



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 320952

(13) B1

(51) Int Cl.

C07K 1/34 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19965523	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.06.22 PCT/SE95/00777
(22)	Inng.dag	1996.12.20	(85)	Videreføringsdag	1996.12.20
(24)	Løpedag	1995.06.22	(30)	Prioritet	1994.06.23, SE, 9402254 1995.02.24, SE, 9500724
(41)	Alm.tilgj	1996.12.20			
(45)	Meddelt	2006.02.20			
(73)	Innehaver	Octapharma AG, Seidenstrasse 2, 8853 LACHEN CZ, CH			
(72)	Oppfinner	Stefan Winge, Stockholm, SE			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for virusfiltrering av en løsning inneholdende minst ett makromolekyl
(56)	Anførte publikasjoner	
		J. Melling et al., Journal of Applied Chemical Biotechnology 1973, vol. 23, s. 166
		M.Burnouf-Radosevich et al., Vox Sang, 1994, vol. 67, s. 132-138
		S. Farrah, 1982, Applied and Environmental Microbiology, vol. 43 (3), s. 659-663
		T. Burnouf et al., Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, 1994, vol. 6, Edited by T. Kobayashi et al., Kluwer Academic Publishers, s. 17-27
		The plasma proteins, structure, function and genetic control, Second edition, vol. II, US 5 076 933
(57)	Sammendrag	

En fremgangsmåte for virus-filtrering av en løsning som inneholder minst ett makromolekyl i kraft av at det totale saltinnhold i løsningen ligger i området fra ca. 0,2 M og opp til metning av løsningen med det aktuelle salt. Fremgangsmåten reduserer oppholdstiden og i hvilken grad løsningen behøver fortynnes, og optimaliserer utbyttet ved virusfiltrering av primært proteiner, polysakkarider og polypeptider. Reduksjonen av virusinnhold er minst like god som med konvensjonelle teknikker hvor det totale saltinnhold er lavt. Fremgangsmåten letter virusfiltrering ved hjelp av den såkalte "dead-end"-teknikk, som gir atskillige prosess- og økonomiske fordeler sammenlignet med den vanlig anvendte tangentielle virusfiltreringsteknikk. Ved virusfiltrering av plasmaprotein faktor IX blir det erholdte utbytte i virusfiltreringstrinnet økt fra ca. 70% til høyere enn 95%, ved å øke saltinnholdet i løsningen.

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for virusfiltrering av en løsning som inneholder minst ett makromolekyl, i kraft av det totale saltinnhold av løsningen som ligger i området fra ca. 0,6 M og opp til metning av løsningen med det aktuelle salt. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse reduserer oppholdstiden og i hvilken grad løsningen behøver å fortynnes, og optimaliserer utbyttet ved virusfiltrering av primært proteiner, polysakkarider og polypeptider. Reduksjonen av virusinnhold er minst like god som med konvensjonelle teknikker hvor det totale saltinnhold er lavt. Foreliggende oppfinnelse letter virusfiltrering ved hjelp av den såkalte "dead-end"-teknikk, som gir flere prosess- og økonomiske fordeler sammenlignet med den vanlig anvendte tangential-virusfiltreringsteknikk. Ved virusfiltrering av plasmaproteinfaktor IX øker utbyttet erholdt i virusfiltreringstrinnet fra ca. 70 % til over 95 %, ved å øke saltinnholdet av løsningen i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnelsens bakgrunn

Problemet med viruskontaminering av forskjellige proteinpreparater ment for medisinerings av mennesker er blitt gjenstand for økt oppmerksomhet i de senere år. Leilighetsvis rapporter er f.eks. fremlagt som angår f.eks. blodproteiner som er blitt kontaminert med hepatittvirus A, hepatittvirus B, hepatittvirus C og/eller human immunsviktvirus (HIV). I tråd med disse rapporter har myndighetene i flere land skjerpet kravene med hensyn til rensing av proteinpreparater for deres mulige viruskontaminanter.

Ved de foreliggende konvensjonelle teknikker blir virus inaktivert ved hjelp av kjemiske additiver, primært løsningsmidler og detergenter, og/eller ved utsettelse av virusene for forhøyede temperaturer. Den førstnevnte metode har ulempen ved at den kun virker på virus med lipidkapper, f.eks. hepatittvirus B og HIV. Den sistnevnte teknikk har den ulempe at mange proteiner er termisk ustabile ved de tempera-

turer som fordres for effektivt å redusere det kontaminerende virus.

US-A-4 473 494 beskriver en metode for fremstilling av stromafritt, ikke-hemproteinfritt hemoglobin, ved anvendelse av sinkioner for å fremme utfelling av et sinkionebundet uløselig hemoglobinkompleks, etterfulgt av membranultrafiltrering av sink-hemoglobinkomplekset fra filtratfluid-mediet. I det eneste trinn hvor det anføres at virus fjernes fra hemoglobinet, er det totale saltinnhold lavere enn 0,05 M, dvs. at det totale innhold av salt er konvensjonelt.

EP-A-0307373 angår fjerning av virus og/eller andre kontaminanter fra biologiske materialer i flytende form ved anvendelse av ultrafiltreringsmembraner med en 100 000 Da utelukkelse. Et foretrukket biologisk materiale er humant veksthormon. I eksemplene i EP-A-0307373 ligger det totale innhold av salt i virusfiltreringstrinnet i området fra 0,01 opp til 0,10 M (NH_4CO_3), dvs. at det totale innhold av salt er konvensjonelt.

Det foreligger således et behov for en effektiv virusreducerende metode som kan anvendes på forskjellige typer makromolekyler, primært proteiner, og på forskjellige typer virus.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Ett mål for foreliggende oppfinnelse er å markert redusere oppholdstiden ved virusfiltrering av løsninger som inneholder makromolekyler.

Et annet mål for foreliggende oppfinnelse er å markert redusere væskevolumene ved virusfiltrering av løsninger som inneholder makromolekyler.

Et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse er å redusere det nødvendige filterareal for effektiv virusfiltrering av løsninger som inneholder makromolekyler.

Et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse er å redusere det nødvendige filterareal for effektiv virusfiltrering av løsningen som inneholder makromolekyler.

Et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse er å oppnå et makromolekylutbytte høyere enn ca. 90 % i virus-

filtreringstrinnet.

Et ytterligere mål for foreliggende oppfinnelse er å redusere polymeriseringen erholdt på virusfilteroverflaten, slik at gjennomstrømningshastigheten økes og prosesstiden
5 reduseres.

Disse og andre mål er oppnådd ved foreliggende oppfinnelse som angår en fremgangsmåte for virusfiltrering av en løsning inneholdende minst ett makromolekyl, hvori det totale saltinnhold av løsningen er i området fra ca. 0,6 M og opp til
10 metning av løsningen med det aktuelle salt.

