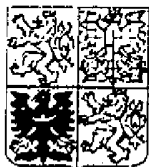


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.06.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/19623293**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. čl. ⁶:

C 07 K 14/755
A 61 K 38/37

(71) Přihlášovatel:

BIOTEST PHARMA GMBH, Dreieich, DE;

(72) Původce:

Bucci Enzo Dr., Cittaducale, IT;

Kotitschke Ronald Dr., Dreieich, DE;

Rudnick Dieter Dr., Dreieich, DE;

Dichtelmuller Herbert Dr., Sulzbach/Ts.,
DE;

Kloft Michael Dr., Darmstadt, DE;

Loebnau Wolfgang, Mainhausen, DE;

Ott Günter, Rodgau, DE;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

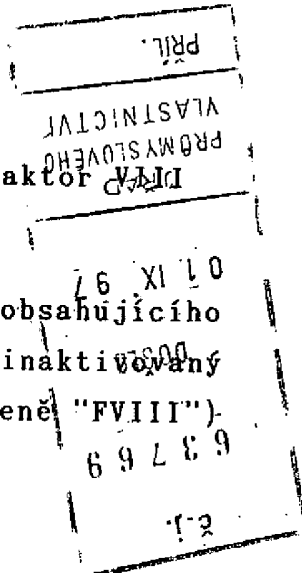
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby produktů obsahujících ne-
imunogenní faktor VIII**

(57) Anotace:

Způsob výroby produktů obsahujících neimu-
nogenní faktor VIII z krevní plasmy lidí, při
kterém /a/ se podrobují roztok obsahující
faktor VIII zpracování systémem tri/n-
butyl/fosfát/detergent, /b/ tepelně se zpra-
covává vymrazením vysušený produkt obsa-
hujícího FVIII při teplotě 100°C po dobu 15 až
120 minut, obsahující FVIII, vykazuje po te-
pelném zpracování zbytkovou vlhkost
hmotnostně 0,3 až 1,8 %.

1774-97



Způsob výroby produktů obsahujících neimunogenní faktor VIII

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby produktu obsahujícího obzvláště vysoce vyčištěný dvojnásobně vůči virům inaktivovaný faktor VIII (krev čistící faktor VIII, zkráceně "FVIII") z lidské krevní plasmy.

Dosavadní stav techniky

Ze stavu techniky jsou známy postupy k výrobě vysoce čistých, vůči virům inaktivovaných produktů FVIII, které se izolují z lidské krevní plasmy. Například evropský patentový spis číslo EP 0 367 840 popisuje výrobu produktu FVIII s použitím iontoměničů k čištění FVIII. K inaktivaci vůči virům se zpracovává roztok FVIII biologicky kompatibilními systémy organické rozpouštědlo/detergent. Německý patentový spis číslo DE 42 04 694 popisuje iontoměniče s různými význaky, kterých se používá k čištění FVIII. Evropský patentový spis číslo EP 0 337 144 popisuje dělicí materiály k frakcionaci biopolymerů, kterých je možno použít při afinitní nebo iontoměničové chromatografii. Evropský patentový spis číslo EP 0 567448 popisuje kombinaci opatření chromatografického čištění, zpracování FVIII tensidy ve vodném roztoku a tepelného zpracování preparátů FVIII v pevném stavu. Tepelné zpracování používá horké páry v přítomnosti methanolu nebo etanolu za odvádění určitých hmotových poměrů. Světový patentový spis číslo WO 93/15105 popisuje výrobu FVIII z kryoprecipitátu za použití aniontoměničů. Evropský patentový spis číslo EP 0 399 321 popisuje výrobu koncentrátu FVIII vysrážením FVIII polyethylenglykolem (PEG) v přítomnosti sacharosy (koncentrát FVIII 1,2 až 0,6 g/ml). Patentový spis FBE 0.383.645 popisuje výrobu koncentrátu FVIII oddělováním FVIII od Willebrandova faktoru. Evropský patentový spis číslo EP 0 412 466 popisuje výrobu FVIII s vysokou specifickou aktivitou, který se přídatně pasterizuje. Americký patentový spis číslo 5, 099 022 popisuje zahřívání vymrazením

vysušených koncentrátů sražené krve ke snížení infekčnosti případných virů. Světový patentový spis číslo WO 94/17 834 popisuje inaktivaci virů zpracováním zdroje alkylfosfáty, současně nebo postupně při teplotách 55 až 67 °C po dobu 5 až 30 hodin. Evropský patentový spis číslo EP 0 18 561 popisuje přípravu srážecích faktorů ohřevem na teplotu 60 až 70 °C v přítomnosti gycinu a sacharidového roztoku. Evropský patentový spis číslo EP 0 094 611 popisuje sloučeninu obohacenou FVIII k výrobě léčiva, která se ve vymrazení vysušeném stavu zahřívá na teplotu 60 až 125 °C, se specifickou aktivitou vyšší než 300 jednotek FVIII na gram proteinu.

