesifikk aktivitet av faktor

20 VIII ≥ 20 U/mg og av vWF ≥ 20 U/mg. Under de beskrevne elueringsbetingelser ble det imidlertid iaktatt en delvis frisettselse av antistoffer fra søylen, noe som førte til en kontaminasjon av eluatet med ca. 90 ng/ml eluat av muse-IgG. Antistoffene måtte således fjernes ved hjelp av et

25 ytterligere kromatografiske trinn.

Hornsey et al. (1987, Throm. Haemost. 57: 102-105) undersøkte påvirkningen av forskjellige elueringsmidler ved immunaffinitetsrensing av faktor VIII/vWF-kompleks og slo

30 fast at kaotrope agenser, såsom kaliumjodid og litiumdijodsalicylater, virker spesielt effektivt som elueringsmiddel. Det anvendte elueringsmiddel inneholdt dessuten kalsiumklorid-ioner og 1 M lysin for å stabilisere faktor VIII- og vWF-aktivitet. Det ble iaktatt at den høye

35 konsentrasjon av aminosyren beskytter proteinene mot den denaturerende effekt av den kaotrope agens. Under de anvendte elueringsbetingelser ble det funnet at sluttproduktet var forurenset med immunadsorbens, her mus-monoklonale vWF-antistoffer, inntil 30 ng/ml (ca. 300 ng/mg

40 protein). Det kaotrope desorpsjonsmiddel måtte likeledes

fjernes fra produktet ved hjelp av et ytterligere rensetrinn på grunn av sin høye toksisitet. Hornsey et al. (1987, Throm. Haemost. 57: 102-105) oppnådde ved immunaffinitetskromatografi et utbytte på 57% faktor VIII:C og 44% vWF og en spesifikk aktivitet på 45 U faktor VIII og 60 U ristocetin-aktivitet/mg protein.

Selv om immunaffiniteten for rensingen av vWF eller faktor VIII/vWF-komplekset er en av de foretrukne metoder, er den største ulempe ved anvendelse av immunaffinitetskromatografi den mulige kontaminasjon av sluttproduktet med immunadsorbens samt den nødvendige regenerering av den anvendte affinitetsmatrise. Den sterke binding mellom antistoffer og vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks gjør det ofte nødvendig å anvende et sterkt desorpsjonsmiddel, såsom f.eks. en kaotrop agens. Således påvirkes ikke bare aktiviteten og den molekylære struktur av vWF eller faktor VIII/vWF-komplekset, men det medfører også en uttrekking (lekasje) av immunbæreren på grunn av en kontinuerlig frisetting av antistoffer fra bæreren. Affinitetsbærerens halveringstid nedsettes sterkt og dens mangfoldige anvendbarhet påvirkes. Da anvendelsen av immunitetsaffinitetssøylen spesielt for kommersielle preparater av vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks er meget kostbar, ville det således være ønskelig å tilveiebringe en fremgangsmåte som ikke har disse ulemper.

Foreliggende oppfinnelles formål består således i å tilveiebringe en forbedret fremgangsmåte for utvinning av vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks ved hjelp av immunaffinitetskromatografi som ikke har de ovenfor beskrevne ulemper.

Oppgaven løses ifølge oppfinnelsen ved at det tilveiebringes en fremgangsmåte ved hvilken vWF eller faktor VIII/vWF-komplekset renses ved hjelp av immunaffinitetskromatografi, idet en på en immunadsorbens bundet vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks elueres med et elueringsmiddel hvilket inneholder et zwitterion som vesentlig aktiv bestanddel, idet nevnte zwitterion er valgt fra aminosyrer eller aminosyreanaloger som har et isoelektrisk område

mellom 3,2 og 9,6 og hvor antistoff/antigen-komplekset dissosieres uten anvendelse av kaotropisk middel.

Som zwitterion i elueringsmiddelet kan ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes f.eks. aminosyrer eller analoger av aminosyrer hvis isoelektriske område ligger mellom 3,2 og 9,6 og som i det nøytrale pH-område foreligger som zwitterion. De foretrukne zwitterioner er her valgt fra gruppen av nøytrale aminosyrer eller analoger derav, fortrinnsvis alanin, β -alanin, 2-aminosmørsyre, 4-aminosmørsyre, sparagin, citrullin, glutamin, glysin, histidin, isoleucin, leucin, metionin, fenylalanin, prolin, sarkosin, serin, taurin, treonin, tryptofan og tyrosin, eller betainer eller analoger derav, spesielt sulfobetainer.

For gjennomføringen av fremgangsmåten er det spesielt foretrukket aminosyrene alanin, β -alanin, glysin, histidin, fenylalanin eller betain. Zwitterionene kan ifølge den foreliggende fremgangsmåte foreligge i en vandig løsning i en konsentrasjon mellom 0,01 og 0,5 M, fortrinnsvis mellom 0,08 og 0,2 M, spesielt foretrukket mellom 0,1 og 0,15 M. Vandige løsninger kan her være løsninger som utelukkende består av vann og ikke inneholder noen andre tilsetninger.

Elueringsmiddelet som inneholder zwitterionet, kan ifølge foreliggende fremgangsmåte oppvise en fysiologisk pH-verdi, fortrinnsvis en pH-verdi mellom 6,5 og 8,0, spesielt foretrukket mellom 7,0 og 7,8, særlig foretrukket 7,4. I dette pH-område forholder alle de ovennevnte aminosyrer eller analoger derav seg elektrisk nøytralt og foreligger som zwitterioner.

Elueringsmiddelet kan fremstilles ved enkel oppløsning av aminosyren eller analogen av en aminosyre med den ønskede molaritet i vann. Da pH-verdien og ionestyrken av zwitterionet, på grunn av zwitterionets nøytrale ladning, ikke forandrer seg, eller bare forandrer seg ubetydelig, er ikke en justering av en pH-verdi eller ionestyrken absolutt nødvendig. Da i noen tilfeller, f.eks. når ett eller flere

virusinaktiveringstrinn gjennomføres, ønskes en ytterligere stabilisering av eluatet som inneholder vWF hhv. vWF-komplekset, kan det eventuelt som ytterligere substanser anvendes sukker, f.eks. sakkarose eller matose som

5 stabilisatorer. Da slike sukkertyper likeledes forholder seg kjemisk/fysikalisk nøytrale, skjer det ved tilsetningen ingen pH-forandringer i elueringsmiddelet.

