

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163833 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0921/88

(51) Int.Cl.5

C 07 K 15/06

(22) Indleveringsdag: 23 feb 1988

(24) Løbedag: 24 jun 1987

(41) Alm. tilgængelig: 23 feb 1988

(44) Fremlagt: 06 apr 1992

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK87/00080

(86) International indleveringsdag: 24 jun 1987

(85) Videreførelsesdag: 23 feb 1988

(30) Prioritet: 24 jun 1986 DK 2957/86

(71) Ansøger: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Ole *Nordfang; DK, Mirella Ezban *Rasmussen; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et koagulationsaktivt kompleks af Faktor VIII fragmenter

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 1749/84

921-88

(57) Sammendrag

921-88

Et koagulationsaktivt kompleks af faktor VIII fragmenter fremstilles ved, at en koagulationsinaktiv FVIII tung kæde bringes til at reagere med en koagulationsinaktiv FVIII let kæde i nærvær af et kompleksdannende middel. Således omdannes FVIII-HC og FVIII-LC til koagulationsaktivt FVIII-kompleks i nærvær af divalente metalioner, såsom Mn^{2+} , Ca^{2+} eller Co^{2+} eller en komponent af prothrombin-komplekset eller et stof med reaktivitet over for forbindelser indeholdende gruppen -SH og/eller -S-S.

1 2 3 kD

— — — 205

— — — 116

— — — 95

— — — 66

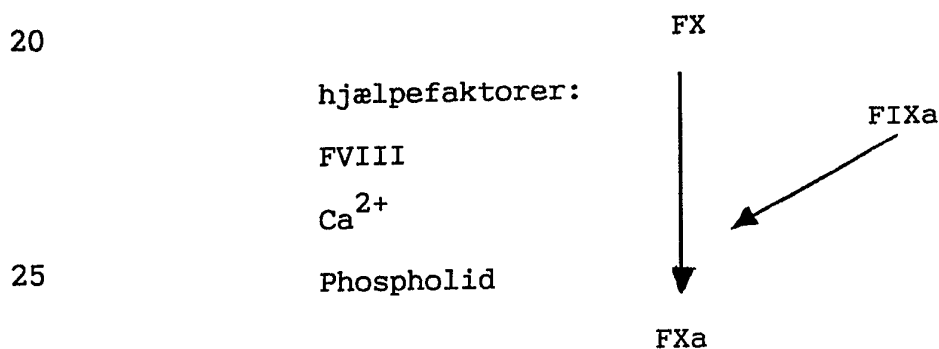
— — — 45

DK163833 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et koagulationsaktivt kompleks af et N-terminalt fragment af faktor VIII med en molvægt på 92-210 kD og et C-terminalt fragment af faktor VIII med en molvægt på 80-70 kD, idet enkelte af de naturligt forekommende aminosyrer i det ene eller begge fragmenter om ønsket kan være udeladt eller udskiftet med andre aminosyrer.

Faktor VIII er et i blod naturligt forekommende protein. Det deltager som hjælpefaktor under omdannelsen af FX til aktiveret FX (FXa). Tilstedeværelse af FVIII øger hastigheden af FXa-dannelsen ca. 200.000 gange (Dieijen et al., J. Biol. Chem. 156, p. 3433, 1981). Mangel på FVIII (Hæmofili A) giver sig udtrykt i ukontrollerede blødninger.

FVIII's rolle i koagulationskaskaden fremgår af følgende skema:



FVIII kan aktiveres af thrombin eller FXa og inaktiveres af thrombin, FXa eller protein C.

Hæmofili A patienter kan behandles med FVIII præparater, enten profylaktisk eller akut ved blødninger.

FVIII kan udvindes af blodplasma, hvori ca. 1 ppm af proteinet er FVIII. Ved denne metode kan der kun opnås begrænsede mængder af FVIII, og det er derfor ønskeligt at fremstille FVIII biosyntetisk i cellekultur. Dette er
5 lykkedes for 3 forskergrupper (Wood et al, Nature 312, p. 330, 1984 - Toole et al, Nature 312, p. 342, 1984 - Truet et al, DNA 4, p. 333, 1985).