Oppfinneren av foreliggende oppfinnelse har således funnet at virusfiltrering kan utføres mye mer effektivt enn tidligere kjent, ved å øke saltinnholdet i løsningen. Denne oppdagelse er overraskende fordi det hittil ved virusfiltrering
15 av proteiner er blitt antatt at kun proteinkonsentrasjonen, gjennomstrømningshastigheten og pH har hatt noen innflytelse på prosessen.

Det er antatt at den økte filtreringseffekt oppnådd ved høyere saltkonsentrasjoner er på grunn av at proteinene
20 trekker seg sammen og derved kan passere lettere gjennom filterporene. Det er også tenkelig at interaksjonen reduseres mellom selve makromolekylene og/eller mellom makromolekylene og materialet i filtermembranen. Det er også tenkelig at proteiner med et stort antall hydrofobe grupper blir påvirket
25 i en høyere grad ved en økt saltkonsentrasjon.

Jo nærmere molekylvekten, eller den relative molekylmasse, av makromolekylet ligger i forhold til filtermembranens porestørrelse, jo mer effektiv er foreliggende oppfinnelse. Effektiviteten av foreliggende oppfinnelse forhøyes også når
30 forskjellen mellom størrelsen og/eller molekylvekten av kontaminanten og produktet øker, dvs. med økende konsentrasjoner av høymolekylære kontaminanter i produktet.

Foreliggende oppfinnelse gjør det også lettere å separere spesifikke fraksjoner fra et ønsket produkt, f.eks.
35 muliggjør foreliggende oppfinnelse at uønskede proteiner kan separeres fra proteinet som utgjør produktet.

Anvendelse av et høyt saltinnhold ifølge foreliggende oppfinnelse muliggjør også anvendelse av den såkalte "dead-

end"-filtreringsteknikk. Denne foretrukne utførelsesform har mange fordeler i forhold til konvensjonelle, vanlig anvendte tangentielle filtreringsprosesser, spesielt med en pore-størrelse fra ca. 5 til 30 nm. Det nødvendige utstyr og driftsprosedyrer er f.eks. mye enklere og derved mindre kostbare. Anvendelse av "dead-end"-filtrering reduserer også tapet av makromolekyl, reduserer bearbeidelsestiden, øker permeabiliteten av makromolekylet gjennom filteret og muliggjør også oppnåelse av en generelt konstant konsentrasjon av makromolekylet gjennom filteret, så vel som et konstant membrantrykk. En annen fordel med "dead-end"-filtreringsteknikken er det faktum at utvidelse av virusfiltreringsprosesser fra laboratorieskala til industriell skala blir betydelig lettere.

Ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse ligger det totale saltinnhold i løsningen passende innen området fra 0,3 til 3,0 M, fortrinnsvis innen området 0,4-2,5 M, og mer foretrukket innen området fra 0,6 til 2,0 M. Det er spesielt foretrukket at det totale saltinnhold i løsningen ligger innen området fra 0,8 til 1,5 M.

Når nødvendig kan det totale saltinnhold i løsningen justeres ved å tilsette et akseptabelt salt. Det er f.eks. mulig å anvende løselige uorganiske salter, løselige organiske salter eller kombinasjoner av slike salter. Det antas at det oppnås viktige prosessfordeler når det anvendes salter som oppviser en høy utsaltningseffekt i overensstemmelse med den såkalte Hofmeister-serie. Det refereres her til S. Glasstone, Textbook of Physical Chemistry, van Nostrand Co., Toronto, 2. utgave, april 1946, s. 1254-1259. De viktigste eksempler på anioner med en slik høy utsaltningseffekt er sitrat, tartrat, sulfat, acetat og fosfat. Kationer som fordelaktig kan anvendes ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse er monovalente kationer, slik som natrium, kalium og ammonium, så vel som divalente kationer, slik som kalsium. Natriumklorid, kaliumklorid, natriumacetat og natriumsitrat eller kombinasjoner derav, er spesielt foretrukne salter i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse, i betraktning av fordelene som tilveiebringes av farmasøytisk akseptable additiver. Det er også mulig å tilsette ett eller flere salter i rekkefølge, når

filtreringsprosessen utføres i to eller flere trinn.

En proteinkonsentrasjon innen området fra ca. 5 til 10 mg/ml løsning er ofte anbefalt for virusfiltrering. Ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse ble det overraskende
5 funnet at løsninger med en høyere proteinkonsentrasjon, fra ca. 10 til 20 mg/ml, fordelaktig kunne bearbeides gjennom virusfiltret.

Løsningen bør ha en temperatur innen området fra 0 °C og opp til temperaturen ved hvilken det aktuelle protein
10 denatureres. Temperaturen i løsningen ligger passende i området fra 10 °C til 50 °C, fortrinnsvis fra 20 °C til 35 °C.

Ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse bør løsningen ha en pH i området fra ca. 3 til 9, fortrinnsvis fra 4 til 8. pH i proteinløsningen bør ikke ligge nært opp til det
15 isoelektriske punkt for det aktuelle protein. I tilfellet med f.eks. gammaglobulin, oppnås et bedre resultat med en pH på 5,5 enn med en pH på 6,8.

Ved foreliggende oppfinnelse refererer løsning til en løsning som inneholder minst 50 vekt% vann, eventuelt inkludert ett eller flere løsningsmidler, slik som metanol, etanol, aceton eller acetonitril.
20

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å optimalisere prosessprosedyrer ved virusfiltrering av løsninger som inneholder et stort antall forskjellige typer makromolekyler.
25 Eksempler på slike molekyler er proteiner, polysakkarider og polypeptider, eller kombinasjoner derav. Makromolekylernes opprinnelse er irrelevant for anvendelsen av foreliggende oppfinnelse. Makromolekylene kan således være avledet fra planteriket eller dyreriket, eller kan opprinnelig være produsert
30 ved hjelp av industrielle prosesser. Makromolekylene er imidlertid fortrinnsvis av human eller animalsk opprinnelse, eller fremstilt ved hjelp av genteknologi (rekombinanter).

Spesielt egnede proteiner ved foreliggende oppfinnelse er faktor VIII, faktor IX, antitrombin III, gammaglobulin, albumin, streptokinase, apolipoproteiner og veksthormoner.
35

Et spesielt foretrukket faktor IX-produkt er "Nanotiv" som leveres av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige.

Fordelen med dette produkt er at dets spesifikke aktivitet før filtrering er tilstrekkelig høy til å muliggjøre anvendelse av et filter med meget fin struktur. Dette muliggjør at virus-konsentrasjonen kan senkes til et ekstremt lavt nivå, samtidig
 5 som selve filtreringsprosessen er meget hurtig og gir et høyt utbytte.