V časopise Hemophilia World 1995, sv. 2, č. 3 jsou v příloze k tomuto sešitu souhrnně uvedeny koncentráty FVIII a FIX, které jsou ve Spojených státech amerických v současné době na trhu pod názvem "Clotting Factor Concentrates, USA 1995". Z této publikace jsou převzaty údaje v tabulce I o způsobech inaktivace virů, kterými se tyto produkty ošetřují a jsou doplněny o evropské produkty a výrobce.

Tabulka I

Koncentráty faktoru VIII (obchodní produkty 1995)

č. Obch. název	Výrobce	Inaktivace viru	Specif.aktivita bez koneč. obs. albuminu
1 Haemate	Behringswerke	60 °C, 10h, tekut. + stabilizátor	-- 1-2
2 Beriate P	Behringswerke	60 °C, 10h, tekut. + stabilizátor	-- přibl.100
3 Profilate HAT Alpha		SD; 80 °C, 72(GT)	-- 5-15
4 Koate	Milles/Cutter	SD	-- 10-20
5 Octavi SD Plus	Octapharm a	SD; 63 °C, 10h, tekut. + stabilizátor	-- přibl.100
6 Emoclot	Aima	SD; 100 °C, 30 min	-- přibl.100

Tabulka I (pokračování)

č.	Obch. název	Výrobce	Inaktivace viru	Specif.aktivita bez koneč. obs. albuminu
7	Haemoctin SDH	Biotest Pharama	SD; 100 °C, 30 min	-- přibl.100
8	Immunate	Immuno AG	60 °C, 10 h, pára	-- 10
9	Alpanate	Alpha	SD	-- 20-30
10	Hemofil M	Baxter	SD	>500 2-10
11	Monoclata	Armour	60 °C, 10 h, tekut. + stabilizátor	>500 2-10
12	Octanativ	Kabi	SD	>500 přibl.20

SD = systém rozpouštědlo/detergent

GT = sušeno vymrazováním

Koncentráty FVIII uvedené v tabulce I byly vyvinuty v posledních deseti letech (Kasper C.K., Lusher J.M. a Transfusion Practices Committee of the American Association of Blood Banks "Recent evolution of clotting factor concentrates for hemophilia A and B". Transfusion 1993, 33, str. 422 až 4334). Nejdůležitějším cílem při vývoji těchto produktů bylo zlepšení jejich bezpečnosti z hlediska přenosu virů. Tohoto cíle bylo dosaženo zlepšením skrínování dárcovské krve a použitím nových technik k inaktivaci virů a vyčištění FVIII.

V konci 70. let a na začátku 80. let byly vyvinuty dva nejdůležitější způsoby inaktivace virů pro koncentráty FVIII. Jeden způsob spočívá v tepelném zpracování roztoku FVIII v přítomnosti stabilizátorů. Druhý způsob popisuje použití alkylfosfátů. V roce 1979 bylo v evropském patentovém spise číslo EP O 018 561 popsáno zahřívání roztoku FVIII v přítomnosti

cukrů (40 až 60 %) a aminokyselin (1 až 2,5 mol/l). Zahřívání proteinů v roztocích v přítomnosti cukrů bylo rozšířeno přísadou solí obsahujících ionty vápníku (EP O 106 269). Metoda inaktivace virů v proteinových roztocích byla doplněna variantami uvedených zveřejnění, jako evropský patentový spis číslo EP O 035 204, kde byla teplota 60 °C rozšířena na až 75 °C a byla použita koncentrace cukrů 30 % až do nasycení. Zahřívání proteinových frakcí ve stavu vysušeném -vymrazením, obsahujících FVIII, je popsáno v evropském patentovém spise číslo EP O 171 506. Rozsah teplot je 60 až 125 °C. Zpracování plasmových frakcí obsahujících FVIII párou už bylo uvedeno shora.