Anvendelsen av aminosyrer såsom f.eks. glysin, histidin

10 eller arginin som utfellingsmiddel, antiprotease eller stabilisator, eller for en forbedret rekonstitusjon av faktor VIII-løsninger, er f.eks. beskrevet i EP O 383 234 eller EP O 600 480, hvor konsentrasjonen av de anvendte aminosyrer lå mellom 0,5 - 3 M. Dessuten er aminosyrer

15 kjent som bestanddel av elueringsmidler eller buffere ved kromatografiske prosesser. Tsang et al. (1991, J. Immunol. Methods 138: 291-299) undersøkte forskjellige dissosiasjonsbetingelser av antigener som er bundet til immun-

20 affinitetsmatriser, og fant at kaotrope midler er de mest effektive dissosiasjonsreagenser for løsning av antigen-antistoffer-bindinger. Den spesifikke aktivitet av de eluerte proteiner var imidlertid liten på grunn av den denaturerende virkning av de kaotrope agenser. Anvendelsen av 0,5 M glysin, pH 2,0, som elueringsreagens viste en

25 forholdsvis liten dissosiasjonskapasitet og en relativt liten spesifikk aktivitet av det erholdte protein. Den lave pH-verdi av elueringsmiddelet gjorde det dessuten nødvendig å raskt nøytralisere eluatet for å unngå et ytterligere proteinaktivitetstap. Likeledes ble det funnet at anti-

30 stoffer under disse betingelser løsner fra bæreren og når inn i eluatet.

På grunn av iakttagelsene til Tsang et al. (1991, J. Immunol. Methods 138: 291-299) var det således desto mer

35 overraskende at det innen rammen av foreliggende oppfinnelse ble funnet at et elueringsmiddel som, som vesentlig aktivt elueringsreagens, inneholder et zwitterion som er i stand til effektivt å dissosiere et antistoff/antigen-kompleks under milde betingelser og i nøytrale pH-områder

40 og uten anvendelse av kaotrope agenser. Ved de milde

elueringsbetingelser oppnås ikke bare effektivt det ønskede antigen i rensert form og fritt for forurensende bestanddeler på grunn av den høye spesifitet til antistoffer, men det kan også utvinnes vesentlig fri for immunadsorbens, da

5 det riktignok skjer en dissosiasjon av antistoff-antigenkomplekset, men bindingen av antistoffet til bæreren blir ikke påvirket og antistoffet forblir stabilt assosiert med bæreren.

- 10 For gjennomføringen av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan det som ligand anvendes en hvilken som helst immunadsorbens som har en bindingsspesifitet til vWF og som kan immobiliseres som ligand til en fast bærer.
- 15 Ifølge en utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes et anti-vWF-antistoff som immunadsorbens. Det anvendte antistoff kan være polyklonalt eller monoklonalt. Spesielt foretrukket er imidlertid monoklonale antistoffer. For gjennomføringen av fremgangsmåten ifølge
- 20 oppfinnelsen kan alle tidligere kjente anti-vWF-antistoffer anvendes, f.eks. slike som er beskrevet av Goodall et al. (Throm.Haemost. 54: 878-891, 1985). Fortrinnsvis anvendes det et monoklonalt vWF-antistoff fra et zwitterom, valgt fra serien av cellzwitteriseringer av musmyelom X63 og
- 25 splenocytter av BALB/C-mus, immunisert med faktor VIII/vWF-kompleks, slik som f.eks. beskrevet i EP 0 179 006.

- Ifølge en foretrukken utførelsesform anvendes som ligand et fragment av et anti-vWF-antistoff som binder vWF hhv.
- 30 faktor VIII/vWF-komplekset for gjennomføringen av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Spesielt foretrukket er her F'-ab-fragmentet av et vWF-antistoff. Anvendelsen av et fragment av et spesifikt antistoff har den fordel at det på en enkel måte kan fremstilles en affinitetsbærerematriks med
- 35 antistoff-fragmentet som ligand, idet bærerens antigenbindingskapasiteten og bindingseffektiviteten kan økes på grunn av ligandens ubetydelige molekylære størrelse. Også risikoen for at produktet kan bli forurensert på grunn av et komplett antistoff som eventuelt når inn i eluatet, blir
- 40 sterkt nedsatt og kan således neglisjeres.

Immunadsorbensen er fortrinnsvis immobilisert på en bærer, hvorved det som bærer kan anvendes alle tidligere kjente naturlige eller syntetiske uopløslige polymerer som er egnet for affinitetskromatografi.

5

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utgjør en enkel og effektiv metode for utvinning av vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks med en høy spesifikk aktivitet og utbytte fra en eventuelt ikke på forhånd rensset proteinløsning. Som
10 utgangsmateriale inneholdende vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks kan det her anvendes en hvilken som helst biologisk løsning, f.eks. plasma, en plasmabank, en plasmafraksjon, et kryopresipitat, resten av en cellekultur som uttrykker rekombinant vWF eller faktor VIII hhv. uttrykker
15 samtidig faktor VIII og vWF, eller en på forhånd rensset proteinløsning. Foreliggende fremgangsmåte er imidlertid spesielt egnet til å utvinne vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks fra proteinløsninger som ikke er rensset på forhånd, f.eks. direkte fra plasma eller resten av en
20 rekombinant cellekultur. vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks som foreligger i et utgangsmateriale, bindes ifølge foreliggende fremgangsmåte fortrinnsvis under fysiologiske betingelser til immunadsorbensen. Derved justeres utgangsløsningen ved en temperatur mellom 4°C og 20°C til
25 en pH-verdi mellom 6,5 og 7,8 og bringes i kontakt med immunadsorbensen, hvorved vWF hhv. faktor VIII kompleksert med vWF bindes på grunn av antistoffets spesifikke bindingsevne til vWF, mens derimot andre proteiner som foreligger i løsningen, ikke blir bundet og således kan
30 separeres på en enkel måte fra vWF eller faktor VIII/vWF-komplekset.

Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og elueringen med en buffer i nøytralt pH-område, inneholdende
35 som vesentlig eluerende agens et zwitterion, kan vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks utvinnes fra immunadsorbens med spesielt høy effektivitet. På grunn av den spesifikke interaksjon av vWF og faktor VIII i et kompleks, blir også faktor VIII kompleksert med vWF bundet, mens deimot fri,
40 ikke-kompleksert faktor VIII ikke kan bindes til immun-

adsorbensen. Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utvinnes således ren vWF hhv. utelukkende vWF kompleksert med faktor VIII. Det ble spesielt fastslått at ca. 85% av vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks som foreligger i utgangsmateriale, kan gjenvinnes. Ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gjenvinnes således vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks med en renhet på mer enn 90 %, fortrinnsvis på mer enn 95%. Denne høye gjenvinningsgrad og renhet ble ikke oppnådd med de hittil beskrevne kromatografiprosesser i ett fremgangsmåtettrinn. Også anvendelsen av det beskrevne elueringsmiddel og de milde elueringsbetingelser har den fordel at assosiasjonen av faktor VIII med vWF og således den fysiologiske og molekylære struktur av komplekset opprettholdes.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har dessuten den spesielle fordel at det før og under elueringen ikke må skje noen pH-forandring i løsningen som inneholder proteinene, og den biologiske aktivitet av proteinet som skal renses, ikke påvirkes av noen pH-forandring.

Ved anvendelse av det ovenfor beskrevne elueringsmiddel desorberes vWF hhv. vWF-komplekset effektivt fra immunadsorbensen uten at den strukturelle integritet av vWF hhv. aktiviteten av vWF eller faktor VIII blir påvirket. Upåvirkeligheten av den strukturelle integritet av vWF ble påvist spesielt ved vWF-multimeranalyse, som f.eks. beskrevet i EP 0 705 846, før adsorpsjon og etter eluering fra immun-bæreren. Likeledes har det vist seg at vWFs kollagenbindingsaktivitet samt den spesifikke plateagglutineringsaktivitet ikke er vesentlig påvirket.

Sammenligning av faktor VIII:Ag med faktor VIII:C-aktivitet i utgangsmateriale og etter eluering fra bæreren viste at forholdet ikke forandrer seg. Den spesifikke aktivitet utgjør fortrinnsvis > 80 U/mg.

Det med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppnådde høyrene vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks kan renses ytterligere ved hjelp av de tidligere kjente kromatografiske metoder

såsom ionebytter-, affinitets- eller gelfiltreringskromatografi. Renset faktor VIII/vWF-kompleks kan eksempelvis adsorberes på en affinitetsbærer som spesifikt binder enten vWF eller faktor VIII, og proteinene kan utvinnes med en
5 buffer som dissosierer komplekset, f.eks. en buffer med lavere pH-verdi, høyere ionestyrke, inneholdende CaCl_2 eller NaCl , adskilt fra hverandre og i fri form. På denne måte kan det oppnås selektivt fri, faktor VIII ikke kompleksert med vWF hhv. ikke kompleksert med faktor
10 VIII. De således isolerte proteiner eller antigener utmerker seg spesielt ved at de alle er påvirket med hensyn til vWF-bindingen hhv. faktor VIII-bindingen. Således kan det oppnås målrettet høyren faktor VIII med en høy vWF-bindingsspesifitet hhv. høyren vWF med høy faktor VIII-bindingsspesifitet i forhold til antigeninnholdet.
15

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer således høyrent vWF med en faktor VIII-bindingskapasitet på mer enn 90%, fortrinnsvis mer enn 95% hhv. faktor VIII med en vWF-
20 bindingsaffinitet på minst 90%. En således renset vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks kan renses ytterligere ved hjelp av heparinaffinitetskromatografi slik som beskrevet f.eks. i EP 0 705 846, idet høymolekylære vWF-multimerer anrikes. Den således dannede vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks som
25 inneholder spesielt høymolekylære vWF-multimere, utmerker seg ved en høy spesifikk plateaggregering på minst 60 U/mg protein.

Spesielt utvinnes med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen renset vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks i en vandig
30 løsning, inneholdende et zwitterion i en konsentrasjon mellom 0,08 M til 0,2 M og en pH mellom 7,3 og 7,8, idet zwitterionet velges fra gruppen av aminosyrene glysin, alanin, β -alanin, fenylalanin og histidin, eller fra
35 betainene. Denne rensede vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks kan da eventuelt underkastes et ytterligere, tidligere kjent virusfjernings- og/eller virusinaktiveringstrinn.

Den rensede løsning kan sterilfiltreres f.eks. direkte via
40 et filter med en porebredde mellom 100 nm til 0,45 μm og

lyofiliseres uten tilsetning av en stabilisator, spesielt en høymolekylær stabilisator.

5 Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan anvendes ved rensing og utvinning av rekombinant eller plasmatisk vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks.

10 Det rensede vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks kan dannes til et stabilt preparat som inneholder høyren vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks som kan oppnås ved immunaффinitetskromatografi. Det stabile preparat kan inneholde vWF med en renhet på minst 95% og en spesifikk antigen-aktivitet på minst 95 U/mg protein, fortrinnsvis 100 U/mg protein. Et stabilt preparat som inneholder faktor 15 VIII/vWF-kompleks oppviser en renhet på minst 95%, fortrinnsvis 99%, idet den spesifikke aktivitet av faktor VIII:C utgjør minst 95 U/mg protein og av vWF minst 95 U/mg protein og således er forholdet av den spesifikke aktivitet i komplekset 1:1.

