



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(21) Patentansøgning nr.: 3185/81

(51) Int.Cl.⁴ A 61 K 35/16

(22) Indleveringsdag: 16 jul 1981

(41) Alm. tilgængelig: 23 jan 1982

(44) Fremlagt: 17 apr 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 22 jul 1980 AT 3781/80

(71) Ansøger: *Immuno Aktiengesellschaft fuer Chemisch-medizinische Produkte; Industriestrasse 72; 1220 Wien, AT

(72) Opfinder: Johann *Eibl; AT, Otto *Schwarz; AT, Friedrich *Elsinger; AT, Anton *Philapitsch; AT

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af blodkoagulationsfremmende præparater på basis af humanproteiner

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 3845/77 (151932)

DE freml. skrift nr. 2262520, 2715832

Andre publikationer. Pharmacia Fine Chemicals: Dextran Fractions, Dextran Sulphate, DEAE-Dextran, (1975-76) side 10

(57) Sammendrag:

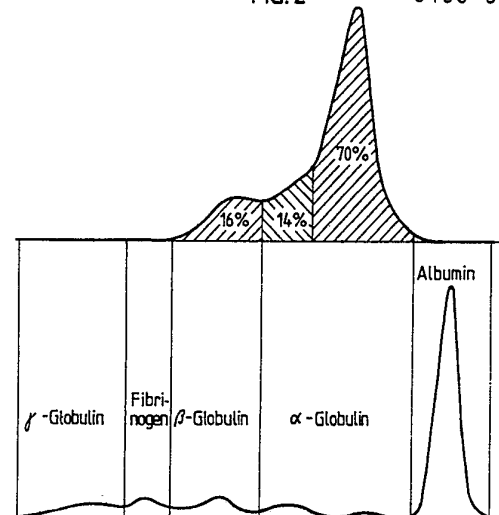
3185-81

Blodkoagulationsfremmende præparat på basis af humanproteiner med et indhold af koagulationsfaktorerne II, VII, IX X og en faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet (FEIBA) samt fremgangsmåde til fremstilling heraf.

For at udvide anvendelsesområdet for et sådant præparat og for at opnå, at det tåles bedre, specielt for så vidt muligt at udelukke thrombogene og vasoaktive virkninger, er præparatet

- fri for thrombogen aktivitet indtil mindst to enheder FEIBA pr. kg kanin i den thromboseinducefende aktivitetstest ifølge Wessler,
- fri for kallikreinaktivitet og fri for prækallikrein-aktivator-aktivitet,
- således affinitetskromatografisk separerbar på dextransulfat-

FIG. 2 3185-81



DK 155500 B

3185-81

agarose ved hjælp af en NaCl-gradient, at proteinet med faktor IX-aktivitet eluerer ved lavere NaCl-koncentration end proteinet med FEIB-aktivitet (fig. 1),

og eluaterne, som indeholder proteinet med faktor IX-aktivitet og proteinet med FEIB-aktivitet kan adskilles elektroforetisk i α - og β -globuliner, hvorhos adskillelseskurven udviser et bestemt forløb med hensyn til indholdet i eluaterne af α -globuliner og β -globuliner (fig. 2).

Præparatet fremstilles ved, at man behandler humanplasma med sulfaterede højpolymere carbonhydrater og/eller med basiske ionbyttere, og at proteinblandingen med genereret FEIB-aktivitet bliver adsorberet, hvorpå det bliver udvundet ved eluering og koncentring.

Opfindelsen angår et blodkoagulationsfremmende præparat på basis af humanproteiner med et indhold af koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X og en faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet.

- 5 Blodkoagulationsfremmende præparater med faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet, der forkortes til "FEIBA" (Faktor Eight, Inhibitor-Bypassing-Activity) kendes. I AT-patentskrift 350.726 (svarende til US-patentskrift 4.160.025 henholdsvis DE-offentliggørelsesskrift 2734821) er fremstillingen af et sådant præparat beskrevet.
- 10 De anvendes med godt resultat ved behandlingen af patienter, som lider af hæmofili, og hvis blod indeholder et mod faktor VIII rettet hæmmende stof (inhibitor). Den kemiske struktur af FEIBA-faktoren kendes endnu ikke. Man ved kun, at det drejer sig om et protein med en molekylvægt i nærheden af ca. 100.000.
- 15 Fremstillingen af præparatet ifølge de ovennævnte patentskrifter skete ved generering af human citrationholdig plasma uden nærværelse af frie calciumioner ved behandling med i vand uopløselige uorganiske koagulationsfysiologisk-overfladeaktive stoffer, såsom kiselgel eller kaolin, og efterfølgende adsorption og eluering, hvorved der opnås en blanding af faktorerne
- 20 II, VII, IX og X, faktoren FEIBA og andre proteiner, hvis sammensætning hidtil ikke er beskrevet.

- Selv om præparatet ifølge DE-offentliggørelsesskrift 2734821 som nævnt har vist sig værdifuldt ved behandlingen af faktor VIII-inhibitor-patienter,
- 25 er der brug for at udvide anvendelsesområdet og at forbedre tåleligheden af FEIBA-præparatet yderligere, specielt at reducere uønskede bireaktioner, såsom thrombogener og vasoaktive virkninger til et minimum.

