NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **311662** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 L 2/18

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19980275	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.11.03, PCT/EP95/04309
(22) Inng. dag	1998.01.21	(85) Videreføringsdag	1998.01.21
(24) Løpedag	1995.11.03	(30) Prioritet	1995.08.01, DE, 19528221
(41) Alm. tilgj.	1998.01.21		
(45) Meddelt dato	2002.01.02		

(71) Patenthaver Blutspendedienst der DRK-Landesverbände Nordrhein- und Westfalen-Lippe GmbH, Feithstrasse 180-186, D-58097 Hagen, DE

(72) Oppfinner Annick Faucompre, Marcq-en-Baroeul, FR
Günter Wöber, Hagen, DE

(74) Fullmektig Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et virussikkert, terapeutisk, biologisk preparat fra humanplasma ved anvendelse av ikke-ioniske tensider**

(56) Anførte publikasjoner EP A 99445, WO 9413329

(57) Sammendrag Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for fremstilling av et viralt sikkert terapeutisk biologisk preprat fra humant plasma ved anvendelse av en detergent og opprettholdelse av minst 50% av den biologiske aktivitet, hvor detergenten blir fjernet ved slutten av fremgangsmåten. Ikke-ioniske overflateaktive midler, hvis molekylstruktur omfatter en hydrofob del, omfattende en lineær alifatisk kjede mellom 8 og 10 karbonatomer, blir benyttet som detergenter. Detergentbehandlingen kan bli fulgt av en varmebehandling, eventuelt ved anvendelse av konvensjonelle stabilisatorer.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et virus-sikkert biologisk preparat fra humant blodplasma under anvendelse av en detergent, og under opprettholdelse av minst 50% av den biologiske aktiviteten og under anvendelse av en detergentbehandling, hvor detergenten blir fjernet på slutten.

Under biologiske preparater fra humant blod, blir det forstått produkter av menneske-blod eller plasma, som er bestemt for terapeutisk, profylaktisk eller diagnostisk behandling. Slike produkter kan være enzymer, proenzymer, inklusivt blodlevringsfaktorer, enzyminhibitorer, immunglobuliner, albumin, plasminogen, fibrinogen, fibronectin eller plasma. Med utgangspunkt fra infiserte givere, kan denne typen produkter inneholde vira som må bli fjernet eller inaktivert før administrasjon til tredje person.

Det er en omfangsrik patentrettslig og vitenskapelig litteratur tilstede, hvor inaktiveringsfremgangsmåter blir beskrevet, slik at kun noen spesifikke eksempler blir trukket frem. EP 0 050 061 (oppfinner: Shanbrom) beskriver en fremgangsmåte for reduksjon eller fjerning av virus-infeksiøsitet i biologiske produkter, som omfatter trinnet ved tilsetting av en amfifil. Disse produkter blir behandlet ved en langtidskontakt på minst 30 minutter med en oppløsning eller suspensjon av 0,25 til 10 vekt-% av en ikke-denaturerende amfifil. Til sist blir amfifilen fjernet med stoffet som bevirker pyrogenisiteten. Denne behandlingen retter seg mot inaktiveringen av hepatitt B-vira og non-A, non-B hepatitt-vira, som er omhyllet av membran.

En overfor EP 0.050.061 forbedret fremgangsmåte, er beskrevet i EP 0.131.740 (oppfinner: Neurath, Horowitz). Fremgangsmåten tjener til å gjøre en sammensetning inneholdende et labilt protein i det vesentlige fri for vira omhyllet av lipider, uten at det skjer en vesentlig proteindenaturering. Fremgangsmåten består i at sammensetningen blir bragt i kontakt med en virksom mengde av et di- eller trialkylfosfat sammen med et tensid som oppløsningsformidler i en tid som er tilstrekkelig til å gjøre sammensetningen fri for lipidholdige vira, uten å føre til vesentlig proteindenaturering. Vanligvis blir det arbeidet ved en temperatur fra 0 til 70°C. Det er nødvendig å stabilisere de labile proteinene ved oppvarmingen av oppløsningen.

Behandlingen av detergenter har generelt den ulempe at den kun trekker ut de membranomhyllede vira. Når et detergent foreligger i en konsentrasjon over den micelledannende konsentrasjon (CMC), blir de lipidholdige membraner oppløst og viruset inaktivert. Dessuten kan vira som ikke har noen lipidholdig membran, som for eksempel hepatitt A-virus, frigis ved en detergentbehandling fra vesikler og dermed bli inaktivert.