20 Ifølge en spesiell utførelsesform består faktor VIII/vWF-komplekset av rekombinant faktor VIII og rekombinant vWF, idet forholdet mellom faktor VIII og vWF ligger mellom 0,01 og 100, fortrinnsvis mellom 1:30 og 1:70, spesielt foretrukket ved omtrent 1:50. Cellekulturrestene av rekombinant 25 vWF- hhv. faktor VIII-eksprimerende celler kan blandes med en definert konsentrasjon av antigen i et bestemt, ønsket forhold, og etter gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også rensset kompleks bestående av 30 rekombinante proteiner gjenvinnes i det ønskede forhold.

Som kjent, degraderes vWF ved rensingen fra plasma eller kryopresipitat ved eventuelt nærværende proteaser til lavmolekylære vWF-fragmenter, som derefter kan identi- 35 fiseres som en lavmolekylær-fraksjon med satellittbånd i SDS-gel (Furlan et al., 1993, PNAS. 90: 7503-7507). Også faktor VIII aktiviseres delvis ved nærværende proteaser, idet den spesifikke aktivitet av faktor VIII/vWF-kompleks reduseres.

Det kan også tilveiebringes et stabil preparat inneholdende høyren vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks, som utmerker seg spesielt ved at den molekulære og strukturelle integritet av vWF hhv. faktor VIII/vWF-komplekset i det vesentlige
5 opprettholdes og at det ikke inneholder noen proteolytiske nedbrytningsprodukter av vWF eller aktivert faktor VIII.

Et slikt preparatet er fritt for forurensinger forårsaket av immunadsorbensen, idet mengden av eventuelt foreliggende
10 immunadsorbens, spesielt antistoffer, er mindre enn 15 ng/mg protein, fortrinnsvis mindre enn 10 ng/mg protein og spesielt foretrukket mindre enn 7 ng/mg protein. Dessuten utmerker et slikt preparat seg ved at det inneholder mindre enn 3%, fortrinnsvis mindre enn 1% fibrinogen og mindre enn
15 1%, fortrinnsvis mindre enn 0,5% fibronektin. Bestemmelsen av fibrinogen- hhv. fibronektin-innholdet skjer her ved hjelp av ELISA ifølge kjent teknikk.

Innen rammen av foreliggende oppfinnelse har det vist seg
20 at spesielt ved anvendelse av et elueringsmiddel, inneholdende i bufferen en aminosyre såsom glysin, histidin eller alanin, som vesentlig eluerende agens, som hittil også har blitt anvendt for å stabilisere proteinløsninger, kan den eluerte vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks under
25 hele rensingsprosessen holdes i et stabiliserende miljø, og det således oppnådde preparat er spesielt stabilt.

Det aktuelle preparatet er stabilt i en løsning ved 4°C over et tidsrom på minst 2 uker, dypfryst ved -20°C i minst
30 6 måneder og som lyofilisat i minst 1 år ved en temperatur på -20°C til 4°C. På grunn av nærværet av f.eks. histidin i elueringsmiddelet forhindres dessuten en presipitasjon av vWF- hhv. faktor VIII/vWF-komplekset ved lyofiliseringsprosessen. Preparatet kan således forarbeides videre, eventuelt uten ytterligere tilsetninger, direkte til et lyofilisert produkt. For å forbedre rekonstitueringen av det lyofiliserte preparat kan det også, slik som f.eks.
35 beskrevet i WO 93/22336, tilsettes arginin. Det stabile preparat kan formuleres for administrasjon på mennesker på
40 tilsvarende måte som stabile farmasøytiske preparater, og

inneholde egnede buffere eller fysiologisk aksepterbare bærere. Som allerede nevnt ovenfor, kan det på grunn av preparatets spesielt gode stabilitet eventuelt sløyfes tilsetningen av en stabilisator. Som kjent, blir den

5 spesifikk aktivitet av et antigenpreparat redusert ved tilsetning av en stabilisator, spesielt HSA, hvorved den administrerte farmasøytiske sammensetning viser en mindre spesifikk aktivitet enn proteinpreparatet dannet direkte etter rensing.

10

Ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles således vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks med en renhet på minst 95%, fortrinnsvis 99%, og en spesifikk aktivitet av vWF på minst 95 U/mg og faktor VIII på minst

15 95 U/mg, som kan innlemmes i en sammensetning og som i det vesentlige er fri for høymolekylære substanser og stabilisatorer, spesielt HSA. Således adskiller det farmasøytiske preparat seg fra de hittil kjente sammensetninger som for stabilisering inneholder substanser såsom f.eks. albumin

20 eller heparin.

Prinsipielt behøves imidlertid ingen ytterligere kostbar omformulering av det rensede preparat for administrasjon til mennesker, da det rensede produkt allerede kan oppnås i

25 en fysiologisk aksepterbar sammensetning fra affinitetsbæreren. Likeledes foreligger det allerede i eluatet i en stabil og stabilisert form.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utgjør således en enkel fremgangsmåte for skånende utvinning av høyren vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks og en enkel fremstilling av et stabilt farmasøytisk preparat som kan anvendes eventuelt direkte til terapeutisk bruk.

30

35 Før bearbeiding av det høyrene vWF hhv. vWF-kompleks til et farmasøytisk preparat er det fordelaktig å foreta en inaktivering eller fjerning av virus. Dette kan skje ved fra tidligere kjent kjemisk og/eller fysikals behandling. Da i det stabile preparat vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks

40 foreligger i et fysiologisk og stabiliserende miljø på

grunn av nærværet av aminosyrer, såsom glysin, alanin eller histidin, kan det rensede produkt, eventuelt uten ytterligere tilsetning av stabilisatorer direkte underkastes et virusinaktiveringstrinn.

5

Det stabile preparat, kan anvendes ved fremstilling av et legemiddel for behandling av hemofili A eller vWD.

Oppfinnelsen skal i det følgende forklares nærmere ved
10 hjelp av eksempler og tegningsfiguren.

Fig. 1 viser en gelfiltreringsanalyse av faktor VIII/vWF-komplekset.