Zpracování frakcí plasmy obsahující FVIII kombinací alkylfosfátu a detergentu je známo z evropského patentového spisu číslo EP O 131 740. Tento postup se jako účinný osvědčil zejména při inaktivaci obalených virů (Horowitz M.S. a kol., Lancet 2, str. 186 až 189, 1988, Horowitz B., Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus. 56, str. 83 až 96, 1989, Horowitz B, Transfusion 25, str. 616 až 522, 1985). Tento způsob inaktivace virů (způsob Solvent-Detergent SD) není však v zásadě schopen inaktivovat viry bez obálky virů obsahující lipid.

Jelikož není možno vyloučit nebezpečí přenosu iniciátorů infekcí při výrobě léčiv z plasmy lidské krve skrínováním dárcovské plasmy, má být toto nebezpečí dále sníženo použitím postupů inaktivace virů. Směrnice k inaktivaci obalených virů se stala obzvlášť potřebnou, když se v letech 1932/1933 v souvislosti s koncentrátem FVIII, zpracovaným metodou SD, objevily zprávy o přibližně 100 případech infekce hepatitis A (Lancet 340, str. 123, 1992, Lancet 341 str. 179 1933, Ann. Intern. Med. 1994, MMWR sv. 45, č. 2, str. 29 až 32 1996). Tyto případy hepatitidy A vedly k postupnému plánu německých úřadů (Pharm. Ind. 4, str. 71 až 72, 1993).

Vedle nebezpečí přenosu iniciátorů infekcí produkty FVIII je vznik inhibitorů FVIII (protilátek FVIII) ústředním problé-

mem substituční terapie hemofilie A. Protilátky vznikají u 3 až 52 % pacientů s těžkou hemofilií A, které jsou vysvětlitelné řadou proměnných (De Biasi R. a kol., *Thrombosis Haemostasis* 72, str. 544 až 547, 1994, Ehrenforth S. a kol., *Lancet* 338, str. 594 až 598, 1992, Scharrer I. a kol., *Blood Coag Fibrinol* 4, str. 753 až 758, 1993, McMillan V.W. a kol., *Blood* 71, str. 344 až 348, 1988). Takové proměnné se týkají věku pacientů, četnosti ošetření a typu preparátu FVIII (Addiego H.E. a kol., *Thromb. Haemost.* 67, str. 19 až 27, 1993 Burnouf F. a kol., *Vox.Sang.* 60, str. 8 až 15 1991, Peerlinck K. a kol., *Thromb. Haemost.* 69, str. 115 až 118, 1993, Rodendaal F.R. a kol., *Blood*, 81, str. 2180 až 2186, 1993, Sultan Y., *Thromb., Haemost.* 67, str. 600 až 602, 1992, Peerlinck K, a kol., *Blood* 81, str. 3332 až 3335, 1993, Guérois C, a kol. *Thrombos Haemostas* 73, str. 215 až 218, 1995).

Rozdíly v imunitní odezvě pacientů nebo jejich genetické předpoklady mohly incidenci inhibitorů ovlivnit. (Roberts HR, *Blood Coag a Fibrinol* 2 (1), str. 21 až 23, 1991, Hoyer L, *Brit. J. of Haematology* 90, str. 498 až 501, 1995).

Dále se ukázalo, že různé genové mutace FVIII korelují ke vzniku protilátek (Schwaab R, a kol., *Thrombosis and Haemostasis* 74,(6), str. 1402 až 1406, 1995).

Proměnné, které ovlivňují incidenci inhibitoru FVIII jsou:

1. pacient: genetická vada, charakteristické imunologické reakce, imunitní stav,
2. ošetřování: produkt FVIII, počet exposic,
3. posouzení: dozor a citlivost dozorčích metod.

I když není v současné době jednoznačné přiřazení jediné příčiny pro vznik protilátek FVIII s inhibičními vlastnostmi, ukazují výsledky jednotlivých studií význam, který připadá preparátům FVIII při indukci inhibitorů FVIII (Vermylen I,

a kol., Acta Clinica Belgica 46, str. 20, 1991).

Dříve často ošetřovaní pacienti hemofilie A (PTP = hemofiliiaci s dřívější několikanásobnou transfusí) byli od května 1990 do září 1991 ošetřováni novým koncentrátem FVIII. Tento produkt byl vyčištěn chromatografií na skle a pasteurizován. Ze 47 pacientů, kteří byli ošetřováni výhradně tímto produktem, vyvinuli 4 vysoce titrované inhibitory (40, 90, 100 a 200 jednotek Bethesda (BU)). Další pacient (20BU) byl v podstatě také ošetřován tímto produktem FVIII. Používání tohoto produktu bylo na základě těchto nálezů ukončeno.