For den fulle virksomhet av den ovenfor nevnte fremgangsmåten, er det dessuten nødvendig med tilsetting av et virucidkjemikalie, f.eks. tri-n-butylfosfat (TNBP) (B. Horowitz et al., Transfusion 25, 516 - 522, 1985).

Likeledes er det kjent fra litteraturen at Vaccinia-virus, et medlem av poxvirusgruppen, er overraskende resistent selv overfor solvent-detergent-fremgangsmåten ifølge Neurath/Horowitz, selv om det er et membranomhyllet virus (H. Hart et al., Poster bei Scotblood '92, University of Sterling, juni 1992 "Model Virus Studies of Solvent/Detergent Treatment used in the Production of High-Potency Factor VIII"). Forfatteren antar at behandlingen er for mild for omhyllingen til Vaccinia-viruset.

Det er således et mål å fremskaffe en fremgangsmåte som i hovedsak benytter kjent teknologi ved en detergentbehandling som kan følge eller gå foran en varmebehandling, hvor imidlertid membranomhyllete, som også ikke-membranomhyllete, vira blir inaktivert og dessuten hvor det blir anvendt detergenter som kan bli fjernet igjen relativt enkelt etter behandlingen.

Således er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling av et virussikkert, terapeutisk, biologisk preparat fra humanplasma under anvendelse av en detergent, under opprettholdelse av minst 50% av den biologiske aktiviteten, hvor detergentene ble fjernet på slutten, som er kjennetegnet ved at det blir arbeidet under utelukkelse av virucide kjemikalier som tri-n-butylfosfat,
at det som detergent blir benyttet ikke-ioniske tensider, og at detergentene blir valgt fra den følgende gruppe:

- trietylenglykol-mono-oktyleter,

- N-(D-gluko-2,3,4,5,6-pentahydroksyheksyl)-N-metyloktanamid,
- 1-tio-n-oktyl-ß-D-glukopyranosid,

hvor virkningstiden til detergenten er 5 til 25 minutter, fortrinnsvis 10 til 20 min., og temperaturen under detergentbehandlingen er 20°C til 30°C, fortrinnsvis 25°C.

Denne typen produkter er kommersielt til gjengelig. Noen handelsnavn er:
MEGA-8
N-(D-gluko-2,3,4,5,6-pentahydroksyheksyl)-N-metyloktanamid.

Foretrukne trekk ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremgår fra medfølgende krav 2 – 5 og som nærmere vist nedenfor i beskrivelsen.

Som delvis vist over, er vanlige fremgangsmåteparametere som følger;
Konsentrasjon av detergenten mellom 5 g/l til 20 g/l;
Innvirkningstid for detergenten: 5 til 25 minutter, fortrinnsvis 10 til 20 minutter, behandlingstemperatur mellom 20 og 30°C, fortrinnsvis 25°C.

Behandlingstiden skal, som det sees, holdes betydelig lavere enn 30 minutter. Behandlings- og innvirkningstiden kan bli avsluttet brått ved at konsentrasjonen til detergenten blir fortynnet ved tilsetting av så mye vann at CMC (kritisk micellekonsentrasjon) blir underskredet, og derved innvirkningen avbrutt.

Detergentmengden som blir igjen i oppløsningen, kan bli fjernet ved dialyse eller diafiltrering.

Detergent-trinnet kan bli kombinert med et pasteuriserings-(oppvarmings)trinn. Det er tilgjengelig en omfangsrik litteratur, som er befattet med inaktivering av infeksiøse substanser ved oppvarming av blodprodukter. De forskjellige fremgangsmåtene omfatter:

- Oppvarming av blodprodukter i vandig oppløsning i nærvær av stabilisatorer;
- Oppvarming av blodprodukter i tørr tilstand;

- Oppvarming av blodprodukter i fast, fuktig tilstand.

Slike fremgangsmåter er kjente, og er i seg selv ikke patenterbare. Ifølge fagmannens kunnskap må det imidlertid passes på at inaktiveringsfremgangsmåten ved oppvarming blir utvalgt på en slik måte at den fjerner den potensielle restinfektiviteten til preparatet og samtidig stort sett opprettholder dens biologiske aktivitet.