- 30 Dette opnås ifølge opfindelsen med en fremgangsmåde til fremstilling af et blodkoagulationsfremmende præparat på basis af humanproteiner med et indhold af koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X og en faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet, hvilket præparat

- er fri for thrombogen aktivitet indtil mindst 2 enheder

FEIBA pr. kg kanin i den thrombose-inducerende aktivitets-
test ifølge Wessler,

- 5 - er fri for kallikreinaktivitet og fri for prækallikrein-
aktivator-aktivitet - målt i en vandig opløsning af præparatet
med en FEIBA-koncentration indtil mindst 10 enheder pr. ml,
- 10 - affinitetskromatografisk på dextransulfat-agarose
ved hjælp af en NaCl-gradient kan separeres således,
at proteinet med faktor IX-aktivitet elueres ved lavere NaCl-
koncentration end proteinet med FEIB-aktivitet, hvilken fremgangsmåde er
ejendommelig ved, at humanplasma bliver behandlet med sulfaterede højpoly-
mere carbohydrater og/eller med basiske ionbyttere, og proteinblandingen
15 med genereret FEIB-aktivitet bliver adsorberet, hvorpå det bliver udvundet
ved eluering og koncentreret.

De ovenfor angivne egenskaber, nemlig at præparatet er fri
20 for thrombogen aktivitet og for kallikrein-aktivitet henholds-
vis for prækallikrein-aktivator-aktivitet - sidstnævnte er an-
svarlig for de vasoaktive virkninger - betyder, at præparatet
tåles særdeles godt. Den thromboseinducerende aktivitetstest
og undersøgelserne af kallikrein-aktivitet og prækallikrein-akti-
25 vator-aktivitet kendes af fagfolk. De beskrives nærmere i for-
bindelse med de efterfølgende eksempler.

Den tredje egenskab ved præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge
opfindelsen, separerbarheden ad affinitetskromatografisk vej på dextransulfat-
30 agarose ved hjælp af en NaCl-gradient er eksempelvis vist på
tegningens fig. 1. Den affinitetskromatografiske metode på
dextransulfat-agarose kendes af fagfolk (D.S. Petter og C.
Prowse, Thrombosis Research LL (1977), 687-692). Herved kob-
les dextransulfat (molekylvægt 500.000) til CNBr-aktiveret

Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sverige). Den således udvundne dextransulfat-sepharose bringes i ligevægt i 0,4% trinatriumcitrat, $2\text{H}_2\text{O}$ -opløsning (pH-værdi 7,4) og fyldes i en søjle. Prøven, der skal undersøges, overføres til søjlen og elueres derpå fraktioneret med en NaCl-opløsning i 0,4% trinatriumcitrat, $2\text{H}_2\text{O}$ (pH-værdi 7,4) med stigende NaCl-koncentration.

I fig. 1 er eluatets fraktionsnumre angivet på abscissen. På venstre ordinat er angivet aktiviteterne af koagulationsfaktorerne i enheder pr. ml, og på den højre ordinat er angivet koncentrationen af natriumchloridgradienten i mol/liter. Det lineære forløb af gradienten er angivet som linie G. Som det fremgår af fig. 1, elueres proteinet med faktor IX-aktivitet i området fra 0,1 til 0,5 (molær) med et maksimum ved 0,3 (molær), proteinet med FEIB-aktivitet ved en NaCl-koncentration i området fra 0,3 til 0,5 (molær) med et maksimum ved 0,4 (molær). Den stigende NaCl-koncentration fremgår af NaCl-gradienten G, der går fra 0 molær til 0,65 molær NaCl.

For præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er indholdet af globuliner ved elektroforetisk separering, som belyst i tegningens fig. 2. Den øverste del af fig. 2 viser separeringskurven for dextran-sulfat-sepharose-kromatografiens eluater af præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der indeholder proteinerne med faktor IX-aktivitet og FEIB-aktivitet, hvori mod den nederste del af fig. 2 gengiver den elektroforetiske separeringskurve af et naturligt humanplasma. Det ses, at i dette eksempel udgør spidsværdien i α -globulinområdet 70% af det samlede protein. Til spidsværdien slutter sig i α -globulinområdet en skulder, som udgør 14% af det samlede proteinindhold, hvorpå der i tilslutning til skulderen i β -globulinområdet følger en svag udpræget spids, som udgør 16% af det samlede protein.

En yderligere egenskab ved præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består fordelagtigt i, at FEIB-aktiviteten efter 1 times inkubation i faktor VIII-inhibitorplasma stadig er bibeholdt i et omfang på

mindst ca. 50%. Denne egenskab tyder på en mere langvarig virkning ved applikation til faktor VIII-inhibitor-patienter.

5 En yderligere egenskab ved præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består hensigtsmæssigt i, at faktor IX-aktiviteten efter 1 times inkubation i faktor IX-mangelplasma stadig er bibeholdt i et omfang på mindst ca. 50%. Dette betyder, at præparatet kun indeholder lidt eller en meget ringe andel af aktiveret faktor IX. Det er kendt, at 10 aktiveret faktor IX bliver inaktiveret i humanplasma. Aktiveret faktor IX ville forårsage uheldige thrombogene virkninger, da i normaltilstanden kun ikke-aktiveret faktor IX eller alment ikke-aktiverede koagulationsfaktorer er til stede i blodet. Aktiveret faktor IX (faktor IXa) eller alment aktiverede koagulationsfaktorer dannes i ringe mængder efter kvæstelser for 15 at opnå blodstandsning. Et overskud af aktiverede koagulationsfaktorer fører imidlertid til thromboser.

Af litteraturen (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 74, nr. 7, 20 3028-3032, juli 1977, "In vitro and in vivo correlation of clotting protease activity: Effect of heparin" af S.N. Gitel, R.C. Stephenson og S. Wessler) kendes, at netop faktoren IXa besidder den højeste thrombogene virkning i forhold til andre aktiverede koagulationsfaktorer, såsom Xa og IIa (thrombin).

25 Endelig er det hensigtsmæssigt, at en egenskab ved det blodkoagulationsfremmende præparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at det har et indhold af inter- α -trypsin-inhibitor (ITI) på 0,05 til 5 mg pr. FEIBA-enhed.