Výroba vysoce vyčištěného koncentrátu FVIII z velkých zásob plasmy se specifickou aktivitou 100 předpokládá, že musejí být splněny četné požadavky na výrobní postup pro takový koncentrát FVIII.

Působení opatření inaktivizujících viry na strukturu proteinů je jednou z ústředních otázek, obzvláště k problematice inhibitorů. Nejpodstatnější biologická funkce FVIII, jeho aktivita, měla vykazovat v koncentrátu FVIII, kterého bylo použito k ošetřování hemofilie, přibližně stejný poměr k proteinu FVIII, FVIII-Ag jako v mediu, plasmě, ze které je izolován.

Koncentrát FVIII, který se získává z plasmy po vyčištění, měl vedle FVIII obsahovat v podstatě ještě jeho přirozený nosný protein z Willebrandova faktoru (vWF). Jelikož cílem snah je vyčištění FVIII z plasmy, jeho oddělení od ostatních proteinů plasmy, mělo se použití proteinů plasmy jako stabilizátoru zabránit, jelikož předcházející snahy o vyčištění se stanou zbytečnými. Podle toho měl hemofilik dostat jen ten protein, který on potřeboval. Vyčištěný FVIII z plasmy sestává ze směsi polypeptidů s molekulovými hmotnostmi 80 až 210 kDa, které představují řadu podjednotek série heterodimerů (Kaufmann R, Transfusion Medicine Reviews 4, str. 235 až 246, 1992).

Úkolem vynálezu tedy je poskytnout nový způsob vyčištění a inaktivace virů výchozích materiálů, které obsahují faktor VIII, v podstatě bez použití stabilizátorů.

Podstata vynálezu

Způsob výroby produktů obsahující neimunogenní faktor VIII, v y z n a č u j í s e t í m, že

(a) se podrobuje roztok obsahující faktor VIII zpracování systémem tri(n-butyl)fosfát/detergent,

(b) tepelně se zpracovává vymrazením vysušený produkt obsahující FVIII při teplotě 100 °C po dobu 15 až 120 minut, s výhodou 30 minut, přičemž vymrazením vysušený produkt, obsahující FVIII, vykazuje po tepelném zpracování zbytkovou vlhkost hmotnostně 0,3 až 1,8%.

Způsob výroby neimmunogenně působícího vysoce vyčištěného koncentrátu FVIII z lidské plasmy sestává z použití dvou různých způsobů inaktivace virů. Tato dvojitá inaktivace virů zahrnuje, jak shora uvedeno, zpracování roztoku FVIII systémem tri(n-butyl)fosfát ("TNBP")/polyoxyethylenový derivát sorbitanového esteru (Tween^R) (SD: system solvent/detergent = rozpouštědlo/detergent s výhodou hmotnostně 0,2 až 0,5 % TNBP/0,5 až 3 % Tween^R a tepelné zpracování vymrazením vysušeného konečného produktu FVIII v konečném objemu při 100 °C po dobu 30 minut, při konečné vlhkosti hmotnostně přibližně 0,3 až 1,8%. K tomu přistupují s výhodou kroky zbavující viru při výrobě.

Koncentrát FVIII, vyrobený podle vynálezu z lidské plasmy, je v dalším textu označován jako "FVIII SDH" (SDH = Solvent/Detergent/Hitze). FVIII SDH se vyrábí s výhodou z kryoprecipitátu jakožto výchozího materiálu, který se získá ze zásoby plasmy známými metodami. V kryoprecipitátu jsou obsaženy téměř všechny plasmové proteiny, některé oproti plasmě v obohacené formě, zejména FVIII a fibrinogen.

Podle výhodného provedení zahrnuje způsob FVIII SDH následující výrobní operace:

- (1) Oddělení fibrinogenu a případně odstranění ostatních srážecích činitelů komplexu PPSB probíhá například vysrážením ethanolom a/nebo adsorpcí na $Al(OH)_3$.
- (2) Inaktivace viru surové frakce FVIII probíhá s výhodou se systémem TNBP/Tween^R80.
- (3) Specifická sloupcová chromatografie na iontoměničích k odstranění TNBP a Tween^R80 i k oddělení zbylých plasmových proteinů.
- (4) S výhodou dia-nebo ultra-filtrace eluátu, nastavení elektrolytů na požadovanou koncentraci.
- (5) Po sterilní filtraci následuje konečné plnění do skleněných lahví ponořených do tekutého dusíku (přibližně $-195\text{ }^{\circ}C$), čímž se roztok FVIII šokově zmrazí.
- (6) Sušení výmrazováním zmrazeného roztoku FVIII probíhá ve vysokém vakuu a vede se až do zbytkové vlhkosti konečného produktu přibližně 0,3 až 1,8 %.
- (7) Vymrazením vysušený produkt se zahřívá v autoklávu 30 minut na teplotu $100\text{ }^{\circ}C$.