Ved oppvarming av blodprodukter blir såvel membranomhyllede som også ikke-membranomhyllede vira angrepet og inaktivert.

Selv om detergentbehandlingen muliggjør en vidtgående virksomhet, spesielt også inaktiver poxvira, kan ømfintlige plasmaproteiner stort sett bli spart. Heller ikke tilsettingen av et toksisk kjemikalie (TNBP) er nødvendig. Spesielt blir en mulig kronisk toksistet for TNBP unngått.

Inaktiveringskjemikaliene må også bli fjernet. Imidlertid er fjerningstrinnene ikke så tidsforbrukende som de ifølge teknikkens stand. Eksempelvis må det ikke bli foretatt noen fjerning ved hjelp av C18-harpiks (EP 366.946 B1, oppfinner: Bonomo).

Fordelaktig blir det ved varmebehandlingen arbeidet slik at en oppløsning av i og for seg kjente stabilisatorer, som α-aminosyrer, sakkarose og sorbitt, blir tilsatt. Varmebehandlingen skjer ved 50 til 65°C, vanligvis over flere timer. Deretter blir oppløsningen fortynnet ved reduksjon av viskositeten og stabilisatorer blir fjernet ved dialyse eller lignende.

Oppfinnelsen vil bli diskutert ved hjelp av flere eksempler.

Eksempel 1:

Frossen plasma, utvunnet eksempelvis fra fullblodgiver etter skylling av cellene eller ved plasmaforese, blir uttatt ved 20°C, pH-verdien blir, hvis nødvendig, innstilt til 7,30 og blandingen tilsatt en stabilisatoroppløsning (2 ml pr. 100 ml plasma). Stabilisatoroppløsningen inneholder pr. 100 ml plasma vann: 3,7 g $Cacl_2$, 2 H_2O, 15,0 g arginin,

15,0 g lysin, 18,0 g Na_3citrat, 5,5 H_2O, pH 7,30. Deretter blir 3 g glycin og 600 g sakkarose pr. l plasma tilsatt. Oppløsningen blir veid og blandet med lik vekt sorbitt. Varmebehandlingen blir gjennomført i 10 timer ved 62 ± 0,5°C. Etter fortynning med dialysebuffer for reduksjon av viskositeten, blir stabilisatorene fjernet ved dialyse, eksempelvis ved hjelp av hullfiberpatroner eller "cross-flow"-filtrering på membraner. Dialysebufferen inneholder pr. liter vann: 0,74 g $CaCl_2$, 2 H_2O, 3,0 g arginin, 5,0 lysin, 3,6 g Na_3citrat, 5,5 H_2O, 3,0 g glycin, 5,84 g NaCl. Den biologiske aktiviteten til de følgende plasmaproteinene var minst 50% av verdien før varmebehandling: Fibrinogen faktor II, faktor CV, faktor VII, faktor VIII, faktor IX, faktor X, faktor XI, faktor XII, faktor XIII, AT III, plasminogen, protein C, protein S, α_2-plasmin-inhibitor. Nærværet av aktiverte levringsfaktorer blir utelukket ved hjelp av to ømfintlige tester (ikke-aktivert partielle tromboplastin-tid og trombin-danningstid [C.W. Powse et al., Thrombosis Haemostasis (Stuttgart) 42, 1355 - 1367 (1979)].

I et adskilt forsøk blir det tilsatt 50 ml oppløsning etter tilsetning av alle stabilisatorer ved tilsetning av 1 ml hepatitt A-virus-suspensjon tilsatt og en prøve tatt for måling av virustiteren. Deretter blir temperaturen i oppløsningen over et tidsrom på 2 timer, jevnt forhøyet med 62°C og så holdt ved denne temperaturen i 10 timer. Denne fremgangsmåten simulerer forløpet av produksjonen. Etter dialysen ble en ytterligere prøve tatt for måling av virustiter. Titeren i utgangsprøven var $10^{4,9}$, i den andre prøven var intet virus påvisbart.

Eksempel 2:

Analogt med fremgangsmåten i eksempel 1, blir etter tilsetning av alle stabilisatorene ved romtemperatur 1 ml Sindbis-virus-suspensjon tilsatt, og en prøve underkastet måling for virustiteren. Etter varmebehandling og dialyse, som beskrevet i eksempel 1, blir en ytterligere prøve underkastet måling av virustiteren. Titeren i utgangsprøven var $10^{5,6}$, i den andre prøven var det intet påvisbart virus.

