

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **203508**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **358388**

(22) Data zgłoszenia: **04.04.2001**

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:  
**04.04.2001, PCT/EP01/03819**

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:  
**25.10.2001, WO01/79260**  
**PCT Gazette nr 43/01**

(51) Int.Cl.

**C07K 1/16 (2006.01)**

**C07K 14/745 (2006.01)**

**A61K 35/16 (2006.01)**

**A61P 7/02 (2006.01)**

(54) **Sposób uzyskiwania z frakcji osocza ludzkiego preparatu aktywnego hemostatycznie  
oraz preparat aktywny hemostatycznie otrzymany tym sposobem**

(30) Pierwszeństwo:

**18.04.2000,EP,00108430.0**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**09.08.2004 BUP 16/04**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.10.2009 WUP 10/09**

(73) Uprawniony z patentu:

**OCTAPHARMA AG,Lachen,CH**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**Djuro Josic,Wien,AT**

**Monika Stadler,Wienerherberg,AT**

**Gerhard Gruber,Wien,AT**

(74) Pełnomocnik:

**Kamiński Zbigniew, Rzecznik Patentowy,**

**KANCELARIA PATENTOWA, Kamiński i Syn**

**PL 203508 B1**

## Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy uzyskiwania z frakcji osocza ludzkiego preparatu aktywnego hemostatycznie oraz preparatu aktywnego hemostatycznie zawierającego vWF, otrzymany sposobem według wynalazku.

Choroba von Willebranda jest zaburzeniem koagulacji krwi, które przeciwnie niż hemofilia A lub B, objawia się krwawieniem w tkankach miękkich, zwłaszcza w błonie śluzowej. Jak stwierdzono, przyczyną tej choroby jest brak czynnika von Willebranda (vWF). Obecnie czynnik ten jest dostarczany pacjentom za pośrednictwem preparatów czynnika VIII, które zawierają również vWF. Jednakże często jakość podawanych preparatów jest niezadowalająca i ilość podawanego vWF jest zbyt niska. Chociaż znane są preparaty vWF uzyskanego sposobami inżynierii genetycznej, to jednak nadal istnieje pilna potrzeba opracowania wydajniejszych sposobów oczyszczania vWF z krwi lub osocza dawcy.

Z europejskiego opisu patentowego nr EP 0 934 748 znany jest vWF o wysokiej czystości, który zawiera przynajmniej 15% multimerów vWF, składających się z 13 lub więcej protomerów (multimery HMW-VWF). Wynik ten osiągnięto dzięki zastosowaniu wielostopniowego oczyszczania chromatograficznego, przy czym zamiast krioprecypitacji zastosowano sączenie molekularne w trybie wydzielania grupowego. Dezaktywację wirusów w preparacie vWF uzyskiwano, na przykład, przez zastosowanie rozpuszczalników i detergentów oraz obróbki cieplnej liofilizowanego preparatu przez 72 godziny w temperaturze 80°C.

W pracach Josica i współautorów, „Purification of factor VIII i vWF from human plasma by anion-exchange chromatography”, Journal of Chromatography B, 662 (1994) str. 181-190; oraz Schwinna i współautorów, „A Solvent/Detergent Treated, Pasteurized and Highly Purified Factor VIII Concentrate”, Arzneimittel-Forschung 1 Drug Research 44 (1), 2, 188-191 (1994) przedstawiono oczyszczanie kompleksów czynnika VIII/vWF, które realizowano na podłożach jonowymiennych oraz dezaktywację wirusów w dwóch, niezależnych od siebie, etapach. Rozpuszczalniki/detergent wprowadzano oraz pasteryzację (10 godzin w 63°C) prowadzono w obecności stabilizatorów. Mimo, że w wyniku pasteryzacji czynnik VIII niemal nie ulega denaturacji (95% aktywności resztkowej), to vWF zmienia się, zarówno pod względem aktywności, jak i typów uzyskanych multimerów (85% antygeny resztkowej), co więcej następuje znaczne zmniejszenie liczby multimerów o wysokiej masie cząsteczkowej, prowadząc do uzyskania preparatu o stosunku antygeny do aktywności vWF na poziomie 2,2 (stosunek aktywności do antygeny = 0,5).