Foretrukne typer av faktor VIII er delesjonsderivater av rekombinant produserte faktor VIII-produkter. Et spesielt foretrukket faktor VIII-produkt er r-VIII SQ, levert av
 10 Pharmacia AB, Stockholm, Sverige. En fordel med dette produkt er at det rekombinant produserte produktmolekyl mangler den inaktive intermediærdel av det naturlige faktor VIII-molekyl. Dette gir molekylet en gjennomsnittlig molekylvekt på ca. 170 000. Et molekyl av denne størrelse er spesielt egnet for
 15 filtrering med slike filtere som de som muliggjør oppnåelse av betydelig virusreduksjon.

Foretrukne apolipoproteiner inkluderer apolipoprotein AI (Apo AI), apolipoprotein AII (Apo AII), apolipoprotein AIV (Apo AIV), apolipoprotein E (Apo E) og varianter eller blandinger derav. Varianter inkluderer forløperformer, fragmenter
 20 og avkuttete, utvidede eller muterte former av Apo AI, Apo II, Apo IV og Apo E. Muterte former hvori minst én arginingruppe er blitt erstattet med en cysteiningruppe er spesielt foretrukne. En slik mutert form er Apo A-IMilano (Apo A-IM), som
 25 også produseres med rekombinant DNA-teknikk av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige.

Polysakkarider som er spesielt foretrukne i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er glykosaminglykaner og bakteriepolysakkarider. Eksempler på glykosaminglykaner er
 30 hepariner, heparinfragmenter, heparinderivater, heparansulfat og hyaluronsyre. En spesielt foretrukket gruppe av glykosaminglykaner består av lavmolekylære hepariner med en gjennomsnittlig molekylvekt opp til ca. 10 000, fortrinnsvis fra 2 000 til 8 000.

35 Ifølge foreliggende oppfinnelse er spesielt egnede polypeptider bioaktive polypeptider, slik som rekombinante humane veksthormoner produsert i pattedyrceller.

Foreliggende oppfinnelse kan således anvendes for å

optimalisere prosessen med virusfiltrering av løsninger som f.eks. inneholder proteiner, polysakkarider og polypeptider. Foreliggende oppfinnelse er imidlertid beskrevet i det etterfølgende med referanse til løsninger som inneholder proteiner, 5 nærmere bestemt proteiner som forekommer naturlig i den menneskelige organisme.

Virusene som kan være til stede i proteinløsninger vil vanligvis være mye større enn selve proteinene. Det er således trolig at virus kan fjernes fra proteiner i overensstemmelse med størrelse, f.eks. ved filtrering. 10

Viruser som kan fjernes effektivt ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha en størrelse mindre enn ca. 350 nm. Størrelsen av virusene som kan fjernes er passende mindre enn 200 nm, fortrinnsvis mindre enn 150 nm. Vanligvis er virusene 15 som kan fjernes større enn ca. 20 nm, dvs. den tilnærmede størrelse av parvoviruset.

Foreliggende oppfinnelse er primært ment for fjerning av viruser fra makromolekyler, hvor makromolekylene er produktet av interesse. Det er imidlertid innen rammen for 20 oppfinnelsen å anvende den foreliggende fremgangsmåte for atskillelse av viruser fra makromolekyler, hvor virusene er produktet av interesse. Et eksempel er rensing av parvovirus for anvendelse som et testmiddel, og poliovirus for anvendelse som en vaksine, hvori f.eks. proteiner og polysakkarider kan 25 fjernes ved hjelp av en foreliggende fremgangsmåte.

Virusfiltrering utføres vanligvis ved en tangentiell filtreringsprosess, eller ved en såkalt "dead-end"-filtreringsprosess. Ved tangentiell virusfiltrering pumpes proteinløsningen rundt ved en konstant strømningshastighet på retensjonssiden, mens en annen pumpe trekker proteinløsningen 30 gjennom filteret ved suging. Når det er oppnådd et gitt volum på retensjonssiden tilsettes en buffer til retensjonssiden. Denne prosedyre gjentas et antall ganger, som nødvendig, idet hovedmengden av det resterende protein passerer gjennom 35 filteret under bibeholdelse av viruset på retensjonssiden. En slik prosess betegnes som diafiltrering. Filteret kastes vanligvis etter hver gjennomkjøring for å unngå overføring av viruset.

I tilfellet med den såkalte "dead-end"-virusfiltrering kan det anvendes det samme virusfilter som ved den tangentielle virusfiltrering, selv om det perifere utstyr og driftsprosedyrer er mye enklere og mindre kostbare enn i tilfellet med tangentiell virusfiltrering. I prinsipp involverer således "dead-end"-filtrering at den makromolekylinneholdende løsning plasseres i en trykkbeholder før filtrering, og at løsningen presses gjennom virusfiltret med hjelp av en egnet trykkkilde, f.eks. nitrogen (gass).

Finhetsgraden av filtere gis generelt som pore-størrelse eller den tilnærmede molekylvekt (relativ molekylmasse) ved hvilken molekylet stoppes av filteret, den såkalte utelukkelsesgrense. Ved foreliggende oppfinnelse kan virusfiltrene ha en utelukkelsesgrense på ca. 1 000 000, passende 500 000. For å fjerne små viruser bør virusfiltrene ha en utelukkelsesgrense på 200 000, fortrinnsvis 100 000. For å nå en maksimal virusreduksjon bør virusfiltret ha en utelukkelsesgrense som er ubetydelig høyere enn makromolekylet som virusfiltreres.

Virusfiltre er kjent i teknikken og leveres blant annet av Millipore fra Massachusetts, USA og Asahi Chemical Industry Co., Ltd. fra Japan. Millipore leverer filtere med to forskjellige membrantyper, avhengig av størrelsen av det aktuelle protein. Millipore leverer blant annet f.eks.

"Viresolve"/70 for proteiner med en molekylvekt, eller en relativ molekylmasse, opp til ca. 70 000, og "Viresolve"/180 for proteiner med en molekylvekt opp til ca. 180 000. Dette sistnevnte filter kan f.eks. anvendes for monoklonale anti-stoffer. Asahi Chemical Industry leverer blant andre ting "Planova" 35- og "Planova" 15-filtre, det sistnevnte filter anvendes for å fjerne mindre viruser, slik som poliovirus.

Som nevnt ovenfor vil valget av filter blant annet avhenge av størrelsen av det aktuelle protein. Faktor IX, antitrombin III, humant serumalbumin (HSA) og Apo A-IM (dimeren) har alle en molekylvekt på grovt regnet 60 000-70 000, hvori "Viresolve"/70, f.eks. er et egnet alternativ. Gammaglobulin har en molekylvekt på ca. 180 000, hvori "Viresolve"/180, f.eks. er et egnet alternativ. Det sistnevnte

filter er også egnet for anvendelse med det rekombinant produserte faktor VIII-produkt, r-VIII SQ, som har en molekylvekt på ca. 170 000, som nevnt ovenfor.