I cellekultur kan der produceres 2 mg fremmed protein/ml, hvilket for FVIII ville svare til 20.000 enh/ml. Dette
10 niveau overstiger langt, hvad der i litteraturen er beskrevet for FVIII. En af årsagerne hertil er, at FVIII er et meget stort protein med en molekylvægt på ca. 330 kD (Vehar et al, Nature 312, p. 337, 1984).

15 FVIII oprenset fra blodplasma eller fra cellekultur omfatter et fragment, kaldet faktor VIII let kæde eller FVIII-LC med en molekylvægt på ca. 80 kD, og et fragment, kaldet faktor VIII tung kæde, eller FVIII-HC med molekyl-
20 vægt fra 92 til 210 kD. Fragmenterne opstår ud fra 330 kD proteinet ved proteolytisk nedbrydning, således at 80 kD-FVIII-LC er det C-terminale fragment, mens FVIII-HC er det N-terminale fragment, hvis størrelse afhænger af nedbrydningsgraden.

25 Det er således kendt, at der i koagulationsaktivt FVIII indgår et 80 kD fragment og et fragment med molekylvægt på 92 kD eller mere (Fulcher og Zimmerman, Symposium on FVIII, Scripps Clinic, 1982).

30 DK patentansøgning nr. 1749/84 angår en fremgangsmåde til fremstilling af et faktor VIII:C-koaguleringsmiddel, der angives at bestå af fragmenter af faktor VIII med forskellige molekylvægte i området 71.000 til 92.000. Selv
35 om disse fragmenter benævnes "FVIII:C-koaguleringsmiddel", har det dog vist sig, at de enkelte fragmenter er inaktive.

Senere undersøgelser, som ligger til grund for den foreliggende opfindelse, har imidlertid vist, at det kun er komplekset HC-LC, forbundet med en Ca^{2+} -bro, der er aktivt. Så snart denne bro er brudt, er der ikke længere
5 nogen aktivitet til stede.

Opfindelsen har til formål at genskabe broer mellem HC og LC for dermed at opnå et koagulationsaktivt kompleks.

10 Det ville være en fordel at fremstille FVIII ud fra mindre fragmenter, hvis disse fragmenter in vitro kunne sammensættes til koagulationsaktivt FVIII. På grund af fragmenternes mindre størrelse i forhold til intakt FVIII, ville de lettere kunne fremstilles biosyntetisk i store
15 mængder. Desuden ville fremstillingen af fragmenter af FVIII være fordelagtig af hensyn til en efterfølgende oprensning fra cellekultur, idet produktet skifter ladning og molekylvægt ved kompleksdannelsen. Da man således både kan rense fragmenterne og komplekset, er der mulighed for
20 at opnå et renere slutprodukt.

Det har ved forsøg vist sig, at man ikke ved simpel sammenblanding af fragmenterne er i stand til at opnå koagulationsaktive produkter. Der er heller ikke i litteraturen beskrevet metoder eller betingelser, hvorved fragmen-
25 ter af FVIII kan omdannes til et koagulationsaktivt kompleks.

Den foreliggende opfindelse er baseret på den opdagelse,
30 at der opstår et koagulationsaktivt kompleks, når en koagulationsinaktiv FVIII-tung kæde (FVIII-HC, N-terminalt fragment) bringes til at reagere med en koagulationsinaktiv FVIII-let kæde (FVIII-LC, C-terminal fragment) i nærvær af et kompleksfremmende middel. Dette er ganske over-
35 raskende, idet der i litteraturen er omtalt oprensning af FVIII-LC og FVIII-HC, jvf. DK patentansøgning nr. 5387/85, uden at der er rapporteret forsøg på aktivitets-

skabende sammenblanding. Dette på trods af at aktivitetsdannelsen ved sammenblanding kunne have stor teoretisk og praktisk betydning.

- 5 Burke et al (Abstract 14 p. 111. Research in Clinic and Laboratory 16, 1986) har været i stand til at fremstille koagulationsaktivt FVIII in vivo med celler, der var transfekteret med DNA for både FVIII-LC og FVIII-HC. Det har imidlertid ikke været muligt at få koagulationsaktivitet ved at sammenblende kultursupernatanter med indhold af henholdsvis FVIII-LC og FVIII-HC, selv om forskellige betingelser er blevet forsøgt.