Z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Am. Płn. nr US 5 714 590 znany jest sposób oczyszczania kompleksów czynnika VIII z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. W tym etapie oczyszczania chromatograficznego zastosowano złożę w kolumnie EMD-TMAE-Fractogel, użyte również w etapie sączenia molekularnego. Natomiast do dezaktywacji wirusów zastosowano rozpuszczalnik/detergent. W tym rozwiązaniu nie przedstawiono obróbki cieplnej preparatu. Otrzymany produkt zawiera dodatkowo vWF, przy czym stwierdzono tylko antygenowość vWF.

Celem wynalazku jest opracowanie takiego sposobu oczyszczania czynnika vWF z osocza ludzkiej krwi, który zapewni otrzymanie preparatu vWF o lepszej jakości i skuteczności.

Przedmiotem wynalazku jest sposób uzyskiwania z frakcji osocza ludzkiego preparatu aktywnego hemostatycznie, zawierającego czynnik von Willebranda, vWF, obejmujący etap, w którym:

- i) oczyszcza się chromatograficznie frakcję osocza zawierającą vWF, na podłożu anionowymyennym; zawierającym grupy anionowymienne na szczepionych strukturach polimerowych: materiały tentacle, zbierających frakcję zawierającą vWF, charakteryzujący się tym, że następnie
- ii) oczyszcza się uzyskaną frakcję stosując chromatografię wykluczenia wg wymiarów, SEC, uzyskując oczyszczony preparat stabilny termicznie, zawierający vWF, po czym
- iii) liofilizowany preparat ogrzewa się do temperatury wyższej niż 80°C dezaktywując wirusy.

Korzystnie uzyskuje się w analizie wykluczenia wg wymiarów HPLC tylko jeden pik zarówno dla preparatu stabilnego termicznie jak i preparatu ogrzewanego.

W korzystnym rozwiązaniu preparat ogrzewa się w temperaturze wyższej niż 90°C, korzystnie w temperaturze 100°C.

W innym korzystnym rozwiązaniu sposobu według wynalazku preparat ogrzewa się przez przynajmniej 1 do 5 godzin, korzystnie 2-3 godziny.

Korzystnie dodatkowo oczyszcza się frakcję stosując przynajmniej jeden etap adsorpcji i/lub chromatografii powinowactwa.

Korzystnie prowadzi się etap oczyszczania stosując SEC jako ostateczne oznaczenie wielkości oczyszczanego białka.

Zgodnie z korzystnym rozwiązaniem sposobu według wynalazku prowadzi się oczyszczanie frakcji z zebranego osocza ludzkiego.

W innej odmianie, przedmiotem wynalazku jest preparat aktywny hemostatycznie zawierający vWF, który jest otrzymany sposobem według wynalazku.

Korzystnie preparat jest wolny od zakażenia wirusami, zwłaszcza HIV, HBV, HCV, HAV i parwovirusami.

W korzystnym rozwiązaniu preparat zawiera vWF o wysokiej masie cząsteczkowej i wykazuje w analizie elektroforetycznej minimum 13 spośród 16 multimerycznych prążków.

Korzystnie stosunek aktywności vWF mierzonej jako aktywność kofaktora ristocetyny do oznaczenia antygenu vWF wynosi przynajmniej 0,8.

Preparat według wynalazku korzystnie zawiera ponadto czynnik VIII w postaci natywnej.

W kolejnym korzystnym rozwiązaniu preparat zawiera na poziomie niższym niż granica wykrywalności immunochemicznej: immunoglobuliny, fibrynogen, fibronektynę i inhibitor inter- $\alpha$ -trypsyny.

Korzystnie preparat według wynalazku zawiera vWF w postaci natywnej, wolnej od fragmentów.