15 Eksempel 1 beskriver bestemmelsen av vekselvirkningen av forskjellige anti-vWF-antistoffer og vWF ved hjelp av "Surface Plasmon Resonance" og desorpsjon av antigenet fra komplekset med forskjellige buffere; eksempel 2 beskriver desorpsjonsforholdet mellom vWF-antigenet og antigen-
20 antistoffkomplekset under forskjellige bufferbetingelser; eksempel 3 beskriver rensingen av rekombinant vWF fra cellekulturrester ved hjelp av immunaffinitet; eksempel 4 beskriver rensingen av plasmatisk faktor VIII/vWF-kompleks; eksempel 5 beskriver anvendelsen av et antistoff-fragment
25 for immunaffinitetsrensing av vWF; eksempel 6 beskriver etterrensing av immunaffinitetsrenset vWF ved hjelp av heparin-affinitetskromatografi; eksempel 7 beskriver påvirkningen av elueringsmiddelet på faktor VIII:C-aktivitet; eksempel 8 beskriver rensing av et kompleks
30 bestående av rekombinant faktor VIII og rekombinant vWF; eksempel 9 beskriver testing av et eluat på mus-IgG og F'ab-fragmenter og eksempel 10 viser integriteten av faktor VIII/vWF-komplekset i elueringsmiljøet ifølge oppfinnelsen.

35 EKSEMPLER

Generell metodebeskrivelse for testsystem til bestemmelse av vekselvirkningen av makromolekyler

Vekselvirkningen av makromolekyler, til dette teller også
40 reaksjonen av proteiner med spesifikke antistoffer, kan nå

forfølges direkte ved hjelp av en ny teknologi - Surface Plasmon Resonance - (Karlsson, 1994, Analyt. Biochem. 221: 142-151; Malmqvist, 1993, Nature 361: 186-187).

- 5 I et optisk system hvilket står i direkte kontakt med prøven som skal undersøkes, måles en av molekyl-konsentrasjonen avhengig parameter og gjengis i såkalte "Response-Units (RU)". Høye RU-verdier tilsvarer en høy konsentrasjon av adsorberte makromolekyler på
- 10 måleoverflaten (Sensor Chip).

Fordeler med metoden består i det ubetydelige substansforbruk, den raske gjennomførbarhet og muligheten for kinetisk bedømmelse av dataene.

15

Ved hjelp av dette målesystem ble de grunnleggende bindingsegenskaper av vWF-spesifikke antistoffer undersøkt.

EKSEMPEL 1:

20

Bestemmelse av vekselvirkningen av forskjellige anti-vWF-antistoffer og vWF ved hjelp av "Surface Plasmon Resonance" og desorpsjon av antigen fra komplekset med forskjellige buffere.

25

- Monoklonale anti-vWF-antistoffer (Immunotech, Marseille) ble bundet til det aktive sjikt av en CM-sensorchip ved hjelp av standardmetoden angitt av Pharmacia. Som negativkontroll ble et spor på sensorchipen påført et monoklonalt antistoff mot Pseudomonas Flagellin (PAM 24). Koblingens effektivitet fremgår av signalets økning. Sporene på sensorchipen ble etter koblingen vasket med 3M NaSCN for å fjerne uspesifikt adsorberte antistoffer fra chipoverflaten. vWF (på forhånd rensset via anionebytter-kromatografi) ble derefter ledet over chipoverflaten (adsorpsjonsfase). Etter en vaskeprosess med Tris-buffer, pH 7,4, ble forskjellige buffere som innerholder 100 mM glysin og økende pH-verdier fra pH 6,0 til pH 9,0 ledet over chipen (elueringsfase). Tabell 1 viser bestemmelsen av veksel-
- 30
- 35
- 40 virkningen av forskjellige anti-vWF-antistoffer og vWF ved

hjelp av "Surface Plasmon Resonance" og desorpsjon av antigenet fra komplekset med glysin-buffer med forskjellige pH-verdier.

5

Tabell 1

Spor	vWF-RU		Glysin-eluering							
			pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF	rvWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF	r-vWF	pdvWF
AvW8-1	650	490	145	220	40	65	15	20	10	20
AvW8-2	870	760	75	125	25	50	10	15	15	12
PAM 24	12	25	10	15	10	15	10	15	10	15
tomt spor	14	35	-5	5	-20	5	-20	5	-20	5

Ifølge funn av Mejan et al. (1988, Thromb. Haemost. 59: 364-371) ligger den maksimale affinitet mellom antistoffer og antigen mellom pH 5 og 7. Det var således ikke forventet at det adsorberte r-vWF skulle løsne allerede ved en pH-verdi på 6,0. Forandringen av desorpsjonsegenskapene til antigen-antistoff-komplekset ble ført tilbake ved nærvær av glysin i bufferen. Dessuten viste det seg at de to forskjellige anti-vWF-antistoffer AvW8-1 og AvW8-2 har samme egenskaper overfor glysin.

For å utelukke at det ved den iaktatte effekt dreier seg om en spesiell egenskap av rekombinant vWF, ble eksperimentet gjentatt med plasmatiske vWF (pdvWF), med samme resultat.

EKSEMPEL 2

25 Desorpsjonsegenskaper av vWF-antigenet fra antigen-antistoff-komplekset under forskjellige bufferbetingelser

For å undersøke vWF-antigen/anti-vWF-antistoff-vekselvirkningens natur, ble det gjennomført ytterligere elueringsforsøk med andre buffere/elueringsmidler. Fremfor alt ble virksamheten av buffere som inneholder forskjellige aminosyrer hhv. deres derivater ved pH 7,4 undersøkt.

Til de undersøkte substanser hører bl.a.: alanin, b-alanin, fenylalanin, histidin, arginin, lysin, glutaminsyre, asparaginsyre, betain og acetat.

- 5 Tabell 2 viser bestemmelsen av vekselvirkningen av anti-vWF-antistoffer og vWF-antigen ved hjelp av "Surface Plasmon Resonance" og desorpsjon av antigenet fra komplekset med buffere som inneholder for forskjellige aminosyrer som elueringsreagens.