Muligheten for å velge et filter med fin struktur går
5 også ut fra at proteinløsningen har en høy renhetsgrad før
filtrering. Anvendelse av et filter med fin struktur er i sin
tur en forutsetning for evnen til å produsere proteinløsninger
som har et meget lavt virusinnhold i sluttproduktet. For å
være i stand til å redusere viruskonsentrasjonen til et meget
10 lavt nivå fordres det således et filter med meget fin
struktur, f.eks. "Viresolve"/70. Viruskonsentrasjonen kan ikke
reduseres til et så lavt nivå ved anvendelse av
"Viresolve"/180.

Effektiviteten, eller virkningsfullheten, av filtrer-
15 ingstrinnet påvirkes av renheten av proteinløsningen applisert
på filteret. I denne henseende gir en høyere spesifikk aktivitet
før filtrering et høyere utbytte i filtreringstrinnet. I
tilfellet med foretrukne utførelsesformer anvendt ved f.eks.
filtrering av løsninger som inneholder faktor IX, er det
20 funnet at proteinutbyttet i filtreringstrinnet kan økes fra
ca. 70 % til høyere en 95 %. Ved utøvelse av foreliggende opp-
finnelse er det imidlertid mulig å oppnå proteinutbytter
høyere enn 90 %, selv når det arbeides med løsninger med lav
spesifikk aktivitet.

25 Ved foreliggende oppfinnelse er det mulig å redusere
innholdet av meget små ikke-kappeomsluttede virus, slik som
parvovirus, med minst 3 log, passende minst 4 log og for-
trinnsvis minst 5 log. Reduksjonen er meget god med den
tangentielle teknikk, men enda bedre med "dead-end"-teknikken
30 når den anvendes i overensstemmelse med foreliggende oppfinn-
else.

Ifølge foreliggende oppfinnelse utføres virusfiltrer-
ing fortrinnsvis ved slutten av en proteinfremstillings-
sekvens, fordi en høy spesifikk aktivitet før filtrering vil
35 føre til et høyere proteinutbytte i filtreringstrinnet. Fore-
liggende oppfinnelse anvendes fortrinnsvis som et siste rens-
ingstrinn, eventuelt etterfulgt av et trinn for justering av
f.eks. proteinkonsentrasjon, saltinnhold eller pH, i slutt-

produktet. Et etterfølgende diafiltreringstrinn ved anvendelse av en UF-membran, kan også anvendes for å fjerne salter som, selv om de er fordelaktige under virusfiltreringen ut fra et prosessaspekt eller et økonomisk aspekt, ikke bør inkluderes i
5 sluttproduktet. Proteinløsninger som er klare for administrering vil vanligvis inneholde en fysiologisk løsning, f.eks. 0,15 M natriumklorid ved pH 7, i kombinasjon med én eller flere stabilisatorer, slik som sakkarose eller aminosyrer. Virusfiltreringsprosessen kan også utføres i to eller flere
10 trinn, med eller uten mellomliggende prosesstrinn.

Foreliggende oppfinnelse reduserer effektivt innholdet av virus med lipidkapper og viruser uten lipidkapper. Eksempler på viruser uten en lipidkappe er hepatittvirus A, poliovirus og parvovirus, som er relativt små viruser.
15 Eksempler på viruser med en lipidkappe er hepatittvirus B, hepatittvirus C og human immunsviktvirus (HIV).

Eksperimentell del

Det ble utført eksperimenter hvori silingskoeffisienten for proteiner, eller proteinpermeabilitetsfaktor, først
20 ble bestemt ved forskjellige filtratgjennomstrømningshastigheter. Silingskoeffisienten, eller proteinpermeabilitetsfaktoren, er gitt som P/R , hvor P er konsentrasjonen av protein på permeatsiden (filtratsiden) målt ved absorpsjon ved
25 280 nm (A_{280}), og R er konsentrasjonen av protein på retensjonssiden (R) målt ved absorpsjon ved 280 nm (A_{280}). Filtratgjennomstrømningshastigheten som ga den høyeste silingskoeffisient i fravær av polymerisering på filteret, ble deretter valgt. Det ble også utført en utbytteoptimalisering med
30 noen makromolekyler.

Eksempel 1

Eksperimenter ble utført med faktor IX som makromolekyl, for å illustrere virkningen av to saltinnhold på
35 proteinsilingskarakteristika, diafiltreringsvolum og utbytte. En kommersiell løsning inneholdende faktor IX, "Nanotiv", ble levert av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige. Løsningen inneholdende faktor IX ble erholdt fra humant blodplasma, og før

filtrering var den blitt behandlet i en rekkefølge som involverte anioneutbytting, kjemisk virusinaktivering, affinitetskromatografi og kationutbytting. Løsningen ble ultrafiltrert mellom hvert trinn, unntatt mellom det kjemiske virusinaktiveringstrinn og affinitetskromatografitrinnet.

Eksperimentelle betingelser

Renhetsgrad for den inngående proteinløsning: høy

Buffer: 0,144 M NaCl+0,0055 M natriumsitrat.

10 Totalt saltinnhold: ca. 0,15 M.

Proteinkonsentrasjon: 0,5-1,0 A₂₈₀-enheter.

Proteinløsning pH: 7

Eksperimenttemperatur: romtemperatur (ca. 23 °C).

Virusseparasjonsfiltere: "Viresolve"/70

15 Filtreringsteknikk: tangentiell

Filterareale: 310 cm²

Retensjonsgjennomstrømningshastighet: 41 l/time

Pumpe: Watson-Marlow 504.

Transmembrantrykk: 0,2-0,3 bar.

20

Tabell 1

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	35,0
2	6,9	39,6
3	10,7	45,8
4	14,1	56,2
5	17,6	55,6
6	20,8	58,3
7	24,3	61,7

En optimal filtratgjennomstrømningshastighet på 20,8 ml/min ble erholdt ved bestemmelse av proteinsilingskoeffisienten.

5

Tabell 2

Utbytteoptimalisering. Filtratgjennomstrømningshastighet: 20,8 ml/min. Høy renhetsgrad for proteinløsningen. Buffer: 0,144 M NaCl+0,0055 M natriumsitrat. Totalt saltinnhold: ca. 0,15 M.

10

Eksperiment	Filtreringstid	P/R, %
1	3 min 10 s	55,1
2	6 min 25 s	52,1
3	10 min 40 s	44,5
4	13 min 20 s	34,0

15

Diafiltrering med en fortynning på ca. 1 volumenhet pr. volumenhet inngående proteinløsning (1 + 1) ga et utbytte på ca. 90 %.