- 15 FVIII-LC kan oprenses fra humant plasma og er uden koagulationsaktivitet (se WO 86/02838). Ligeledes kan FVIII-HC fragmenter oprenses fra blodplasma (Truett et al., DNA 4, p. 333, 1985). Disse fragmenter er ligeledes uden koagulationsaktivitet.

- 20 Som kompleksfremmende middel anvendes ifølge opfindelsen fortrinsvis en eller flere divalente metalioner. Eksempler på egnede midler af denne art er Mn^{2+} , Ca^{2+} og Co^{2+} . Andre egnede kompleksfremmende midler er FIXa og FX samt stoffer med reaktivitet over for R-SH og/eller R-S-S-R forbindelser. Om ønsket kan der anvendes en blanding af disse midler.

DEFINITIONER

- 30 Ved FVIII-LC eller FVIII let kæde forstås fragment fra det C-terminale domæne af fuld længde FVIII. Molekylvægten af fragmentet er typisk ca. 80 kD, men kan være 70 kD eller mindre. Fragmentet med molekylvægten 80 kD har immunologisk reaktivitet i det beskrevne assay for FVIII-LC antigen, men ikke i assay for FVIII-HC antigen.

Ved FVIII-HC eller FVIII tung kæde forstås fragment fra det N-terminal domæne af fuld længde FVIII. Molekylvægten af fragmentet er typisk 92 kD, men kan være mindre og op til 210 kD. FVIII-HC oprenset fra plasma består af en
5 blanding med molekylvægt 92 til 210 kD. Fragmenter med molekylvægt større end eller lig med 92 kD har immunologisk reaktivitet i det beskrevne assay for FVIII-HC antigen, men ikke i assay for FVIII-LC antigen.

10 Ved koagulationsaktivt FVIII forstås et protein, der er i stand til at forkorte koagulationstiden af hæmofili A plasma i koagulationsassay. Koagulationsaktivt FVIII er desuden i stand til i Coatest assay (jvf. nedenfor) at fremme dannelsen af FXa og dermed omdanne det kromogene
15 substrat. Koagulationsaktivitet angives som FVIII:C.

Ved prothrombin-kompleks forstås koagulationsfaktorer indeholdende γ -carboxyglutaminsyre, dvs. FII, FVII, FIX, FX protein C eller aktiverede former af disse koagulations-
20 faktorer (Davie et al. Advances in enzymology 48 p. 277, 1979).

METODER

25 Coatest-assay for FVIII:C

Ved denne analyse måles FVIII:C i et system bestående af FIXa, FX, Ca^{2+} og phospholipid (PL) (Rosen et al, Thromb Haemostas 54 p. 818, 1985). Der dannes FXa i en mængde,
30 der afhænger af FVIII:C-mængden. Assayet udføres som angivet nedenfor:

Coatest-assay for FVIII:C

35 1. 50 μl prøve tilsættes 50 μl aktiveringsreagens (blanding af FIXa/FX og PL). Inkubationstid 10 min, 22 °C.

2. Der tilsættes 25 μ l 25 mM CaCl_2 og blandingen inkuberes i 20 min ved 22 °C.
3. Der tilsættes 50 μ l chromogent substrat for FXa
5 (S2222).
4. Efter inkubation i 15 min tilsættes citronsyre, og E_{405} af prøven aflæses.
- 10 I Coatest analysen er det ikke muligt at følge en enzymatisk aktivering af FVIII, idet FVIII under analysen aktiveres fuldt ud ved inkubation med FIXa/FX, PL og Ca^{2+} .

Immunologisk kvantisering af FVIII-LC

- 15 FVIII-LC antigen (Ag) måles i specifikt immunoassay (Nordfang et al, Thromb Haemostas 53, p. 346, 1985). Human inhibitor antistof coates til mikropalader, prøve tilsættes, og bundet FVIII-LC detekteres med peroxidasemærket F(ab')_2 fragment af human inhibitor IgG.
20 Som standard anvendes normal human plasma.

Immunologisk kvantisering af FVIII-HC

- 25 FVIII-HC antigen (Ag) måles i specifikt inhibitions assay. Hunde inhibitor antistof coates til mikropalader med løse brønde. Prøve og ^{125}I -mærket FVIII-HC tilsættes. Mængden af FVIII-HC i prøve bestemmer mængden af bundet ^{125}I -FVIII-HC. Som standard anvendes FVIII konzentrat
30 (FVIII Nordisk), der er sat til at indeholde 1 FVIII-HC enhed pr. FVIII:C enhed.