30 Indholdet af ITI bevirker, at thrombogeniteten af præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er lav i Wessler-testen.

35 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er karakteriseret ved, at humanplasma behandles med sulfaterede højpolymere carbohydrater og/eller med basiske ionbyttere, og at proteinblandingen bliver adsorberet med genereret FEIB-aktivitet, hvorpå det bliver udvundet ved eluering og koncentrering. Som eksempler på sulfaterede, højpolymere carbohydrater kan nævnes dextransulfat,

og som eksempel på basiske ionbyttere kan nævnes DEAE-Sephadex, se eks. 1 og 2.

5 Ved gennemførelse af fremgangsmåden må det påses, at plasmaet eller reaktionskomponenterne bliver holdt fri for stoffer, som er i stand til at forøge antithrombin-III-aktiviteten, såsom heparin eller heparinoider.

10 Ifølge en udførelsesform for opfindelsen bliver plasmaet først i kort tid behandlet med sulfaterede højpolymere carbohydrater herpå adsorberes proteinblandingen med genereret FEIB-aktivitet på en ionbytter på dextranbasis og elueres og koncentrerer umiddelbart derpå.

15 Ifølge en anden udførelsesform for opfindelsen behandles plasmaet med en ionbytter på dextranbasis, og efter mindst 2 timers indvirkning elueres den på ionbytteren adsorbere proteinblanding med genereret FEIB-aktivitet og koncentrerer derpå. Ved
20 denne udførelsesform er genereringen af FEIB-aktiviteten afhængig af indvirkningstiden. Denne kan udgøre indtil 48 timer.

De anvendte fremstillingsforanstaltninger er ikke kritiske og kan variere inden for vide grænser. Således kan pH-værdien
25 ligge mellem 6 og 9, temperaturen ligge mellem 0°C og 40°C, de anvendte mængder dextransulfat udgøre 0,1-500 mg/liter plasma, og af DEAE-sephadex kan der anvendes 0,01-10 g/liter plasma. Som udgangsmateriale for fremgangsmåden ifølge opfindelsen kommer der ikke blot naturlig humanplasma på tale, men også plasma-
30 fraktioner, f.eks. kryosupernatant og Cohn-I-supernatant (8% alkohol).

Præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og fremgangsmåden til fremstilling heraf belyses nærmere i
35 de efterfølgende eksempler, hvorhos der i tilslutning til eksemplerne er angivet de anvendte bestemelsesmetoder og i tabelform anført de opnåede resultater.

Eksempel 1

1000 liter frisk frosset human citratplasma optøes ved 0-4°C,
og det derved resulterende kryobundfald fracentrifugeres ved
5 2°C. Den resulterende "Kryosupernatant" tilsættes ved en naturlig
pH-værdi på 7,7 10 g dextransulfat (molekylvægt 500.000) og
omrøres i 15 minutter ved 4°C, hvorved stoffet FEIBA genereres.

Derpå tilsættes 500 g af ionbytteren DEAE-Sephadex A-50
10 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sverige), og der omrøres
i 1/2 time ved 4°C, hvorved det genererede stof FEIBA sammen
med prothrombinkompleksfaktorerne (II, VII, IX, X) og inaktive
proteiner bliver adsorberet på det uopløselige DEAE-sephadex.

15 DEAE-sephadexet frasepareres umiddelbart efter adsorptionsbe-
handlingen ved centrifugering eller filtrering. Det overliggende
plasma kan anvendes til udvinding af gamma-globulin og albu-
min.

20 DEAE-sephadexet underkastes en dobbelt vaskeproces. Derved
bliver DEAE-sephadexet først omrørt med 50 liter af en opløsning
bestående af 4 g/liter trinatriumcitrat, 2H₂O, 7 g/liter natrium-
chlorid og 18 g/liter dinatriumhydrogenphosphat, 12H₂O i destil-
leret vand, pH-værdi 7,5, i 15 minutter ved 4°C. Efter fra-
25 separering ved filtrering omrøres DEAE-sephadexet med 50 liter
af en opløsning bestående af 4 g/liter trinatriumcitrat, 2H₂O og
7 g/liter natriumchlorid i destilleret vand, pH-værdi 7,5, i
15 minutter ved 4°C, og derpå frasepareres igen ved filtrering.

30 Til elueringen omrøres DEAE-sephadexet med 25 liter af en op-
løsning bestående af 30 g/liter natriumchlorid og 1 g/liter
trinatriumcitrat, 2H₂O i destilleret vand, pH-værdi 7,0, i 20
minutter ved 4°C. Eluatet, der indeholder det genererede stof
FEIBA, faktorerne af prothrombinkomplekset (II, VII, IX, X)
35 samt inaktivt protein, udvindes ved filtrering! DEAE-sephadexet
kastes bort. Eluatet dialyseres natten over mod 1000 liter de-
stilleret vand ved 4°C, indfryses og underkastes en første

lyofiliseringsbehandling. I det resulterende bulk-materiale bestemmes FEIB-aktiviteten, nemlig ifølge den i DE-offentliggørelsesskrift 27 34 821 beskrevne metode.

5

Til fremstillingen af det farmaceutisk anvendelige præparat med FEIB-aktivitet opløses bulk-materialet i så meget destilleret pyrogenfrit vand, at FEIB-aktiviteten udgør mellem 10 og 50 FEIBA-enheder pr. ml (i det foreliggende tilfælde 25 FEIBA-enheder pr. ml). Efter tilsætning af de nødvendige salte til fremstillingen af isotonien og indstillingen af pH-værdien mellem 7,0 og 7,5 klares opløsningen gennem membranfilter og filtreres til sidst sterilt gennem et 0,2 µm membranfilter. Opløsningen fyldes under sterile betingelser med indtil 20 ml i hve

10

15 beholder, dybfryses og lyofiliseres.