Wśród korzystnych materiałów tentacle, które mogą być stosowane w sposobie według wynalazku można wymienić te przedstawione w europejskim opisie patentowym nr EP 0 337 144. Korzystne materiały tentacle obejmują polimery poliakryloamidowe szczepione na diolach Fractogel (dostarczane przez firmę Merck, Darmstadt, Niemcy).

Wynalazek został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia wykres stabilności produktu otrzymywanego sposobem według wynalazku w porównaniu do produktów oczyszczonych jedynie za pomocą chromatografii jonowymiennej.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że zawartość czynnika vWF w produkcie otrzymanym zgodnie ze sposobem według wynalazku jest bardzo duża, w porównaniu do poziomu czynnika VIII. Dzięki zastosowaniu etapu sączenia molekularnego (chromatografii wykluczenia wg wymiarów), sposób według wynalazku umożliwia usunięcie inhibitora inter- $\alpha$ -trypsyny, jak również innych czynników, które powodowały obniżenie jakości produktów otrzymywanych znanymi sposobami. Sekwencja etapów chromatograficznych według wynalazku zapewnia otrzymanie preparatów zawierających vWF o bardzo dużej stabilności. Frakcja zawierająca vWF, otrzymywana sposobem według wynalazku) okazała się nieoczekiwanie bardzo stabilna przy przechowywaniu w roztworach wodnych w temperaturze otoczenia przez dłuższy czas (pomiaru były realizowane w okresie do tygodnia). Ponadto, preparat według wynalazku zawiera vWF w formie natywnej, wolnej fragmentów.

Zgodnie ze sposobem według wynalazku, preparat stabilny termicznie może być ogrzewany. Dzięki temu uzyskuje się dezaktywację wirusów groźnych przy transfuzji krwi i preparatów kriopochodnych, zwłaszcza wirusów bez powłoki lipidowej, takich jak parwovirusy i wirusy wywołujące żółtaczkę typu A.

Niespodziewanie stwierdzono, że aktywność produktu otrzymanego sposobem według wynalazku zasadniczo nie ulega obniżeniu w wyniku zastosowanej obróbki termicznej,

Liczba multimerów i ich rozkład jest miarą podobieństwa vWF do natywnego vWF występującego w osoczu.

Zastosowanie kompleksów czynnika VIII i vWF do leczenia choroby Willebranda jest szczególnie wskazane.

Wynalazek został opisany bardziej szczegółowo w poniższych przykładach.

#### P r z y k ł a d y

Około 47 kg krioprecypitatu poddano działaniu 15% (udział masowy) 2% (udział masowy) roztworu wodorotlenku glinu. Po odwirowaniu próbkę poddano działaniu 0,3% TnBP /1% Triton X 100 w celu dezaktywacji wirusów. Po ekstrakcji olejowej próbkę poddano chromatografii anionowymiennej stosując jako podłoże Fractogel (żel tentacle dostarczony przez firmę Merck, Darmstadt, Niemcy).

Zastosowano następujące bufory:

Bufor AM, pierwszy etap płukania:

120 mM NaCl, 10 mM cytrynianu sodu, 120 mM glicyny, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9-7,1; osmolalność: 360-400 mosmol/kg.

Bufor BM, drugi etap płukania:

235 mM NaCl, 10 mM cytrynianu sodu, 120 mM glicyny, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9-7,1; osmolalność: 570-610 mosmol/kg.

Bufor CM, elucja:

700 mM NaCl, 10 mM cytrynianu sodu, 120 mM glicyny, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6,9-7,1; osmolalność: 1380-1480 mosmol/kg.

Bufor DM, trzeci etap płukania:

1,5 M NaCl.

Fracje wykazujące aktywność vWF/FVIII poddano chromatografii wykluczenia wg wymiarów, SEC, stosując jako złożę Fractogel EMD Bio SEC (dostarczony przez firmę Merck, Darmstadt, Niemcy). Po ultra-/diafiltracji, uzyskano preparat o następującym składzie: 400 mM NaCl, 10 mM cytrynian sodu, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 133 mM glicyna, 1% sacharoza.