- Mængden af FVIII-LC og FVIII-HC bestemt ved immunassay er relativt angivet. Dvs. at forholdet mellem FVIII:C enh,
35 FVIII-LCag enh. og FVIII-HCag enh. for forskellige typer FVIII ikke er 1:1:1. Det antages imidlertid, at enheder for de forskellige assay er sammenlignelige, men der kan

dog være en vis forskel på VIII:C enh, FVIII-LCag enh. og FVIII-HCag enh. for en FVIII prøve, hvor alt protein er koagulationsaktivt i Coatest.

5 Bestemmelse af molekylvægt

Molekylvægt er bestemt ved reduceret SDS-PAGE (Laemmli, Nature 227 p. 680, 1970).

10 Fremstilling af FVIII

FVIII prøve til kontrolforsøg blev fremstillet fra FVIII koncentrat (se W084/03628) ved affinitetschromatografi på Sepharose med anti von Willebrand faktor fra ged (Truett et al, DNA 4 p. 333, 1985).

Fremstilling af FVIII-LC (prøve A)

FVIII-LC kan oprenses fra blodplasma ved flere metoder såsom beskrevet i WO 86/02838. Her er anvendt højkoncetreret FVIII-LC, isoleret ved affinitetschromatografi på monoklonal 47 IgG af Nordiocto, fremstillet som angivet af O. Nordfang et al: Thrombosis and Haemostasis, Vol. 54, p:586-590, 1985. Nordiocto, opløst i 200 ml buffer A (0,02 M imidazol, 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) til en koncentration af VIII-LCag på 110 enh/ml, blev inkuberet over natten med 7 ml 47 IgG-sepharose (koblet med 9 mg IgG/ml). Inkubationsblandingen blev hældt på søjle og gennemløbet opsamlet. Gelen blev vasket med 40 ml buffer A og 40 ml buffer A med ialt 0,65 M NaCl. FVIII-LC blev elueret med 40 ml 20 mM imidazol/0,65 M NaCl/10 mM EDTA/50% ethylenglycol/pH 7,4. En topfraktion på 4 ml blev dialyseret til 50 mM imidazol/0,15 M NaCl/10% glycerol/0,02% NaN_3 /pH 7,4. Den dialyserede prøves indhold af FVIII-komponenter fremgår af tabel 1.

Fremstilling af FVIII-HC (prøve B)

FVIII-HC er fremstillet fra FVIII prøve ved affinitetschromatografi på monoklonal 56 IgG-Sepharose, fremstillet som angivet af O. Nordfang et al : Thrombosis and Haemostasis, Vol. 54, p.: 586-590, 1985, 56 IgG-Sepharose binder FVIII-LC/FVIII-HC komplekset via FVIII-LC. 25 ml FVIII prøve med et indhold på 405 FVIII-HCag enh/ml blev inkuberet over natten med 1,5 ml 56 IgG-Sepharose (koblet med 4 mg 56 IgG/ml). Inkubationsblandingen blev hældt på søjle og gennemløbet opsamlet. Gelen blev vasket med 5 ml buffer B (20 mM imidazol/0,15 M NaCl/10% glycerol/0,1 M lysin/pH 7,4) indeholdende 0,35 M NaCl₂. Dernæst blev gelen vasket med 15 ml buffer B med et totalindhold af NaCl på 0,65 M efterfulgt af 5 ml buffer B med 10 mM EDTA og 0,02% NaN₃ (EDTA-buffer). Gelen blev drænet og inkuberet 1 time ved stuetemperatur med EDTA buffer. Efter inkubation blev FVIII-HC elueret med 5 ml EDTA buffer. En topfraktion på 2 ml blev dialyseret til 50 mM imidazol/0,15 M NaCl/10% glycerol/0,02% NaN₃/pH 7,4. Den dialyserede prøves indhold af FVIII-komponenter fremgår af tabel 1.

TABEL 1

FVIII-fragmenter i dialyseret FVIII-LC prøve og FVIII-HC prøve.