Eksempel 2

1000 liter frisk frosset human citratplasma optøes ved 0-4°C, og det derved resulterende kryobundfald frasepareres ved centrifugering ved 2°C. Den resulterende "Kryosupernatant" tilsættes ved en naturlig pH-værdi på 7,7 500 g af anionbytteren DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sverige) og omrøres i 1/2 time ved 4°C, hvorved prothrombin-

20

25 kompleksfaktorerne (II, VII, IX, X) og inaktive proteiner bliver adsorberet på DEAE-sephadexet.

Derpå henstilles blandingen i 12 timer ved 4°C. I løbet af denne "kontakttid" genereres stoffet FEIBA.

30

DEAE-sephadexet fraskilles efter 12 timers "kontakttid" ved centrifugering eller filtrering. Det overliggende plasma kan anvendes til udvinding af gamma-globulin og albumin.

35 Den yderligere forarbejdning af DEAE-sephadexet (vask to gange, eluering etc.) sker på samme måde som beskrevet i eksempel 1.

Den thromboseinducerende aktivitetstest ifølge Wessler, som er beskrevet i litteraturen, blandt andet i J-Appl. Physiol. 14
5 (1959), 943-946, "Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum" af Standord Wessler, Stanley M. Reimer og Mindel C. Sheps bliver udført på følgende måde: Per test anvendes tre kaniner. Dyrene bedøves med nembutal. Efter yderligere lokalbedøvelse frilægges vena jugularis i hjertesiden.
10 I en afstand på 1-2 cm forberedes der to ligaturer.

Præparatet, der skal undersøges, injiceres nu i den ønskede dosis i den ørevene, som ligger over for den frilagte vena jugularis i løbet af 15 sekunder. 10-25 sekunder efter endt
15 injektion tiltrækkes de forberedte ligaturer. Den isolerede venesegment forbliver nu i 10 minutter in situ i kaninen. Derpå fjernes venestykket fra dyret og udskæres i en petri-skål i en 5% natriumcitratopløsning, og indholdet bestemmes efter følgende skema.

20

0 = ingen koagulation
1 = få makroskopisk synlige fibrinpartikler
2 = nogle små thromber
3 = to eller flere store thromber
25 4 = en enkelt thrombus, som udfylder hele det isolerede venesegment.

Testen betegnes som positiv i tilfælde af en 4-reaktion. For præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
30 er det væsentligt, at der ved injektion af præparatet indeholdende indtil mindst to enheder FEIBA pr. kg forsøgsdyr ikke optræder nogen 4-reaktion.

Bestemmelsen af kallikrein-aktiviteten og prækallikrein-aktivator-aktiviteten gennemføres på følgende måde.
35

Kallikrein:

1. Metode:

Kallikrein afspalter amidolytisk para-nitroanilin (pNA) af et specifikt chromogent substrat. Koncentrationen af pNA bliver målt fotometrisk ved en bølgelængde på 405 nm.

5

2. Reagenser:

Puffer:

10 Opløsning A: 3,03 g "TRIS" og 1,7 g imidazol opløses i 500 ml 0,1 N saltsyre og suppleres med vand til 1000 ml.

Opløsning B: 4,04 g "TRIS" og 2,27 g imidazol opløses i 500 ml 0,1 N saltsyre og suppleres med vand til 15 1000 ml.

Opløsning C: 11,69 g natriumchlorid opløses med vand til 1000 ml.

20 Opløsning A og opløsning B blandes, indtil der er opnået en pH-værdi på 7,9. Denne blanding behandles med det samme volumen af opløsning C.

Chromogent substrat S-2302 (Firma Kabi, Stockholm):

25 H-D-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginin-p-nitroanilid-dihydrochlorid

1 millimolær opløsning af S 2302: 25 mg i 41 ml vand.

30 Prøve:

Prøven opløses i originalvolumenet, dvs. det volumen destilleret vand, som er nødvendigt til opløsning af lyofilisatet i slutbeholderen, og anvendes ufortyndet i testen.

35 3. Test:

I et vandbad ved en temperatur på 37°C pipetteres i et lille plastrør 1,0 ml puffer, fortempereret til 37°C, 0,1 ml prøve og 0,2 ml chromogent substrat S-2302. Denne blanding anbringes

i et til 37°C tempereret fotometer, og forøgelsen af den optiske tæthed pr. minut (Δ OD/min) ved en bølgelængde på 405 nm ved en lagtykkelse på 10 ml måles. Aktiviteten af en prøve udtrykkes i Δ OD/min.

Prækallikrein-aktivator:

1. Metode:

Af et rensed prækallikreinpræparat (PKK) genereres kallikrein (KK) ved hjælp af en prækallikreinaktivator (PKKA). Kallikreinet afspalter amidolytisk paranitroanilin (pNA) af et specifikt chromogent substrat. Koncentrationen af pNA måles fotometrisk ved en bølgelængde på 405 nm.

2. Reagenser:

Puffer og chromogent substrat svarer til de ved kallikreinbestemmelsen beskrevne reagenser.

Prækallikreinpræparat:

Fremstillingen af præparatet sker ifølge en af Harpel beskrevet fremgangsmåde, der er modificeret af M.S. Horowitz (New York Blood Center). Derved bliver humant citratplasma behandlet ved hjælp af en DEAE-cellulose. Den ikke til DEAE-cellulose bundne fraktion indeholder prækallikreinet.

Positiv kontrol (standard):

Som standard (= referenceværdi) anvendes et albuminpræparat fra Bureau of Biologics (BoB) Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20205, USA. Dette præparat indeholder en prækallikreinaktivator. Kallikreingenerering med denne BoB-standard udgør referenceværdien 1 henholdsvis bliver sat lig 100%.