Eksempel 2

20

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 1, med det unntak av i dette tilfelle bestod bufferen av 1,0 M NaCl + 0,01 M natriumsitrat, hvilket ga et totalt saltinnhold på ca. 1,0 M.

25

30

Tabell 3

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	55,2
2	6,9	55,7
3	10,7	61,4
4	14,1	68,4
5	17,6	74,2
6	20,8	77,0
7	24,3	80,5

5

Denne bestemmelse av proteinsilingskoeffisient ga en optimal filtratgjennomstrømningshastighet på 24,3 ml/minutt.

Tabell 4

10 Utbytteoptimalisering. Filtratgjennomstrømningshastighet 24,3 ml/minutt.

Eksperiment	Filtreringstid	P/R, %
1	2 min 30 s	72
2	-----	68
3	7 min 14 s	65
4	9 min 38 s	55

15

Diafiltrering med en fortykning på ca. 0,3 volumenhet pr. volumenhet inngående løsning (1 + 0,3) ga et utbytte på > 95 %.

Eksempel 3

Den virusfjernende virkning oppnådd med eksperimentene beskrevet i eksempler 1 og 2 ble bestemt ved hjelp av en virusundersøkelse. Undersøkelsen ble utført på parvovirus som er ikke-lipidinnkapslede virus, og som har en størrelse på 20-25 nm. I prinsipp faller eksperimenter med slike viruser innenfor kategorien "verste tilfelle", fordi de er noen av de minste viruser som er kjent.

Parvovirus ble tilsatt til løsninger inneholdende faktor IX, med et saltinnhold på hhv. 0,144 M NaCl+0,0055 M natriumsitrat (eksperiment 1) og 1,0 M NaCl+0,01 M natriumsitrat (eksperiment 2). Løsningen ble deretter virusfiltrert i overensstemmelse med eksempler 1 og 2. Løsningene ble analysert med hensyn til parvovirus både før og etter virusfiltrering.

Eksperiment	Virusreduksjon
1	$1 \times 10^{3,7}$
2	$1 \times 10^{4,0}$

Resultatene viser at virusfiltrering i overensstemmelse med eksempler 1 og 2 tilfredsstiller kravene fra myndighetene vedrørende virusreduksjon i et prosessstrinn. Anvendelse av et høyt saltinnhold i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse gir dessuten like effektiv fjerning av virus som tidligere kjente teknikker.

Eksempel 4

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 1, med det unntak at den inngående proteinløsning ikke var så ren.

Diafiltrering med fortykning på ca. 3 volumenheter pr. volumenhet inngående proteinløsning (1 + 3) ga et utbytte på ca. 65 %.

Eksempel 5

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 2, med det unntak at den inngående proteinløsning ikke var så ren.

- 5 Diafiltrering med fortynninger på ca. 3 volumenheter pr. volumenhet inngående proteinløsning (1 + 3) ga et utbytte på ca. 89 %. Utbyttet av faktor IX:C var 87 %.

Eksempel 6

- 10 Det ble utført eksperimenter med faktor IX som makromolekyl for å vise virkningen av fire saltinnhold på proteinsilingskoeffisienten, diafiltreringsvolumet og utbyttet, idet andre eksperimentbetingelser var konstant. Den anvendte "Nanotiv"-løsning var lignende den anvendt i eksempel 1. De
15 anvendte eksperimentbetingelser var de samme som i eksempel 1.

Tabell 5

- Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 0,144 M NaCl+0,0055 M natriumsitrat. Det totale saltinnhold:
20 ca. 0,15 M.

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	25
2	6,9	28
3	14,1	43
4	20,8	49
5	24,3	50

Tabell 6

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 0,5 M NaCl+0,01 M natriumsitrat. Totalt saltinnhold: ca. 0,5 M.

5

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	36
2	6,9	44
3	14,1	61
4	20,8	67
5	24,3	69

Tabell 7

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 1,0 M NaCl+0,1 M natriumsitrat. Totalt saltinnhold: ca. 1,0 M.

10

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	49
2	6,9	60
3	14,1	72
4	20,8	74
5	24,3	76

15

Tabell 8

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 1,5 M NaCl+0,01 M natriumsitrat. Totalt saltinnhold: ca. 1,5 M.

5

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	48
2	6,9	56
3	14,1	73
4	20,8	76
5	24,3	74

Det fremgår fra tabellene 5 til 8 at foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en markert forbedring av prosess-
 10 betingelsene ved virusfiltrering av faktor IX-løsninger, sammenlignet med tidligere kjente teknikker hvor det er anvendt lave saltinnhold.

Eksempel 7

15 Eksperimentet ble utført med faktor IX som makromolekyl for å vise virkningen av tre forskjellige salter på proteinsilingskoeffisienten, diafiltreringsvolumet og utbyttet, idet andre eksperimentbetingelser ble holdt konstant. Den anvendte "Nanotiv"-løsning var lignende den anvendt i
 20 eksempel 1. De anvendte betingelser var de samme som i eksempel 1.

Tabell 9

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 0,5 M kaliumdihydrogenfosfat. Totalt saltinnhold: 0,5 M.

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	34
2	6,9	48
3	14,1	57
4	20,8	55

5

Tabell 10

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 0,5 M NaCl. Totalt saltinnhold: 0,5 M.

10

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	27
2	6,9	43
3	14,1	50
4	20,8	46

15

20

Tabell 11

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient. Bufferen bestod av 0,5 M bariumklorid. Totalt saltinnhold: 0,5 M.

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	24
2	6,9	36
3	14,1	34
4	20,8	--

5

Det fremgår fra tabellene 5 til 8 at foreliggende oppfinnelse kan utføres fordelaktig med et antall forskjellige salter. Det fremgår også at proteinsilingskoeffisienten øker
 10 når det anvendes salter med en høy utsaltningsseffekt i overensstemmelse med Hofmeister-serien (kaliumdihydrogenfosfat), sammenlignet med et salt som har en lav utsaltningsseffekt (bariumklorid).

15 Eksempel 8

Det ble utført eksperimenter med gammaglobulin som makromolekyl for å vise virkningen av saltinnhold på proteinsilingskoeffisient, diafiltreringsvolum og utbytte. Løsningen inneholdende gammaglobulin var et kommersielt produkt erholdt
 20 fra blodplasma, "Gammonativ", levert av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige. Før filtrering var gammaglobulinløsningen rensset ved en innledende Cohn-fraksjonering etterfulgt av et kromatografisk trinn.

De anvendte eksperimentbetingelser var de samme som i
 25 eksempel 1, med unntak av at virusfjerningsfiltret var et "Viresolve"/180-filter, pH i løsning var 6,8 og protein-konsentrasjonen var 2,5-5,0 A₂₈₀-enheter. Bufferen bestod av 2,2 % albumin+0,15 M NaCl+0,02 M NaAc+0,075 M glysin. Totalt saltinnhold: 0,17 M.