Eksempel 3:

Plasma etter varmebehandling og dialyse, som beskrevet i eksempel 1, blir tilsatt med 1-O-n-oktyl-ß-glukopyranosid (10 g/l plasma) og omrørt langsomt i 20 min. ved 25°C.

Deretter ble det fortynnet med dialysebuffer (se eksempel 1) i volumforholdet 1:3 og detergenten fjernet ved dialyse hhv. diafiltrering. Den biologiske aktiviteten til de nevnte plasmaproteiner var minst 50% av verdien til ikke-behandlet plasma.

I et adskilt forsøk blir det til 50 ml plasma tilsatt 1 ml myxoma-virus-suspensjon og en prøve ble tatt for måling av virustiteren. Etter tilsetting av 0,5 g detergent blir det inkubert i 15 min. ved 25°C og fortynnet i volumforholdet 1:10 med dialysebuffer. Deretter blir detergenten fjernet ved dialyse, hhv. diafiltrering og en plasmaprøve tatt for måling av virustiteren. Virusprøven viste en virustiter på $10^{6,2}$, den andre prøven viste en titer på $10^{0,9}$.

Eksempel 4:

Til 1 liter ubehandlet plasma ble det tilsatt salter og aminosyrer i mengder som for dialysebufferen i eksempel 1, så ble det tilsatt 15 g trietylglykol-mono-oktyleter/l oppløsning og inkubert i 10 min. ved 25°C. Etter fortynninger med dialysebuffer i volumforholdet 1:5, blir detergenten fjernet ved dialyse hhv. diafiltrering. Deretter blir stabilisatorene tilsatt for varmebehandling som beskrevet i eksempel 1, og en varmebehandling gjennomført på den der angitte måten. Deretter blir stabilisatorene fjernet etter fortynning ved dialyse hhv. diafiltrering. Den biologiske aktiviteten til nevnte plasmaproteiner var minst 50% av verdien av utgangsplasmaet.

Eksempel 5:

Til 50 ml plasma blir salter og aminosyrer i mengden som for dialysebufferen i eksempel 1, og så 1 ml pseudorabies-virus-suspensjon tilsatt. En prøve blir tatt for måling av virustiteren. Deretter blir det tilsatt 0,5 g 1-tio-n-oktyl-ß-glukopyranosid og inkubert i 15 min. ved romtemperatur. Etter fortynning i volumforholdet 1:10 blir detergenten fjernet ved dialyse hhv. diafiltrering. En prøve blir tatt for måling av virustiteren. Titeren i den første prøven var $10^{5,8}$, i den andre prøven var det ikke påvisbart virus.

Eksempel 6:

Analogt med fremgangsmåten i eksempel 5 blir det til 50 ml plasma med salter og aminosyrer tilsatt 1 ml BVDV (bovint viralt diarévirus). En prøve blir tatt for å måle

virustiteren. Deretter blir 0,4 g N-(D-gluko-2,3,4,5,6-pantahydroksyheksyl)-N-metyl-oktanamid tilsatt og inkubert i 10 min. ved 25°C. Etter fortynning i volumforholdet 1:10, blir detergenten fjernet ved dialyse hhv. diafiltrering. En prøve blir tatt for måling av virustiteren. Titeren i den første prøven var $10^{5,1}$, i den andre prøven var det intet påvisbart virus.

Dobbelt virusinaktivert plasma er per se et verdifullt terapeutikum med svært høy sikkerhet overfor overføring av virus fra blod. Dessuten kan etter i og for seg kjente fremgangsmåter plasmaderivater bli isolert med lik sikkerhet. Disse fremgangsmåtene er spesielt fordelaktige, da den kostbare logistikken ved romadskillelse av mellomtrinn ved plasmafraksjoneringen før og etter et virusinaktiveringstiltak bortfaller. De følgende eksempler forklarer fremgangsmåten.

Eksempel 7:

Detergentbehandlet eller todobbelt virusinaktivert plasma blir frosset, og for utskillelse av et kryopresipitat tint ved +4°C og sentrifugert ved denne temperaturen. For utvinning av fibrinklisterets komponent 1 blir kryopresipitatet vasket med iskald buffer (Deutsches Arzneibuch 10, 3. Nachtrag 1994). Detergent- eller den sekvensielle detergens-/varmebehandlingen kan også bli gjennomført på det rensede preparatet.