Następnie w celu sterylizacji preparatu przeprowadzono sączenie. Preparat umieszczono w fiolkach i poddano liofilizacji, a następnie ogrzewaniu w temperaturze 100°C przez 120 min.

Na fig. 1 wykazano stabilność produktu otrzymanego sposobem według wynalazku w porównaniu do produktów oczyszczanych jedynie za pomocą chromatografii jonowymiennej. Otrzymany w wyniku chromatografii jonowymiennej, produkt według wynalazku został poddany chromatografii wykluczenia wg wymiarów, SEC. Stwierdzono ponadto, że produkt według wynalazku, nawet przy przechowywaniu przez 7 dni w temperaturze pokojowej, w roztworze wodnym bez heparyny, lub w obecności heparyny, zachowuje 80% swej aktywności, podczas gdy produkty niepoddane SEC, zachowują po tym samym czasie tylko 20% wyjściowej aktywności.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób uzyskiwania z frakcji osocza ludzkiego preparatu aktywnego hemostatycznie, zawierającego czynnik von Willebranda, vWF, obejmujący etapy, w których:

i) oczyszcza się chromatograficznie frakcję osocza zawierającą vWF, na podłożu anionowym wymiennym zawierającym grupy anionowymienne na szczepionych strukturach polimerowych: materiały tencel, zbierające frakcję zawierającą vWF, **znamienny tym**, że

ii) oczyszcza się uzyskaną frakcję stosując chromatografię wykluczenia wg wymiarów, SEC, uzyskując oczyszczony preparat stabilny termicznie, zawierający vWF, po czym

iii) liofilizowany preparat ogrzewa się do temperatury wyższej niż 80°C dezaktywując wirusy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że uzyskuje się w analizie wykluczenia wg wymiarów HPLC tylko jeden pik zarówno dla preparatu stabilnego termicznie jak i preparatu ogrzewanego.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że preparat ogrzewa się w temperaturze wyższej niż 90°C, korzystnie w temperaturze 100°C.

4. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że preparat ogrzewa się przez przynajmniej 1 do 5 godzin, korzystnie 2-3 godziny.

5. Sposób według zastrz. 1 do 4, **znamienny tym**, że dodatkowo oczyszcza się frakcję stosując przynajmniej jeden etap adsorpcji i/lub chromatografii powinowactwa.

6. Sposób według zastrz. 1 do 5, **znamienny tym**, że prowadzi się etap oczyszczania stosując SEC jako ostateczne oznaczenie wielkości oczyszczanego białka.

7. Sposób według zastrz. 1 do 6, **znamienny tym**, że prowadzi się oczyszczanie reakcji z zebranego osocza ludzkiego.

8. Preparat aktywny hemostatycznie zawierający vWF, **znamienny tym**, że jest (trzymany sposobem określonym w zastrz. 1-7.

9. Preparat według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jest wolny od zakażenia wirusami, zwłaszcza HIV, HBV, HCV, HAV i parwowirusami.

10. Preparat według zastrz. 8 albo 9, **znamienny tym**, że zawiera vWF i wysokiej masie cząsteczkowej i wykazuje w analizie elektroforetycznej minimum 3 spośród 16 multimerycznych prążków.

11. Preparat według zastrz. 8 do 10, **znamienny tym**, że stosunek aktywności vWF mierzonej jako aktywność kofaktora ristocetyny do oznaczenia antygeny vWF wynosi przynajmniej 0,8.