10

Tabell 2

Aminosyre	RU før eluering	RU etter eluering	% elluert
Alanin	850	25	97
β-alanin	830	30	97
Fenylalanin	520	25	95
Histidin	550	15	97
Arginin	970	780	20
Lysin	840	730	13
Glutaminsyre	760	720	5
Asparaginsyre	670	590	12
Betain	680	-10	100
Acetat	570	550	3

- 15 Det ble funnet at spesielt aminosyrer med upolare grupper såsom glysin, alanin, β-alanin eller fenylalanin eller derivater derav hhv. aminosyrer, som foreligger i det nøytrale område som zwitterioner, såsom histidin, er i stand til å effektivt eluere vWF som er bundet til antistoffet (tabell 2).

20

Tilsvarende buffere som inneholder disse aminosyrer hhv. derivater derav, ble testet ved hjelp av immunaffinitets-kromatografi for rensing av vWF hhv. vWF/faktor VIII-kompleks.

25

EKSEMPEL 3:

Rensing av rekombinant vWF fra cellekulturrester ved hjelp av immunaffinitet

5

Det monoklonale anti-vWF-antistoff AvW8-2 ble ifølge produsentens instruksjoner koblet kovalent til CNBr-aktivert Sepharose (Pharmacia). Påføringen av resin med antistoffer utgjorde her 1 mg/ml pakket gel.

10

500 ml av en konsentrert fermentasjonsrest som inneholder rekombinant vWF (rvWF) ble med en lineær strømnings-hastighet på 20 cm/h ført på en søyle, fylt med 50 ml affinitetsharpiks. Etter påføringen av prøven ble søylen spylt med fosfat-buffer, pH 7,4, til UV-absorpsjonen av søyleutløpet har nådd basislinje verdien. Bundet rvWF ble eluert av søylen ved langsom (5 cm/h) eluering med 100 mM glysin, pH 7,4.

15

20 I tabell 3 er det vist analysedataene av de tilsvarende fraksjoner.

Tabell 3

Prøve	vWf Ag (ELISA)		Ristocetin-aktivitet		Protein		spes. aktivitet	
	µg/ml	%	U/ml	%	µg/mg	%	$\frac{\text{mg Ag}}{\text{mg Prot}}$	$\frac{\text{U RCoA}}{\text{mg Prot}}$
Utgang	120	100	1,5	100	1400	100	0,08	1,07
Absorbat	10	9	<0,02	<7	1220	96	0,008	<0,02
Eluat	370	74	5,0	80	350	6	1,06	14,2

25

Det fremgår av disse resultater at det under de angitte betingelser kan oppnås rekombinant vWF med høy renhet med en spesifikk antigen-aktivitet på minst 100 U/mg protein og med minst 74% gjenvinning med gode utbytter fra fermentasjonsrester.

30

EKSEMPEL 4:

Rensing av plasmatisk FVIII/vWF-kompleks

- 5 50 g kryopresipitat ble oppløst i 450 ml heparinbuffer. Protrombin-kompleksetsfaktorer ble fjernet ved tilsetning av 0,1% alhydrogel. Den rensede proteinløsning renses ved hjelp av immuaffinitet slik som beskrevet i eksempel 3. I tabell 4 er analysedataene angitt før og etter rensingen.

10

Tabell 4

Prøve	vWf Ag (ELISA)		FVIII-aktivitet		Protein		spes. aktivitet	
	µg/ml	%	U/ml	%	mg/ml	%	<u>mg vWF</u> mg prot	<u>FVIII:C</u> mg prot
Utgang	230	100	16	100	21	100	0,01	0,76
Absorbat	10,3	6	1,1	9	15,2	98	0,00	0,07
Eluat	320	68	25,5	78	0,27	0,9	1,18	94

- Tabell 4 viser at det ved anvendelse av kryopresipitat som utgangsmateriale kan oppnås et FVIII/vWF-kompleks med høy renhet, en spesifikk aktivitet av vWF på minst 118 antigen-U/mg protein og faktor VIII på minst 94 U/mg. Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fjernes fri faktor VIII og det gjenvinnes et i det vesentlige rent faktor VIII/vWF-kompleks i et forhold på ca. 1:1. Utbytte av rent faktor VIII/vWF-kompleks ligger mellom ca. 70% og 80% og således over de hittil beskrevne verdier for proteinutvinning ved hjelp av immuaffinitetskromatografi.

25 EKSEMPEL 5

Anvendelse av et antistoff-fragment for immuaffinitetsrensing av vWF

- 30 På samme måte som det intakte monoklonale antistoff, kan også et F'ab- eller f'ab2-fragment av det monoklonale antistoff anvendes. Fremgangsmåten har den fordel at eventuelt foreliggende spor av antistoffet i sluttproduktet

ikke lenger inneholder noen immunologisk virksom proteinandel (Fc-andel).

Fragmenteringen av antistoffet kan skje ved hjelp av

5 selektive proteaser såsom papain eller pepsin (i fri form eller bundet til en uløselig bærersubstans). I det følgende er det beskrevet fremstillingen, rensingen og anvendelsen av et F'ab-fragment fra det monoklonale antistoff AvW8-2:

- 10 100 mg av det monoklonale antistoff AvW8-2 ble blandet med 1 mM cystein. Til denne løsning ble det tilsatt 0,5 mg immobilisert papain (firma Pierce), og suspensjonen ble inkubert i 5 timer ved 37°C. Proteasespaltningen ble stoppet ved avfiltrering av det immobiliserte papain og
- 15 eventuell restaktivitet ble inhibert ved tilsetning av 10 mM jodacetamid. Separasjonen av F'ab-fragmentene fra Fc-fragmenter, mindre fragmenter og intakte antistoffer, ble foretatt ved hjelp av anionbytterkromatografi på "Poros Q". Rensete F'ab-fragmenter ble med en overtrekkstetthet på
- 20 1 mg/ml gel koblet til CNBr-aktivert Sepharose. 500 ml av en konsentrert fermentasjonsrest inneholdende r-vWF, ble renset med 50 ml av det således fremstilte affinitetsresin ifølge eksempel 3.
- 25 Tabell 5 viser resultatene av immunaffinitetskromatografien ved hjelp av eluering med en buffer inneholdende 100 mM glysin, pH 7,4.