Prøve:

5 Prøven bliver opløst i originalvolumenet og anvendes ufortyndet i testen.

3. Test:

10 I et vandbad ved en temperatur på 37°C bliver i et lille plastrør pipetteret
0,05 ml prækallikreipræparat
0,05 ml prøve a) Bob-standard til referenceværdien
b) testprøve (i en anden testportion).

15 Efter en inkubationstid på 10 minutter ved 37°C pipetteres
0,7 ml pufferopløsning og 0,1 ml chromogent substrat S-2302.
Denne blanding anbringes i et til 37°C tempereret fotometer,
og forøgelsen af den optiske tæthed pr. minut ($\Delta OD/\text{minut}$)
ved en bølgelængde på 405 nm måles ved en lagtykkelse på 10 mm.
20 Aktiviteten af en prøve ($\Delta OD/\text{minut}$) bliver udtrykt faktorielt
- over for BoB-standardens med tallet 1 - henholdsvis i % af BoB-
standardens.

25 Karakteriseringen af præparatet fremstillet ved fremgangsmåden
ifølge opfindelsen ved hjælp af affinitetskromatografisk fra-
separering af præparatet på dextransulfat-sepharose blev alle-
rede beskrevet i forbindelse med fig. 1.

30 Den elektroforetiske fraseparering af proteinerne med faktor
IX-aktivitet og med FEIB-aktivitet, hvortil der bliver henvist
i forbindelse med fig. 2, kan gennemføres på følgende måde.

35 Som bærer for den elektroforetiske fraseparering af de forskel-
lige proteiner tjener en celluloseacetatmembran, som er fugtet
med elektroforesepufferen (pH-værdi 8,6, ionstyrke 0,075).
På denne membran påføres prøverne, der skal analyseres, sammen
med et normalt humanplasma som standard, og heraf frasepareres
i elektrisk felt; separeringen sker ved, at forskelligt ladede

5 proteiner vandrer med forskellig hastighed i det elektriske felt. Til dette formål bliver den med prøverne forsynede membran behandlet i en speciel med elektroforesepudder fyldt celle i 16-18 minutter ved en spænding på 250 volt og en strømstyrke i begyndelsen på 4-6 milliampere.

10 Efter endt separeringsbehandling gøres de forskellige proteiner synlige ved anbringelse af membranen i en fikserings- eller farveopløsning. Efter nogle skyllebade bliver membranen gjort gennemsigtig i et yderligere bad, anbragt på en glasplade og tørret i tørreskab ved 100°C.

15 Den tørrede membran bliver nu analyseret i en automatisk registrerende og integrerende densitometer og giver separeringskurver, således som det er vist i fig. 2. De forskellige proteiner fremstår derved som bånd af forskellig styrke, hvis arealer er proportionale med de tilsvarende proteiners relative procentværdier, hvorved disse arealer bliver bestemt gennem den automatiske integration af densitometeret.

25 Indordningen af de forskellige bånd eller proteiner af testprøven under de definerede proteiner eller proteingrupper sker ved sammenligning med båndene af det som standard medanalyserede normale humanplasma. Sidstnævnte bliver ved den elektroforetiske analyse opdelt i fem proteingrupper, som definitions-

30 mæssigt - angivet i rækkefølge efter aftagende vandringshastigheder i det elektriske felt - bliver betegnet som følger: albumin, α -globulin, β -globulin, fibrinogen og γ -globulin.

35 Definitionen af FEIBA-enheden samt bestemmelsen heraf (virkningstest) er beskrevet i litteraturen, nærmere bestemt i ATPatentskrift 350.726 (US-patentskrift 4.160.025, DE-offentliggørelseskrift 27 34 821). En FEIBA-enhed defineres således som den FEIB-aktivitet, der forkorter den aktiverede partielle thromboplastintid for et faktor VIII-inhibitorplasma med høj titer til halvdelen af blindværdien. Bestemmelsen af aktiviteten af koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X er ligeledes beskrevet i den kendte litteratur. Således svarer 1 enhed faktor II-VII-IX-X til den aktivitet af disse faktorer, som i gennem-

snit er indeholdt i 1 ml friskt, humant citratplasma.

Bestemmelsen af restaktiviteten af FEIBA efter inkubation i faktor VIII-inhibitor-plasma gennemføres på følgende måde.

5

1. Reagenser:

Reagenserne, der skal anvendes, er beskrevet i forbindelse med bestemmelsen af FEIBA-enhederne (virkningstest) i AT-patentskrift 350.726 (US-patentskrift 4.160.025, DE-offentliggørelsesskrift 27 34 821).

10

2. Test:

15

Af et af 50 FEIBA-enheder/ml indstillet præparat fremstilles med en opløsning af 7 g/liter natriumchlorid og 7 g/liter natriumcitrat, 2H₂O som fortyndingsmiddel følgende fortyndinger: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 og 1 : 64. Af disse seks fortyndinger fremstilles til enhver tid en 1 : 10-fortynding i faktor VIII-inhibitor-plasma (0,05 ml forfortyndet prøve + 0,45 ml faktor VIII-inhibitor-plasma).

20

Disse 1 : 10-fortyndinger i faktor VIII-inhibitor-plasma ("inkubationsblandinger") bliver nu straks og efter 1 times inkubation ved 37 °C analyseret efter følgende testskema:

25

0,1 ml "inkubationsblanding"

0,1 ml phospholipid-kaolin-suspension inkuberet ved 37 °C i 1 minut

30

0,1 ml m/40 calciumchlorid.

Tidsrummet fra calciumchloridtilsætningen indtil koagulationsdannelsen måles med et stopur ligesom i virkningstesten.