Tabell 12
Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	32
2	6,9	35
3	10,7	41
4	14,1	51
5	17,6	59
6	20,8	63
7	24,3	69

5

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisienten ga en optimal filtratgjennomstrømningshastighet på 20,8 ml/minutt.

10 Eksempel 9

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 8, med unntak av at i dette tilfelle bestod bufferen av 2,2 % albumin+1,0 M NaCl+0,02 M NaAc+0,075 M glysin. Totalt saltinnhold: ca. 1,0 M.

15

20

25

Tabell 13

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	38
2	6,9	57
3	10,7	64
4	14,1	71
5	17,6	75
6	20,8	80
7	24,3	81

5

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisienten ga en optimal filtratgjennomstrømningshastighet på 20,8 ml/minutt.

Optimalisering av utbyttet ved en filtratgjennomstrømningshastighet på 20,8 ml/minutt, og en oppholdstid på opp til 10 minutter, ga en P/R-kvotient på mellom 60 og 68 %.

Diafiltrering med en fortynningsgrad på ca. 1 volumenhet pr. volumenhet inngående proteinløsning (1 + 1) ga et utbytte på 90 %.

15 Eksempel 10

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 8, med unntak av at i dette tilfelle var pH i løsningen 5,5.

20

25

Tabell 14

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	41
2	6,9	47
3	14,1	62
4	20,8	72
5	24,3	74

5

Eksempel 11

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 10, med unntak av at i dette tilfelle bestod bufferen av 2,2 % albumin+1,0 M NaCl+0,02 M NaAc+0,075 M glysin. Totalt saltinn-

10

hold: ca. 1,0 M.

Tabell 15

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	57
2	6,9	67
3	14,1	78
4	20,8	88
5	28,1	90

15

Eksempel 12

Det ble utført eksperimenter med albumin som makromolekyl for å vise virkningen av saltinnhold på proteinsilingskoeffisient, diafiltreringsvolum og utbytte. 4 %-

5 løsningen inneholdende humant serumalbumin (HSA) erholdt fra blodplasma, ble levert av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige. Før filtrering var den albumininnholdende løsning rensed ved kombinert Cohn-fraksjonering og et kromatografisk trinn.

De anvendte eksperimentbetingelser var de samme som i

10 eksempel 1, med unntak av at proteinkonsentrasjonen var ca. 10 A₂₈₀-enheter. Bufferen bestod av 0,15 M NaCl+0,02 M NaAc, hvilket ga et totalt saltinnhold på 0,17 M.

Tabell 16

15 Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	34
2	6,9	39
3	14,1	50
4	20,8	51
5	24,3	50

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisienten ga en

20 optimal filtratgjennomstrømningshastighet på 20,8 ml/minutt.

Eksempel 13

Det ble anvendt de samme betingelser som i eksempel 12, med unntak av at i dette tilfelle bestod bufferen av 1,0 M NaCl+0,02 M NaAc, hvilket ga et totalt saltinnhold på ca.

25 1,0 M.

Tabell 17
Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient

Eksperiment	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R, %
1	3,5	39
2	6,9	57
3	14,1	62
4	20,8	64
5	24,3	60

5

Diafiltrering med en fortynningsgrad på 1 volumenhet pr. volumenhet inngående proteinløsning (1 + 1) ga et utbytte på 85 %.

10 Eksempel 14

Det ble utført eksperimenter med faktor IX som makromolekyl for å vise virkningen av retensjonsgjennomstrømningshastigheten på proteinsilingskoeffisienten, idet andre betingelser ble holdt konstant. Den anvendte kommersielle "Nanotiv"-

15 løsning var lignende løsningen anvendt i eksempel 1. De anvendte betingelser var de samme som i eksempel 1, med unntak av at i dette tilfelle bestod bufferen 1 M NaCl+6,4 mM natriumsitrat, med en pH på 7,0.

20

25

Tabell 18

Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient ved forskjellige retensjonsgjennomstrømningshastigheter

Eksperi- ment	Retensjonsgjennom- strømningshastig- het, l/t	filtratgjennom- strømningshastig- het, ml/min	P/R, %
1	1	14	79
2	1	19	85
3	1	24	85
4	10	14	72
5	10	19	76
6	10	24	76
7	20	14	62
8	20	19	70
9	20	24	76
10	30	14	65
11	30	19	69
12	30	24	73
13	40	14	60
14	40	19	64
15	40	24	70
16	50	14	57
17	50	19	61
18	50	24	68
19	60	14	51
20	60	19	56
21	60	24	62

22	90	14	46
23	90	19	56
24	90	24	56

Lavere retensjonsgjennomstrømningshastigheter førte til høyere proteinpermeabilitet gjennom filteret.

5

Eksempel 15

Eksperimenter ble utført med faktor IX som makromolekyl i en løsning med høyt saltinnhold, for å vise virkningen av typen av virusfiltreringsteknikk på fortynning, ut-
 10 bytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid, idet andre eksperimentbetingelser i alt vesentlig ble holdt konstant. De anvendte eksperimentbetingelser, inkludert "Nanotiv"-løsningen, var de samme som anvendt i eksempel 1, med unntak av de følgende forskjeller:

15

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning før filtrering (g)	294	1124
Proteinkonsentrasjon (A_{280} enheter)	0,66	1,0
Retensjonsgjennomstrømningshastighet (l/t)	40	0
Filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	24	28

Tabell 19

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved anvendelse av forskjellige virus-filtreringsteknikker

5

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning etter filtrering (g)	459	1146
Fortynning	1 + 0,56	1 + 0,02
Utbytte	89	94
Proteinsilingskoeffisient (P/R i %)	17-64	92-98
Reell filtratgjennomstrømnings-hastighet (ml/min)	15-24	7-25
Bearbeidelsestid (kIU faktor IX/t)	31	105
Proteinmengde (A_{280} enheter/cm ²)	89	94

Virusfiltrering av faktor IX ved anvendelse av "dead-end"-teknikken betyr mindre fortynning, kortere bearbeidelsestider og fører til et høyere utbytte og en høyere protein-permeabilitet.