Eksempel 8:

F VIII av Willebrand-konsentratet blir eksempelvis renset ved immunaffinitetskromatografi (EP 122.209) eller ionebyttekromatografi (DE 11.84.782) av en oppløsning av kryopresipitatet, fremstilt ifølge eksempel 7. Detergens- eller sekvensiell varme-/detergentbehandling kan også bli gjennomført på det rensede preparatet. Detergenten kan også bli fjernet under kromatografien.

Eksempel 9:

Faktorene i protrombinkomplekset, faktor II, faktor VII, faktor IX og faktor X, kan bli utvunnet fra kryopresipitatfattig plasma ved ionebyttekromatografi [J. Heystek et al., Vox Sanguinis 25, 113-123 (1975)]. Detergent- eller sekvensiell varme-/detergentbe-

handlingen kan også bli gjennomført på det rensede preparatet. Detergenten kan også bli fjernet i løpet av kromatografien.

Eksempel 10:

For reduksjon av trombose-risikoen blir terapien av Hämophilie B fortrinnsvis gjennomført med renset F IX. Eksempelvis kan man gjennomføre en slik rensing av protrombinkomplekset, utvunnet som beskrevet i eksempel 9, ved hjelp av affinitetskromatografi [C. Michalski et al., Vox Sanguinis 55, 202 - 210 (1988), P.A. Feldmann et al., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 939 - 948 (1994)] Detergent- eller sekvensiell detergent-/varmebehandlingen kan også bli gjennomført på det rensede preparatet. Detergenten kan også bli fjernet i løpet av kromatografien.

Eksempel 11:

Fra plasmaet etter utskilling av kryopresipitatet og protrombinkomplekset kan antitrombin III bli renset ved affinitetskromatografi [R. Rosenberg og P.S. Damus, Journal of Biological Chemistry 248, 6490-6505 (1973)]. Detergent- eller sekvensiell varme-/detergentbehandlingen kan også bli gjennomført ved å rense produktet. Detergenten kan også bli fjernet i løpet av kromatografien.

Eksempel 12:

Etter utskilling av kryopresipitatet og eventuelt ytterligere plasmaproteiner, kan det fra plasma bli isolert renset immunoglobulin G ved en variasjon eller modifikasjon av kald-alkohol-utfellingen [E.J. Cohn et al., Journal of the American Chemical Society 68, 459-475 (1946), P. Kistler og H. Nitschmann, Vox Sanguinis 7, 414 - 424 (1962)]. Detergent- eller varme-/detergentbehandlingen kan også bli gjennomført med renset preparat. Detergenten kan også bli fjernet ved utfelling av immunglobulin.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av et virussikkert, terapeutisk, biologisk preparat fra humanplasma under anvendelse av en detergent, under opprettholdelse av minst 50% av den biologiske aktiviteten, hvor detergentene ble fjernet på slutten,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det blir arbeidet under utelukkelse av virucide kjemikalier, som tri-n-butylfosfat,

at det som detergent blir benyttet ikke-ioniske tensider, og at detergentene blir valgt fra den følgende gruppe:

- trietylenglykol-mono-oktyleter,
- N-(D-gluko-2,3,4,5,6-pentahydroksyheksyl)-N-metyloktanamid,
- 1-tio-n-oktyl-ß-D-glukopyranosid,

hvor virkningstiden til detergenten er 5 til 25 minutter, fortrinnsvis 10 til 20 min., og temperaturen under detergentbehandlingen er 20°C til 30°C, fortrinnsvis 25°C.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av detergenten på slutten av virkningstiden blir så mye fortynnet at CMC (kritisk micellekonsentrasjon) ble underskredet og at innvirkningen derved blir avbrutt.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen til detergenten ligger mellom 5 g/l plasma og 20 g/l plasma.

4.

Fremgangsmåte ifølge minst ett av de foregående krav, k a r a k t e r i - s e r t v e d at detergenten blir fjernet etter behandling med dialyse eller diafiltrering.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det før eller etter detergentbehandlingen blir gjennomført en varmebehandling, eventuelt under anvendelse av vanlige stabilisatorer.