Tabell 5

30

Prøve	vWf Ag (ELISA)		Ristocetinaktivitet		Protein		spes.aktivitet	
	µg/ml	%	U/ml	%	µg/ml	%	<u>mg AG</u> mg prot	<u>U RCoA</u> mg prot
Utgang	105	100	1,8	100	1250	100	0,08	1,44
Absorbat	9	9	<0,02	<8	1200	105	0,00	<0,02
Eluat	248	85	3,8	76	265	4	0,93	14,3

Det fremgår av resultatene i tabell 5 at det kan anvendes et F'ab-fragment av det monoklonale antistoff med samme effektivitet som det intakte antistoff for immunaffinitetskromatografisk rensing av vWF. Imidlertid kunne vWF her
5 gjenvinnes med et forbedret utbytte på 85% av utgangsmaterialet og en spesifikk aktivitet på minst 93 antigen-U/mg protein.

EKSEMPEL 6:

10

Efterrensing ved hjelp av heparin-affinitetskromatografi

Det er mulig å øke kvaliteten av den således rensede vWF, enten ved anrikning av vWF-multimerer bestående av
15 høymolekylære vWF-multimerer, eller ved fjerning av restkontaminasjoner, i et ytterligere rensingstrinn. Som metode for dette kommer de kjente fremgangsmåter såsom ionebytterkromatografi, heparin-affinitetskromatografi eller gelfiltrering på tale.

20

I det følgende skal det beskrives kombinasjonen av immunaffinitetskromatografi med påfølgende heparinkromatografi.

Eluatet av immunaffinitetskromatografien (eksempel 5) føres
25 uten videre behandling på en 50 ml-søyle fylt med "Fractogel"-heparin. Elueringen av den bundede rvWF skjer ved installasjon av en trinnformet saltgradient, idet rvWF elueres fortrinnsvis i et område mellom 0,25 M og 0,3 M NaCl.

30

Samtlige kromatografibuffere inneholder 100 mM glysin, for å sikre dissosiasjonen av eventuelt utblødde F'ab-fragmenter fra vWF under heparinkromatografien. Resultatene fra heparin-affinitetskromatografien er vist på tabell 6.

35

Tabell 6

Prøve	vWf Ag (ELISA)		Ristocetinaktivitet		Protein		spes. aktivitet	
	µg/ml	%	U/ml	%	µg/ml	%	$\frac{\text{mg AG}}{\text{mg prot}}$	$\frac{\text{U RCoA}}{\text{mg prot}}$
Utgang	250	100	3,8	100	265	100	0,94	14,3
Absorbat	95	46	<0,02	<4	105	48	0,9	<0,19
Trinn 1	85	15	0,8	9	89	14	0,96	9,0
Trinn 2	115	19	7,8	85	125	20	0,92	62,4

- 5 Som vist i tabell 6, kan ristocetin-aktiviteten av vWF forbedres ytterligere ved hjelp av de følgende rensings-trinn. Spesielt ble det funnet at det oppnås en spesifikk plateagglutineringsaktivitet på over 60 U/mg protein. Dessuten kan det gjenvinnes over 85% av det anvendte
- 10 materiale som renses protein med høy spesifikk aktivitet.

Sluttproduktet av rensingen kan etter sterilfiltrering og farmasøytisk formulering fylles direkte på en tilsvarende sluttbeholder og lyofiliseres. I dette tilfelle fungerer

15 glysinet som foreligger i bufferen, som stabiliseringsmiddel under lyofiliserings- og løsningsprosessen.

EKSEMPEL 7:

20 **Påvirkningen av elueringsmiddelet på FVIII:C-aktiviteten**

Oppløst kryobulin ble adsorbert på en med AvW8-2-belagt søyle, slik som beskrevet i eksempel 4. Koblingen av antistoffet skjer i dette tilfelle via benzokinon for å

25 forbedre pH-stabiliteten. Elueringen av det bundede FVIII/vWF-kompleks skjer på den ene side ved pH-økning slik som beskrevet av Mejan et al. (1988, Thromb. Haemost. 59: 364-371), på den andre side ved glysin-eluering etter fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Tabell 7 viser resultatene av bestemmelsen av utbyttet og den spesifikke faktor VIII-aktivitet ved hjelp av immunafinitetskromatografi med forskjellige elueringsmetoder.

5

Tabell 7

Elueringsmetode	spes.aktivitet U FVIII:C mg protein	Utbytte FVIII:C %
pH-endring	37	21
Glysin	67	82

Tabell 7 viser at utbyttet økes til det firedobbelte ved anvendelse av glysin-buffer som elueringsmiddel i forhold til pH-endringen, og den spesifikke aktivitet av den oppnådde faktor VIII økes med det dobbelte. Grunnen til dette synes å være eksposisjonen hhv. aktivering av FVIII ved en pH-endring, mens aktiviteten av faktor VIII påvirkes mindre ved milde elueringsbetingelser ved nøytral pH i nærvær av en aminosyre hhv. zwitterionet.

EKSEMPEL 8:

Rensing av et kompleks bestående av rekombinant FVIII og rekombinant vWF

Cellekulturrester av rekombinante celler transfisert med en vektor inneholdende cDNA som koder for faktor VIII hhv. vWF, ble blandet i et forhold 3 faktor VIII: 1 vWF. Blandingen som inneholder rFVIII/rvWF-kompleks ble renset under betingelser som angitt i eksempel 3.

Tabell 8 viser resultatene av denne rensing av rfaktor VIII/rvWF.

Tabell 8

Prøve	I FVII:C/ml	Utbytte FVIII:C	µg/ VWF/ml	Utbytte vWF	<u>U FVIII:C</u> U vWF
Oppdrag	2,1	100	6,1	100	3,4
Gjennom- strømning	0,4	19	neg.	0	n.d.
Glysin- eluat	8,3	73	25,7	67	3,2

Tabell 8 viser at et kompleks som består av rFVIII og rvWF under de angitte betingelser forholder seg lik et plasmatisk kompleks. Likeledes ble det, avhengig av blandingsforholdet av utangsmaterialet, gjenvunnet rFVIII/rvWF-kompleks i et bestemt innbyrdes forhold. Ved variasjon av FVIII/vWF-forholdet i utgang eller ved tilslutning av et ytterligere kromatografisk trinn, kan forholdet mellom FVIII:C og vWF varieres til fordel for det relative FVIII-innhold. Således er det mulig målrettet å oppnå et faktor VIII/vWF-kompleks med et bestemt ønsket forhold.