35

3. Beregning af restaktivitet:

Analogt med beskrivelsen i virkningstesten bliver der nu lavet en justeringskurve med koagulationstiderne af de straks bestemte fortyndinger (ufortyndet prøve = 50 FEIBA-enheder/ml).

5 Aktiviteterne (FEIBA-enheder/ml) af de i 1 time inkuberede forskellige fortyndinger beregnes nu under anvendelse af justeringskurven og udtrykkes i procent af de forskellige aktiviteter af de ikke inkuberede fortyndinger. Middelværdierne af de således beregnede aktiviteter giver så den gennemsnitlige restaktivitet af prøven efter 1 times inkubation udtrykt i procent af udgangsaktiviteten før inkubation.

10

Resultaterne for de i eksemplerne 1 og 2 fremstillede præparater er angivet i tabellen side 19, nemlig 65% og 57%.

15

Bestemmelsen af restaktiviteten af faktor IX efter inkubation i faktor IX-mangelplasma gennemføres på følgende måde:

1. Reagenser:

20

Faktor IX-mangelplasma: citratplasma fra en patient med kraftig hæmofili B (faktor IX under 1%).

Phospholipid/kaolin -suspension: PTT-reagens (PTT = Partial Thromboplastin Time) fra Firma Immuno Diagnostica Ges.m.b.H. Til undersøgelsen blandes den nødvendige mængde faktor IX-mangelplasma med et tilsvarende volumen phospholipid/kaolin-suspension, hvorpå der inkuberes i 5 minutter ved 37°C og derpå i testperioden opbevares i et isbad.

25

30

Citrat-/kogsaltopløsning som fortyndingsmiddel for prøver:

7 g/liter trinatriumcitrat, 2H₂O, 7 g/liter natriumchlorid calciumchlorid m/20 (0,05 molær): opbevares ved 37°C i testperioden.

35

2. Test:

Af et til 50 faktor IX-enheder/ml indstillet præparat fremstilles syv geometriske fortyndinger (1 : 2, 1 : 4 etc. indtil 1 : 128) med citrat-/kogsaltopløsning. Af den ufortyndede prøve samt af de syv geometriske fortyndinger fremstilles der til enhver tid en 1 : 10-fortynding i faktor IX-mangelplasma (0,05 ml forfortyndet prøve + 0,45 ml faktor IX-mangelplasma).

Disse 1 : 10-fortyndinger i faktor IX-mangelplasma ("inkubationsblandinger") bliver nu straks og efter 1 times inkubation ved 37°C analyseret efter følgende testskema, hvorhos hver inkubationsblanding før bestemmelsen bliver fortyndet 1 : 10 med citrat-/kogsaltopløsning:

0,2 ml blanding af faktor IX-mangelplasma og phospholipid/kaolin
0,1 ml "inkubationsblanding", 1 : 10 fortyndet med citrat-/kogsaltopløsning, inkubation ved 37°C i 1 minut
0,1 ml m/20 calciumchlorid.

Tiden fra calciumchloridtilsætningen, til der sker koagulation, måles med et stopur.

3. Beregning af restaktivitet:

Med koagulationstiderne af de straks bestemte fortyndinger indstilles en justeringskurve (ufortyndet prøve = 50 faktor IX-enheder/ml), idet man afbilder koagulationstiderne mod de tilsvarende fortyndinger på dobbelt logaritmisk millimeterpapir. Aktiviteterne (faktor IX-enheder/ml) af de i 1 time inkuberede forskellige fortyndinger beregnes nu under anvendelse af justeringskurven og udtrykkes i procent af de pågældende aktiviteter af de ikke inkuberede fortyndinger. Middelværdierne af de således beregnede aktiviteter giver så den gennemsnitlige restaktivitet af prøven efter 1 times inkubation udtrykt i procent af udgangsaktiviteten før inkubation.

Immunologisk bestemmelse af inter- α -trypsin-inhibitorer (ITI)

1. Metode:

Bestemmelsen sker med Ouchterlony-teknikken, hvorved et specifikt antistof diffunderer mod en antigenholdig prøve i et agar-medium. Antigenet reagerer specifikt med antistoffet og danner et immunbundfaldsbånd, som vurderes som positiv reaktion.

2. Reagenser:

Antiserum mod ITI fra kaniner, Beringwerke AG, Marburg/Lahn, BRD

Agar: En opløsning af 1,25 g agar, 0,9 g natriumchlorid og 100 mg natriumazid i 100 ml vand koges op i kort tid, og den varme homogene opløsning udhældes som plader med en lagtykkelse på ca. 2 mm. Den afkølede størknede gel får derpå i en afstand på 5 mm udstanset ca. 2 mm store huller i to rækker.

Standard henholdsvis prøve:

Som justeringsstof tjener en protein-standardserum fra Beringwerke med et defineret indhold af ITI. Af denne referenceserum fremstilles en geometrisk fortyndingsrække i fysiologisk natriumchlorid-opløsning (9 g NaCl/liter).

Man går frem på tilsvarende måde med prøven, der skal undersøges.

3. Test:

I en hulrække i agaren anbringes fortyndingerne af justeringsstoffet henholdsvis prøven, der skal undersøges. I den ved siden af anbragte hulrække pipetteres det ufortyndede specifikke antiserum. Den således belagte agarplade inkuberes i 15 timer ved 37°C. Derpå sker aflæsningen af immunudfældningerne.

4. Beregning af ITI-koncentrationen:

5 Som målestok for ITI-koncentrationen af en prøve gælder sådanne
fortyndingstrin, hvor der netop endnu kan ses en udfældning
("Titer" af prøve). ITI-koncentrationen af prøven, der skal
undersøges, beregnes på følgende måde:

10
$$\frac{\text{titer af testprøve}}{\text{titer af standard}} \times \text{ITI-koncentration af standarden.}$$

ITI-koncentrationen angives i mg % (mg/100 ml).