	FVIII:C enh/ml	FVIII-LCag enh/ml	FVIII-HCag enh/ml
FVIII-LC (prøve A)	<0,01	770	1,8
FVIII-HC (prøve B)	<0,01	0,1	2000

Prøve A og B er analyseret ved SDS-PAGE, jvf. tegningen, hvor

Spor 1 svarer til prøve A (FVIII-LC) 4 FVIII-LCag enh,
Spor 2 er molekylvægtsmarkører, og
Spor 3 svarer til prøve B (FVIII-HC) 8 FVIII-HCag enh.

- 5 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres i det efterfølgende ved hjælp af nogle udførelseseksempler.

EKSEMPEL 1

- 10 Prøve A og B blev hver især fortyndet 10 gange i buffer C (50 mM imidazol, 0,15 M NaCl, 0,1% BSA, pH 7,4). 20 μ l A (fortyndet 1:10) blev blandet med 20 μ l B 1/10, 3 μ l 0,15 M MnCl_2 og 40 μ l buffer C. Efter 48 timers inkubation ved 22 °C indeholdt inkubationsblandingen 1200 m enh
15 VIII:C/ml, målt ved Coatest.

Til sammenligning er udført følgende forsøg

Forsøg A:

- 20 Forsøget blev gentaget som beskrevet i eksemplet med den ændring, at der blev 3 μ l buffer C i stedet for 3 μ l 0,15 M MnCl_2 . Efter 48 timers inkubation ved 22 °C indeholdt denne inkubationsblanding mindre end 5 m enh VIII:C/ml
25 målt ved Coatest.

Forsøg B:

- 30 Prøve A blev fortyndet 40 gange i buffer C. 80 μ l A (fortyndet 1:40) blev blandet med 3 μ l 0,15 M MnCl_2 . Efter 48 timers inkubation indeholdt inkubationsblandingen mindre end 5 enh VIII:C/ml. Tilsvarende indeholdt inkubationsblanding med prøve B mindre end 5 m enh VIII:C/ml.

Forsøg C:

80 µl FVIII prøve fortyndet 1000 gange i buffer C blev blandet med 3 µl 0,15 M MnCl_2 . Efter 48 timers inkubation blev der målt 170 m enh VIII:C/ml. 80 µl FVIII prøve fortyndet 1000 gange i buffer C, blev blandet med 3 µl buffer C. Efter 48 timers inkubation blev der målt 140 m enh FVIII:C/ml.

10 EKSEMPEL 2

Prøve A og B blev hver især fortyndet 10 gange i buffer C. 20 µl A 1/10 blev blandet med 20 µl B (fortyndet 1:10), 3 µl 2,2 M CaCl_2 og 40 µl buffer C. Efter 12 døgns inkubation ved 22 °C indeholdt inkubationsblandingen 1300 m enh VIII:C/ml.

Til sammenligning er udført følgende forsøg:

20 Forsøget blev gentaget som beskrevet ovenfor, men med den ændring, at der blev tilsat 3 µl buffer C i stedet for 3 µl 2,2 M CaCl_2 . Efter 12 døgns inkubation ved 22 °C indeholdt inkubationsblandingen mindre end 5 m enh VIII:C/ml.

25 EKSEMPEL 3

Prøve A og B blev hver især fortyndet 100 gange i buffer C. 100 µl A og 100 µl B blev blandet. 50 µl af blandingen blev testet i Coatest som angivet ovenfor. Der blev målt 1,5 m enh/ml i blandingen. 50 µl af blandingen blev desuden testet i modificeret Coatest med 1 times præinkubation med FIXa/FX før tilsætning af PL. Dermed steg Coatest aktiviteten til 3,0 m enh/ml.

Til sammenligning er udført følgende forsøg:

5 FVIII prøve blev fortyndet 30.000 gange i buffer C. 50 μ l fortyndet prøve blev testet i Coatest som angivet ovenfor. Der blev målt 3,4 m enh/ml. 50 μ l af den fortyndede VIII:C prøve blev desuden testet i modificeret Coatest med 1 times præinkubation med FIXa/FX før tilsætning af PL. Dermed blev der målt 3,8 m enh/ml for den fortyndede FVIII prøve.

10

EKSEMPEL 4

15 Ved udførelse af forsøg som angivet i eksempel 1, måltes efter 24 timers inkubation 1000 m enh VIII:C/ml. Ved tilsætning af 40 μ l FIXa/FX i stedet for 40 μ l buffer C, blev der målt 1600 m enh/ml efter 24 timers inkubation.