10

Eksempel 16

Ekspirerenter ble utført med faktor IX som makromolekyl, for å vise virkningen av saltinnhold på utbytte og proteinsilingskoeffisient ved virusfiltrering i overensstemmelse med "dead-end"-teknikken, idet de resterende eksperimentbetingelser ble holdt konstant. I tillegg til NaCl, inneholdt bufferen også i begge tilfeller 6,4 mM natriumsitrat (pH 7,0). De anvendte betingelser, inkludert "Nanotiv"-løsningen, var de samme som anvendt i eksempel 1, med unntak av de følgende forskjeller:

15

20

Saltinnhold (M NaCl)	1,0	0,15
Mengde proteinløsning før virus-filtrering (g)	293	256
Proteinkons. (A_{280} enheter)	0,84	0,84
Retensjonsgjennomstrømningshastighet (l/t)	0	0
Filtratgjennomstrømningshastighetsbuffer (ml/min)	28	28

5

Tabell 20

Bestemmelse av fortynning, utbytte og proteinsilingskoeffisient ved anvendelse av en buffer som inneholdt 1,0 M NaCl+6,4 mM natriumsitrat (pH 7,0).

Mengde filtrat, g	P/R, %	Gjennomstrømningshastighet, ml/min
50	83	31
100	82	28
150	84	30
200	81	23
250	81	21

10

Prøve	Mengde, g	Proteinkonsentra- sjon, A_{280} enheter	Utbytte, %
Før virus- filtrering	293	0,84	100
Filtrat	284	0,67	77
Vaskeløsning	30	0,47	6

Et totalt utbytte på 83 % ble oppnådd gjennom virus-
filtrering, med en fortynningsgrad på 1+0,07. Bearbeidelsestid
5 264 kIU faktor IX/time.

Tabell 21

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient
og bearbeidelsestid ved anvendelse av en buffer inneholdende
10 0,15 M NaCl+6,4 mM natriumsitrat (pH 7,0).

Mengde filtrat, g	P/R, %	Gjennomstrømnings- hastighet, ml/min
50	61	22
100	62	20
150	63	18
200	63	16

Prøve	Mengde, g	Proteinkonsentra- sjon, A_{280} enheter	Utbytte, %
Før virus- filtrering	256	0,84	100
Filtrat	243	0,50	56
Vaskeløsning	30	0,50	7

Et totalt utbytte på 63 % ble oppnådd med virusfiltret, med en fortynningsgrad på 1+0,07. Bearbeidelsestid 194 kIU faktor IX/time.

5

Eksempel 17

Eksperimenter ble utført med antitrombin (AT III) som makromolekyl i en løsning med lavt saltinnhold, for å vise virkningen av denne type virusfiltreringsteknikk på fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid, idet andre betingelser i det alt vesentlige ble holdt konstant. Den anvendte kommersielle løsning "ATenativ" ble levert av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige. Bufferen inneholdt 0,12 M NaCl+1 mM natriumfosfat (pH 7,4) i begge tilfeller. De anvendte betingelser var de samme som i eksempel 1, med unntak av de følgende forskjeller:

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning før filtrering (g)	967	970
Proteinkonsentrasjon (A_{280} enheter)	9,1	9,1
Retensjonsgjennomstrømnings-hastighet (l/t)	40	0
Filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	24	24

Tabell 22

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved hjelp av forskjellige virusfiltreringsteknikker

5

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning etter virusfiltrering (g)	1692	989
Fortynning	1+0,75	1+0,02
Utbytte (%)	97	97
Proteinsilingskoeffisient (P/R i %)	73-86	95-98
Reell filtratgjennomstrømnings-hastighet (ml/min)	15-24	8-14
Bearbeidelsestid (kIU AT III/t)	37	53
Proteinmengde (A_{280} enheter/cm ²)	18477	18481
Filtreringseffektivitet (1/m ² filter*t)	9	12

Virusfiltrering av AT III ved anvendelse av "dead-end"-teknikken, betyr mindre fortynning, gir høyere proteinpermeabilitet og kortere bearbeidelsestider.

10

Eksempel 18

Eksperimenter ble utført med antitrombin (AT III) som makromolekyl, for å vise virkningen av saltinnholdet på utbytte og proteinpermeabilitet (silingskoeffisient) ved virusfiltrering i overensstemmelse med den tangentielle teknikk, idet resterende eksperimentbetingelser ble holdt konstant. I tillegg til NaCl inneholdt bufferen 1 mM natriumfosfat (pH 7,4) i alle eksperimenter. De anvendte betingelser, inkludert "ATenativ"-løsningen, var de samme som i eksempel 17, med unn-

15

20

tak av at retensjonsgjennomstrømningshastigheten var 20 l/time i alle eksperimenter.

Tabell 23

- 5 Bestemmelse av proteinsilingskoeffisient ved forskjellige saltinnhold og forskjellige filtratgjennomstrømningshastigheter.

Eksperiment	Saltinnhold, M NaCl	Filtratgjennomstrømningshastighet, ml/min	P/R %
1	0,15	14	79
2	0,15	19	84
3	0,15	24	87
4	1,0	14	87
5	1,0	19	90
6	1,0	24	89

10

Høyt saltinnhold resulterte i forbedret proteinpermeabilitet med hensyn til AT III.

Eksempel 19

- 15 Eksperimenter ble utført med humant serumalbumin (HSA) som makromolekyl i en løsning med høyt saltinnhold, for å vise virkningen av typen av virusfiltreringsteknikk på for-
tynning, utbytte, proteinpermeabilitet og bearbeidelsestid, idet andre eksperimentbetingelser i alt vesentlig ble holdt
20 konstant. Den anvendte HSA-løsning var lik løsningen anvendt i eksempel 12. Bufferen inneholdt 1,0 M NaCl+20 mM natriumacetat (pH = 7,4) i alle eksperimenter. De anvendte betingelser var de samme som i eksempel 1, med unntak av de følgende forskjeller:

25

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning før filtrering (g)	200	6460
Proteinkonsentrasjon (A_{280} enheter)	10	9,2
Retensjonsgjennomstrømnings-hastighet (l/t)	40	0
Filtratgjennomstrømningshastig-het (ml/min)	24	28

Tabell 24

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved anvendelse av tangentiell virus-

5 filtrering.

Mengde filtrat, g	P/R, %
50	39
100	57
200	62
300	64
350	60

Prøve	Mengde, g	Proteinkonsentra-sjon, A_{280} enheter	Utbytte, %
Før virus-filtrering	200	10,0	100
Filtrat	144	7,0	51
Vaskeløsning 1	100	4,4	22
Vaskeløsning 2	100	4,1	12

Et totalt utbytte på 85 % ble oppnådd gjennom virusfiltret med en fortynning på 1+0,72. Bearbeidelsestid 4 650 mg HSA/time.

5

Tabell 25

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved virusfiltrering med "dead-end"-teknikken.