EKSEMPEL 9:

15

Test på mus-IgG (F'ab-fragmenter)

Kontaminerende F'ab-fragmenter i eluatet fra immunaффinitetssøylen påvises ved hjelp av en immunologisk fremgangsmåte (Immuno Ligand Assay, Molecular Devices).

20

Kanin-anti-mus IgG (F'ab-spesifikk) merkes med biotin eller fluorescein. 100 µl av et søyleeluat blandes med 2 µg av det biotin- og fluoresceinmerkede antistoff og inkuberes. Etter en ytterligere inkubasjon med 2 µg streptavidin og ureasemerket anti-fluorescein-antistoffer filteres blandingen gjennom en biotinyleret membran. Etter vasking av membranen kan bundet F'ab-fragment med høy følsomhet (ca. 100 pg/ml) påvises.

30

Tabell 9 viser resultatene av forskjellige kromatografiløp.

Tabell 9

Prøve	Elueringsmetode	vWF-antigen µg/ml	mus IgG ng/ml	<u>ng mus iGg</u> mg vWF antigen
Kryopresipitat	pH-endring*	280	34,5	123,2
rekom. vWF	pH-endring*	190	28,6	150,5
Kryopresipitat	Glysin	320	4,2	13,1
rekom. vWF	Glysin	248	1,9	7,6

- 5 * Koblingen av antistoffet skjer i dette tilfelle via benzokinon for å oppnå en bedre pH-stabilitet.

Tabell 9 viser at det med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er mulig å oppnå vWF hhv. faktor VIII/vWF-kompleks med meget små mengder kontaminerende mus-IgG (F'ab-fragmenter).

Ved tilføyning av et ytterligere kromatografisk rensings-trinn (heparinkromatografi eller ionebytterchromatografi) er det mulig å redusere denne restkontaminasjon til under påvisningsgrensen.

EKSEMPEL 10:

20 Integritet av det rensede FVIII/vWF-kompleks

For å demonstrere integriteten av det rensede kompleks bestående av FVIII og vWF, ble 5 ml eluat fra immunaффinitetssøylen ifølge eksempel 4 fylt på en gelfiltreringsøyle som er fylt med 120 ml Sepharose CL6B. Ved eluering med glysinbuffer som løpemiddel, skjer det under kromatografiforløpet en separasjon etter molekylstørrelsen.

På grunn av separasjonskarakteristikken til søylematerialet ville det ved nærvær av to forskjellige molekylspesies (FVIII og vWF) skje en separasjon av de to proteiner. I fig. 1 er resultatene av dette kromatografiforløp vist.

Det fremgår tydelig at komplekset av FVIII og vWF ifølge eksempel 4 vises i en topp (—). Hvis de to proteiner ikke var assosiert, ville de tydelig eluere adskilt (sml. markering).

5

FVIII/vWF-komplekset renses etter fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen foreligger således som proteinkompleks hvor vWF overtar stabiliseringsoppgaven.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Fremgangsmåte ved utvinning av høyren vWF hhv. faktor
VIII/vWF-kompleks ved hjelp av immunaffinitetskromatografi,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten om-
fatter
- å binde vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks til en im-
10 munabsorbent og
- eluere nevnte bundne vWF eller faktor VIII/vWF-kom-
pleks med et elueringsmiddel som inneholder et zwitterion
som vesentlig aktiv bestanddel, hvor nevnte vWF eller fak-
tor VIII/vWF-kompleks opprettholder sin molekulære integri-
15 tet,
- idet nevnte zwitterion er valgt fra gruppen av
aminosyrer eller aminosyreanaloger som har et isoelektrisk
område mellom 3,2 og 9,6
- og hvor antistoff/antigenkomplekset blir dissosiert
20 uten anvendelse av et kaotropisk middel.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at zwitterionet er valgt
fra gruppen av nøytrale aminosyrer, spesielt glysin, ala-
25 nin, β -alanin, fenylalanin og histidin eller betainer.
3. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at zwitterionet fore-
ligger i løsningen i en konsentrasjon mellom 0,01 og 0,5 M,
30 fortrinnsvis mellom 0,08 og 0,2 M, spesielt foretrukket
mellom 0,1 og 0,15 M.
4. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at elueringsmidlet har
35 en fysiologisk pH verdi, fortrinnsvis mellom pH 7,0 og pH
8,0, spesielt foretrukket mellom pH 7,3 og pH 7,8, særlig
foretrukket pH 7,4.
5. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 4,

k a r a k t e r i s e r t v e d at immunadsorbensen er et anti-vWF-antistoff, fortrinnsvis et monoklonalt anti-stoff.

5 6. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 4, k a r a k t e r i s e r t v e d immunadsorbensen er et fragment av et anti-vWF-antistoff.

10 7. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den rensede vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks dannes i en vandig løsning som innerholder et zwitterion i en konsentrasjon mellom 0,08 M og 0,2 M og en pH på mellom 7,3 og 7,8, idet zwitterionet er valgt fra gruppen av aminosyrene glysin, alanin, β -alanin, fenylalanin og histidin, eller betainer.

20 8. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at rensed vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks underkastes et ytterligere kromatografisk trinn, fortrinnsvis en heparinaffinitetskromatografi.

25 9. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 7 eller 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at rensed vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks lyofiliseres uten tilsetning av høymolekylære stabilisatorer.

30 10. Fremgangsmåte som angitt i et av kravene 1 til 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at rensed vWF eller faktor VIII/vWF-kompleks underkastes et virusinaktiverings- og/eller virusfjerningstrinn.

FIG. 1

Gelfiltreringsanalyse av FVIII/vWF-kompleks