Til sammenligning er udført følgende forsøg:

20 Forsøget blev udført som beskrevet i eksempel 1, første sammenligningsforsøg. Efter 24 timers inkubation blev der målt mindre end 5 m enh/ml i inkubationsblandingen.

Endnu et sammenligningsforsøg blev udført således:

25

40 μ l FVIII prøve fortyndet 500 gange i buffer C blev blandet med 40 μ l FIXa/FX og 3 μ l 0,15 M Mn^{2+} . Efter 24 timers inkubation blev der målt 120 m enh/ml. Ved at erstatte 40 μ l FIXa/FX med 40 μ l buffer C blev der målt 170 m enh/ml. Ved derudover at erstatte de 3 μ l 0,15 M Mn^{2+} med 3 μ l buffer C, blev der målt 140 m enh/ml

30

EKSEMPEL 5

35 Prøve A og B blev hver for sig fortyndet 20 gange i buffer C. 20 μ l A 1/20 blev blandet med 20 μ l B 1/20, 40 μ l FIXa/FX og 3 μ l 0,15 M $CaCl_2$. Efter 4 timers inkuba-

tion ved 22 °C indeholdt blandingen 199 m enh FVIII:C/ml. Hvis FIXa/FX i blandingen blev erstattet med 40 µl buffer C, blev der målt 43 m enh FVIII:C/ml efter 4 timers inkubation.

5

EKSEMPEL 6

Prøver af FVIII-LC og FVIII-HC indeholdende henholdsvis 800 enh FVIII-LC:Ag/ml og 850 enh FVIII-HC:Ag/ml blev hver fortyndet 3 gange. 20 µl FVIII-LC 1/3 blev blandet med 20 µl FVIII-HC 1/3 og 10 µl Me^{2+} . I blanding A var Me^{2+} 25 mM Mn^{2+} . I blanding B var Me^{2+} 250 mM Ca^{2+} , og i blanding C var Me^{2+} 25 mM Mn^{2+} og 250 mM Ca^{2+} . Efter 24 timers inkubation indeholdt blandingen A 10,3 enh FVIII:C/ml, blanding B indeholdt 4,0 enh, og blanding C indeholdt 12,9 enh FVIII:C/ml. Efter 144 timers inkubation indeholdt blandingerne A, B og C henholdsvis 6,6 enh, 6,5 enh og 11,9 enh FVIII:C/ml.

20

EKSEMPEL 7

COS-Celler blev transficeret med plasmid pSVF8-80, der udtrykker 80 kD kæde, jvf. DK-ans. 0428/87. Supernatant fra kulturen indeholdende 870 m enh FVIII-LC:Ag/ml blev tilført plasma-renset FVIII-HC til en slutkoncentration på 20 FVIII-HC:Ag enh/ml og Mn^{2+} til en slutkoncentration på 5 mM. Efter 24 timers inkubation ved 22 °C indeholdt blandingen 137 mU FVIII:C/ml. Når plasma-renset FVIII-LC ved en koncentration på 1000 m enh FVIII-LC:Ag/ml på tilsvarende måde blev tilført FVIII-HC og Mn^{2+} , indeholdt den inkuberede blanding 33 m enh FVIII:C/ml efter 24 timers inkubation. Når der til kultursupernatanten kun sættes Mn^{2+} og ikke FVIII-HC, indeholdt blandingen efter inkubation i 24 timer mindre end 2,5 m enh FVIII:C/ml.

35

EKSEMPEL 8

24 μ l FVIII-LC blev i buffer C blandet med 25 μ l FVIII-Hc, 7 μ l MnCl_2 og 10 μ l redoxmiddel, således at der blev opnået slutkoncentrationer af de enkelte komponenter, som angivet i tabel 2. FVIII:C blev målt efter 5 timers inkubation ved 20 °C.

TABEL 2

Rekombination af FVIII-LC og FVIII-HC i tilstedeværelse af redoxmiddel.