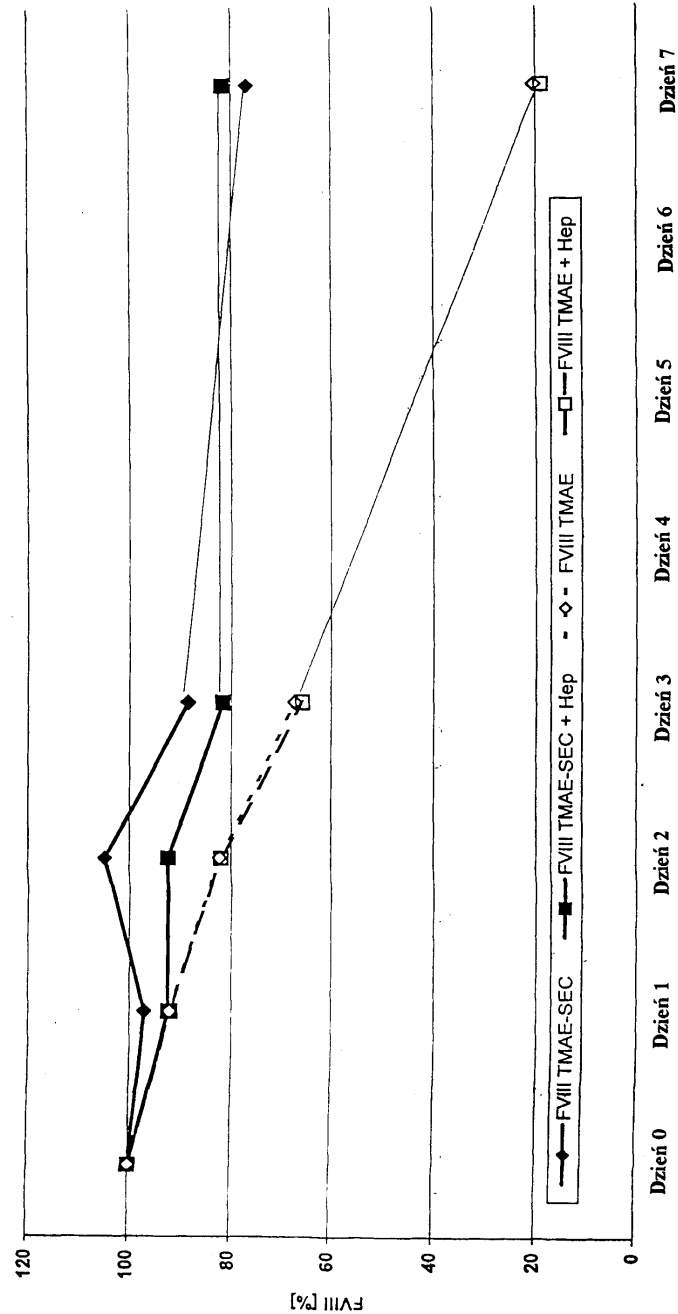
12. Preparat według zastrz. 8 do 11, **znamienny tym**, że zawiera ponadto czynnik VIII w postaci natywnej.

13. Preparat według zastrz. 8 do 12, **znamienny tym**, że zawiera na poziomie niższym niż granica wykrywalności immunochemicznej: immunoglobuliny, fibrynogen, bronektynę i inhibitor inter- $\alpha$ -trypsyny.

14. Preparat według zastrz. 8 do 13, **znamienny tym**, że zawiera vWF w postaci natywnej, wolnej od fragmentów.

Rysunek

Porównanie koncentratów VIII: F VIII TMAE i F VIII TMAE-SEC  
Przechowywanie w torebkach infuzyjnych w temperaturze pokojowej  
+/- Heparyna; FVIII: C chromogeniczny



Koncentraty FVIII zostały rozcieńczone odpowiednio w Aqua-ad-inj i w Aqua-ad-inj<sup>ym</sup> zawierającej 5 IU Heparyny/ml. Próbkę po umieszczeniu w torebkach infuzyjnych były przechowywane w temperaturze pokojowej. W oznaczonych punktach czasu z torebek pobrano próbki, które poddano badaniom na aktywność F VIII (chromogeniczny). Regeneracja wyrażona jest w procentach aktywności początkowej.