10

Mengde proteinløsning etter virusfiltrering (g)	6380
Fortynning	1+0,0
Utbytte (%)	98
Proteinsilingskoeffisient (P/R i %)	97-100
Reell filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	24-34
Bearbeidelsestid (mg HSA/t)	14895
Proteinmengde (A_{280} enheter/cm ²)	124807
Filtreringseffektivitet (1/m ² filter*t)	32

Virusfiltrering av HSA ved anvendelse av "dead-end"-teknikken, betyr mindre fortynning og resulterer i et høyere utbytte og høyere proteinpermeabilitet og kortere bearbeidelsestider.

15

Eksempel 20

Eksperimenter ble utført med gammaglobulin som makromolekyl i en løsning med høyt saltinnhold for å vise virkningen av denne type av virusfiltreringsteknikk på fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid, idet de resterende eksperimentbetingelser i alt vesentlig ble holdt konstant. Den anvendte gammaglobulinløsning var lik løsningen

20

anvendt i eksempel 8. Bufferen inneholdt 1,0 M NaCl+20 mM natriumacetat + 0,075 M glysin (pH = 5,5) i alle eksperimenter. De anvendte betingelser var de samme som i eksempel 1, med unntak av de følgende forskjeller:

5

Virusfiltreringsteknikk	Tangentiell	"Dead-end"
Mengde proteinløsning før filtrering (g)	301	400
Proteinkonsentrasjon (A_{280} enheter)	5,1	4,9
Retensjonsgjennomstrømnings-hastighet (l/t)	40	0
Filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	24	28
Transmembrantrykk (bar)	0,2	0,1

Tabell 26

Bestemmelse av fortykning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved anvendelse av "dead-end"-filtrering:

10

Mengde filtrat, g	P/R, %	Gjennomstrømnings-hastighet, ml/min
50	92	17
100	92	12
150	93	9
200	92	8
250	90	7
300	88	6
350	87	5

Prøve	Mengde, g	Proteinkonsentra- sjon, A ₂₈₀ enheter	Utbytte, %
Før virus- filtrering	400	4,9	100
Filtrat	350	4,6	82
Vaskeløsning	100	2,3	12

Et totalt utbytte på 94 % ble oppnådd gjennom virus-
filtret, med en fortynningsgrad på 1+0,12. Bearbeidelsestid
5 2 790 mg gammaglobulin/time.

Tabell 27

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient
og bearbeidelsestid ved anvendelse av tangentiell virus-
10 filtrering.

Mengde proteinløsning etter virusfiltrering (g)	643
Fortynning	1+1,16
Utbytte (%)	92
Proteinsilingskoeffisient (P/R i %)	43-67
Reell filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	16-20
Bearbeidelsestid (mg gammaglobulin/t)	1873
Proteinmengde (A ₂₈₀ enheter/cm ²)	3192
Filtreringseffektivitet (l/m ² filter*t)	23

teknikken, involverer mindre fortynning og resulterer i et høyere utbytte og proteinpermeabilitet og kortere bearbeidelsestider.

5 Eksempel 21

Eksperimenter ble utført med antitrombin som makromolekyl for å illustrere at foreliggende oppfinnelse er anvendelig i en industriell skala ved anvendelse av et vesentlig større filterareale (9 290 cm²) enn i de tidligere eksempler (310 cm²). En kommersiell løsning inneholdende antitrombin (AT III), "ATENative", ble levert av Pharmacia AB, Stockholm, Sverige.

Eksperimentbetingelser

- 15 Buffer: 1 M NaCl+1 mM natriumfosfat
- Totalt saltinnhold: ca. 1,0 M.
- Proteinkonsentrasjon: 9,2 A₂₈₀-enheter.
- Proteinløsning pH: 7,4
- Mengde proteinløsning før virusfiltrering: 20,8 kg
- 20 Virussepareringsfiltre: "Viresolve"/70
- Filtreringsteknikk: "dead-end"
- Filterareale: 9 290 cm²
- Retensjonsgjennomstrømningshastighet: 0 l/time
- Filtratgjennomstrømningshastighet buffer: 20 l/time
- 25 Transmembrantrykk: 0,3 bar.

Tabell 28

Bestemmelse av fortynning, utbytte, proteinsilingskoeffisient og bearbeidelsestid ved anvendelse av et filterområde på 9 290 cm² og "dead-end"-filtreringsteknikker i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse.

Mengde proteinløsning etter virusfiltrering (g)	24,1
Fortynning	1+0,16
Utbytte (%)	96
Proteinsilingskoeffisient (P/R i %)	94-97
Reell filtratgjennomstrømningshastighet (ml/min)	7-12
Bearbeidelsestid (kIU AT III/time)	735
Proteinmengde (A ₂₈₀ enheter/cm ²)	19136
Filtreringseffektivitet (l/m ² filter*t)	8,8

Det fremgår fra dette eksempel at virusfiltrering av antitrombin i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse kan utføres i industriell skala med utmerkede resultater.

Eksempel 22

Den virusfjernende effekt oppnådd med eksperimentene beskrevet i eksempel 15 ble bestemt ved hjelp av en virusundersøkelse, men ved et høyere saltinnhold. Virusfiltreringsteknikken var "dead-end"-teknikken. Undersøkelsen ble utført på parvovirus som i eksempel 3. Parvoviruset ble tilsatt til løsningene inneholdende faktor IX, 1,0 M NaCl+0,01 M natriumsitrat (eksperiment 1). Løsningene ble analysert med hensyn til parvovirus både før og etter virusfiltrering.

Eksperiment	Virusreduksjon
1	$1 \times 10^{5,5}$

Resultatene viser at virusfiltrering i overensstemmelse med eksempel 15 ved anvendelse av "dead-end"-teknikken, tilfredsstiller kravene fra myndighetene vedrørende virusreduksjon i et prosessstrinn. Anvendelse av et høyt saltinnhold i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er dessuten minst like effektiv ved fjerning av virus som tidligere kjente teknikker.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for virusfiltrering av en løsning inneholdende minst ett makromolekyl,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det totale saltinnhold i løsningen ligger innen området fra 0,6 M og opp til metning av løsningen med det aktuelle salt.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at det totale saltinnhold i løsningen ligger i området 0,6-2,5 M.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det totale saltinnhold
15 i løsningen ligger innen området 0,6-2,0 M.
4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at saltet er utvalgt fra natriumklorid, kaliumklorid, natriumacetat, natriumsitrat og
20 kombinasjoner derav.
5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er utvalgt fra proteiner, polysakkarider og polypeptider og
25 kombinasjoner derav.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er faktor IX.
30
7. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er gammaglobulin.
- 35 8. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er albumin.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er anti-
trombin III.

5 10. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at makromolekylet er et
delesjonsderivat av rekombinant faktor VIII.

11. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at virusfiltrerings-
prosessen utføres i overensstemmelse med "dead-end"-filtrer-
ingsteknikken.

12. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at virusfiltrerings-
prosessen reduserer innholdet av ikke-innkapslede viruser med
minst 4 log.