15 De ifølge eksemplerne 1 og 2 fremstillede præparater havde efter
gennemførelse af de ovenfor beskrevne bestemmelsesmetoder føl-
gende karakteristiske værdier:

20 Kurverne på tegningernes fig. 1 og 2 svarer med hensyn til den
affinitetskromatografiske og elektroforetiske fraseparering til d
efterfølgende angivelser i eksempel 2.

25

30

35

FEIBA-præparat fremstillet ifølge

Eksempel 1 Eksempel 2

FEIBA-enheder/ml	26,0	24,2
Faktor II-enheder/ml	25,8	23,0
Faktor VII-enheder/ml	24,0	26,5
Faktor IX-enheder/ml	28,2	27,4
Faktor X-enheder/ml	24,1	22,1
Thrombogen aktivitet i Wessler-testen: fri for thrombogen virkning indtil en dosering af	10 FEIBA-E/kg	4 FEIBA-E/kg
Affinitetskromatografi på dextransulfat-sepharose F.IX-aktivitet elueret ved	0,14-0,49 m NaCl	0,13-0,50 m NaCl
Maksimal F.IX-aktivitet elueret ved	0,31 m NaCl	0,30 m NaCl
FEIB-aktivitet elueret ved	0,33-0,49 m NaCl	0,31-0,50 m NaCl
Maksimal FEIB-aktivitet elueret ved	0,41 m NaCl	0,40 m NaCl

Tablel forts.

FEIBA-præparat fremstillet ifølge	
Eksempel 1	Eksempel 2
Elektroforetisk fraseparering af protein med F.IX- og FEIB-aktivitet α-globulin, hovedspids α-globulin, skulder β-globulin	67% 16% 17% 70% 14% 16%
Kallikrein-aktivitet Prækallikrein-aktivator-aktivitet	0 0
% Restaktivitet FEIBA efter 1 time Inkubation i F.VIII-inhibitor-plasma	65% 57%
% Restaktivitet Faktor IX efter 1 time Inkubation i F.IX-mangelplasma	60% 55%
Inter-α-trypsininhibitor	0,6 mg/FEIBA-E 0,2 mg/FEIBA-E

SAMMENLIGNINGSFORSØG:

5 Frisk frosset plasma optøs ved 4°C, og kryobundfaldet frase-
pareres. Til kryosupernatanten blev tilsat 5 g/liter kaolin,
og omrøringen blev foretaget ved en naturlig pH-værdi på 7,8.
Derefter blev kaolinen frasepareret, og det genererede stof
med faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet blev sammen med
faktorerne II, VII, IX og X af prothrombinkomplekset adsorberet
på DEAE-sephadex.

10

Analogt som beskrevet i dansk patentansøgning nr. 3845/77,
eksempel 1, tilsættes derefter 0,5 g DEAE-sephadex A-50 pr.
liter kaolinsupernatant, og der omrøres 1/2 time ved +4°C.
DEAE-sephadex fraskilles. Den ovenstående plasma kan anvendes
15 til udvinding af γ -globulin og albumin. DEAE-sephadex underkas-
tes en dobbelt vask med en trinatriumcitrat-natriumchloridop-
løsning, idet der overholdes en pH-værdi på 7,5.

20

Med henblik på eluering omrøres DEAE-sephadex med 3% natrium-
chlorid, 0,1% trinatriumcitrat, 2H₂O (2% af det oprindelige
plasmamarumfang) i 20 minutter, og eluatet udvindes ved filtrer-
ing. Dette dialyseres natten over overfor 0,05% trinatrium-
citrat, 2H₂O, 0,1% natriumchloridopløsning ved pH 7,0 og ved
+4°C, fryses derefter og underkastes en første lyofilisering
25 (bulk). I bulk-materialet bestemmes FEIB-aktiviteten samt
aktiviteten af prothrombinkompleksets faktorer.

30

Efter bestemmelse af FEIBA-enhederne blev begge produkter un-
derkastet den thromboseinducerende aktivitetstest ifølge
Wessler, som beskrevet side 8 i den foreliggende tekst. I
hvert tilfælde blev to FEIBA-enheder pr. kg legemsvægt afprø-
vet på 3 kaniner, og der opnåedes følgende resultater:

35

FEIBA-præparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge dansk patentansøgning nr. 3845/77

5

{ 3 = to eller flere store thromber
 4 = en enkelt thrombus, som udfylder hele det isolerede venesegment
 1 = få makroskopisk synlige fibrinpartikler

FEIBA-præparat fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse

{ 0 = ingen koagulation
 0 = ingen koagulation
 0 = ingen koagulation.

10 Som det fremgår af disse forsøg, er den thrombogene aktivitet af præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse betydeligt mindre end af sammenligningspræparatet (ifølge patentansøgning nr. 3845/77).

15 Til sammenligning blev præparatet ifølge patentansøgning nr. 3845/77 også underkastet affinitetskromatografi på dextran-sulfatagarose. Den resulterende elueringskurve fremgår af fig. 1a. Her ses igen klart forskellen mellem forstadiepræparatet (sammenligningspræparatet) og præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. Således elueres 20 den maksimale faktor IX-aktivitet samtidig med den maksimale FEIB-aktivitet, når det drejer sig om forstadiepræparatet, mens den maksimale faktor IX-aktivitet i præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse 25 klart elueres før den maksimale FEIB-aktivitet. Det fremgår således tydeligt, at FEIBA-præparatet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse ikke blot adskiller sig fra sammenligningspræparatet, men også har signifikante fordele i forhold hertil takket være en reduktion i 30 uønskede thrombogene og vasoaktive bivirkninger.