FVIII-LC:Ag enh/ml	FVIII:HC:AG enh/ml	mM MnCl_2	Redox- middel	% FVIII:C i forh. til FVIII-LC:Ag efter 5 t.
11	11	5	intet	4,9
11	11	5	15 μ M DTT	16,8
11	11	5	150 μ M ME	18,8
11	11	5	30 μ M Cys	17,4
11	112	5	15 μ M Cys	68,8
11	11	0	intet	<0,5

Ved de angivne koncentrationer af DDT (dithiotreitol), ME (mercaptoethanol) og Cys (Cystein) findes i vandig buffer en ligevægt mellem oxiderende og reducerende form.

EKSEMPEL 9

FVIII-HC blev fremstillet som beskrevet ovenfor og med den modifikation, at EDTA elueringsbuffer samt dialysebuffer blev tilsat 50 μ m mercaptoethanol. Efter fortynding blev rekombination med FVIII-HC prøver udført ved 20

timers inkubation i buffer C ved stuetemperatur med til-sætning af mercaptoethanol til 35 μ M, MnCl_2 til 5 mM og FVIII-LC til 22 FVIII-LC:Ag enh/ml.

- 5 Tabel 3 viser rekombination med de to typer FVIII-HC prø-ver.

TABEL 3

10	FVIII-HC	FVIII-HC:Ag enh/ml i re- kombinations- blanding	% FVIII:C i forh. til FVIII-HC:Ag efter 20 t.
15	Prøve 1, fremstillet som ovenfor beskrevet	2,59	31
20	Prøve 2, fremstillet som ovenfor beskrvet	3,31	27
25	Prøve 3, fremstillet med ME som angivet i dette eksempel	3,00	89

EKSEMPEL 10

- 30 Inkubationsblanding med følgende sammensætning blev frem-stillet i buffer C ud fra separerede FVIII fragmenter: 60 enh/ml. FVIII-LC, 60 enh/ml FVIII-HC, 50 mM CaCl_2 , 2 enh/ml FX.

- 35 Efter 20 timers inkubation ved stuetemperatur blev der målt 6,9 FVIII:C enh/ml. I tilsvarende inkubationsblan-ding uden FX blev der efter 20 timers inkubation ved 20 °C målt 0,59 FVIII:C enh/ml.

P a t e n t k r a v :

- 5 1. Fremgangsmåde til fremstilling af et koagulationsaktivt kompleks af et N-terminalt fragment af faktor VIII med en molvægt på 92-210 kD og et C-terminalt fragment af faktor VIII med en molvægt på 80-70 kD, idet enkelte af de naturligt forekommende aminosyrer i det ene eller begge fragmenter om ønsket kan være udeladt eller udskiftet med andre aminosyrer, k e n d e t e g n e t ved, at de to fragmenter bringes til at reagere indbyrdes i nærvær af et kompleksfremmende middel.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det N-terminale fragment er en tung kæde med en molvægt på ca. 92 kD, og at det C-terminale fragment er en let kæde med en molvægt på ca. 80 kD.
- 15 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en eller flere cys-aminosyrer i mindst et af fragmenterne er udskiftet med serin.
- 20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at fragmentet med molekylvægten 92-210 kD eller fragmentet med molekylvægten 80-70 kD eller begge fragmenter er behandlet med et stof med reaktivitet over for forbindelser indeholdende gruppen -SH og/eller -S-S.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at et eller begge fragmenter er biosyntetisk fremstillet.
- 30 6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er en eller flere divalente metalioner.
- 35

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er Mn^{2+} , Ca^{2+} eller Co^{2+} .
- 5 8. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n - d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er en blanding af en divalent metalion og en komponent af prothrombin-komplekset, fortrinsvis FX.
- 10 9. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n - d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er en blanding af en divalent metalion og en eller flere af komponenterne FIX, FIXa, FX eller FXa.
- 15 10. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n - d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er von Willebrand Faktor.
- 20 11. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n - d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er et stof med reaktivitet over for forbindelser indeholdende gruppen -SH og/eller -S-S.
- 25 12. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n - d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er en blanding af en divalent metalion og et stof med reaktivitet over for forbindelser indeholdende gruppen -SH og/eller -S-S.
- 30 13. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at det kompleksfremmende middel er et proteinkondenseringsreagens, såsom glutaraldehyd, hydrazin, bisepooxiraner, epichlorhydrin, divinylsulfon, benzoquinon, carbonyldiimidazol eller carbodiimid.