P a t e n t k r a v .

35

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et blodkoagulationsfremmende præparat på basis af humanproteiner med et indhold af koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X og en faktor VIII-inhibitor-bypass-aktivitet, hvilket præparat

- er fri for thrombogen aktivitet indtil mindst to enheder FEIBA pr. kg kanin i den thromboseinducerende aktivitetstest ifølge Wessler,

5

- er fri for kallikrein-aktivitet og fri for prækallikrein-aktivator-aktivitet - målt i en vandig opløsning af præparatet med en FEIBA-koncentration indtil mindst 10 enheder pr. ml,

10

- affinitetskromatografisk på dextransulfat-agarose ved hjælp af en NaCl-gradient kan separeres således, at proteinet med faktor IX-aktivitet elueres ved lavere NaCl-koncentration end proteinet med FEIB-aktivitet,

15

k e n d e t e g n e t ved, at humanplasma bliver behandlet med sulfaterede højpolymere carbohydrater og/eller med basiske ionbyttere, og proteinblandingen med genereret FEIB-aktivitet bliver adsorberet, hvorpå det bliver udvundet ved eluering og koncentrering.

20

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at plasmaet først i kort tid bliver behandlet med sulfaterede højpolymere carbohydrater, hvorpå proteinblandingen med genereret FEIB-aktivitet bliver adsorberet på en ionbytter på dextran-

25

basis og umiddelbart derpå bliver elueret og koncentreret.

30

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at plasmaet bliver behandlet med en ionbytter på dextranbasis og efter mindst to timers indvirkning elueres den på ionbytteren adsorbere proteinblanding med genereret FEIB-aktivitet og derpå bliver koncentreret.

35

FIG. 1

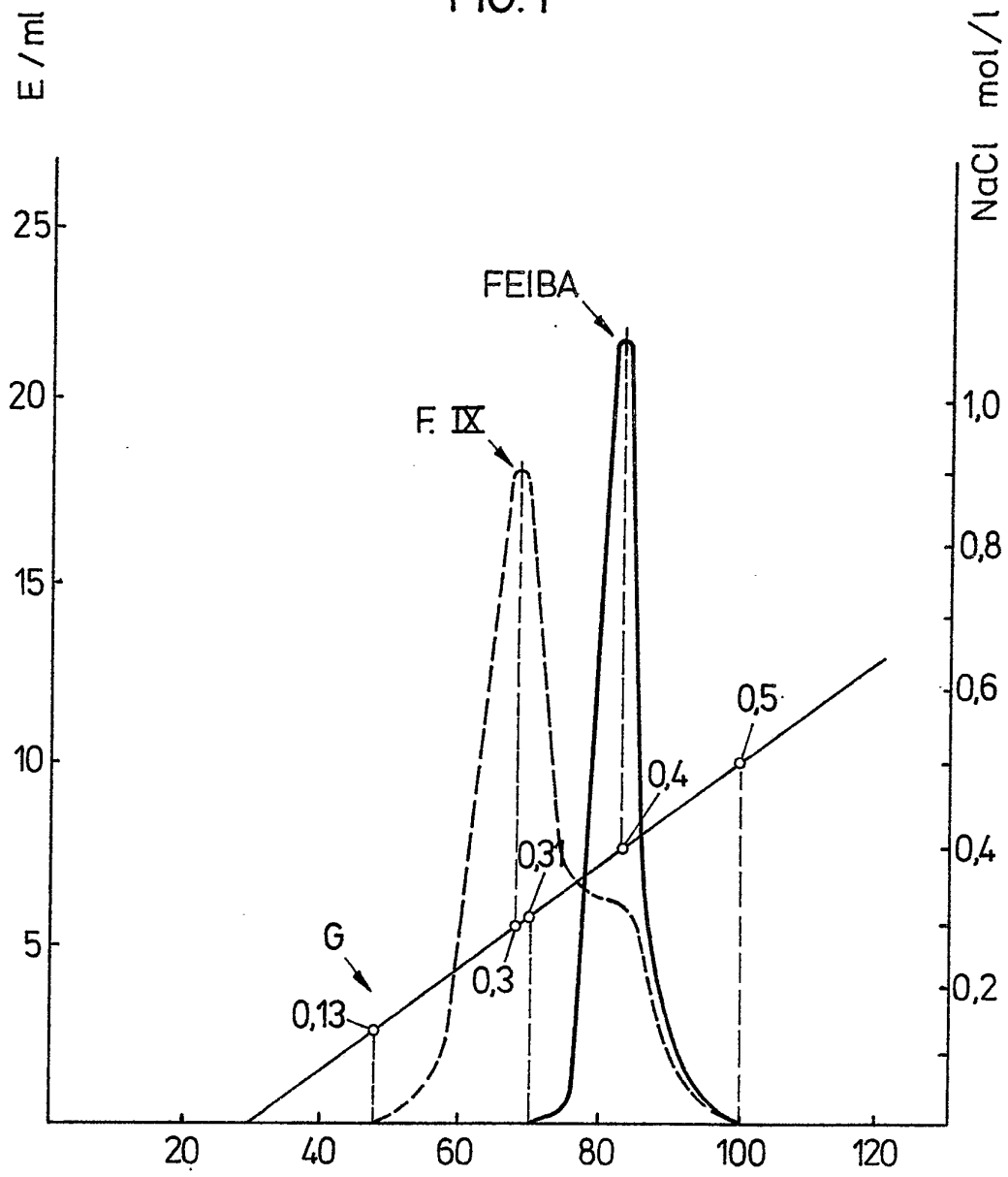


Fig. 1A