Produkt vyrobený podle vynálezu nepůsobí imunogenně a je oproti výchozí plasmě obohacen například 10^4 -násobně, obzvláště použitím chromatografického čištění.

Kroky přípravy FVIII zbavující viru a čištění z lidské plasmy za použití způsobu podle vynálezu k výrobě neimunogenně působícího koncentrátu FVIII jsou uvedeny v tabulce II. Pro jednotlivé relevantní obalené a neobalené viry jsou inaktivační míry pro každou výrobní operaci koncentrátu FVIII udány v logaritmech o základu 10.

Tabulka II

Zbavování viru a jeho inaktivace pro neimunogenně působící FVIII z plasmy (redukce viru:log 10)

Virus	Neutra- lizace	Krok/zpracování				100 °C 30 min	celkový redukční faktor
		Kryo- precip.	Al(OH) ₃	TNBP Tween	Chroma- tograf		
HIV-1		1,3	0,4	>6,4	1,9	>6,6	>16,2
PSR		3,2	1,1	>6,8	1,1	>4,6	>16,8
VSV		1,5	0,5	>4,7	0,6	>5,8	>11,9
BVDV		1,2	n.t.	>6,8*	1,1	>6,6	>15,7
Sinb.		n.t.***	3,5	>4,5	1,0	n.t.	>9,0
Polio		n.t.	5,0	n.t.	2,2	5,0	12,2
Parvo**			1,3	0,5	2,4	1,4	5,1
Reo			1,6	n.t.		>6,0	>7,6
HAV	4,4			4,1		>5,3	>13,8

* HCV:>4,5 log₁₀ (šimpansí studie)

** hovězí parvovirus

*** netestováno

Koncentrát FVIII, vyrobený způsobem podle vynálezu z lidské plasmy, obsahuje FVIII například v množství 10 000-krát obohaceném oproti plasmě. Prokazatelná koncentrace jednotlivých proteinů na 1000 IE FVIII SDH (IE = mezinárodní jednotky) je v tabulce III uvedena v porovnání s koncentrací proteinů vyskytující se v jednom litru plasmy.

Tabulka III

Koncentrace proteinů v plasmě a FVIII SDH (průměrné hodnoty)

Protein	Koncentrace v plasmě (mg/l)	FVIII SDH (mg/1000 IE)	Způsob
FVIII	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2	1
Celk.množ.proteinu	65000	10	2
vWF	18	6	1
fibrinogen	3000	3,5	3
fibronektin	30	0,3	3
albumin	44000	0,03	3
IgG	12000	0,5	3
IgM	1400	0,2	3
IgA	2100	<0,01	3

1 = Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay)

2 = Bradford (autor metody) (Bradford MM: Analytical Biochemistry 72, str. 248 až 254, 1976)

3 = RID (Radiální imunodifuse)

Z tohoto znázornění koncentračních údajů proteinů, prokazatelných v FVIII SDH, lze vyčíst, že například 96 % prokazatelného množství proteinu sestává z FVIII vWF a nikoli z koagulovatelných fibrinogenů. Fibrinogen se vyskytuje jako nesrážlivý fibrinogen, tedy stanovení fibrinogenů podle Clause poskytuje záporný výsledek (Claus A., Acta Haemat 17, str. 237 až 246, 1957).

Metody používané k výrobě koncentrátů FVIII a k inaktivaci případně eliminaci virů, nacházejících se v krevní plasmě, mají možná vliv na strukturu a biologické působení proteinů. Základním předpokladem pro použitelnost produktů FVIII je, že se před použitím po přidání rozpouštědla - normálně je to voda vhodná pro klinické použití (aqua ad injectabilia) - beze zbytku rozpustí. Denaturované proteiny jsou ve vodě v podstatě ne-

rozpuštěné. Struktura a biologická aktivita produktu FVIII, vyrobeného podle vynálezu, zůstává zachována, pokud je vyroben způsobem podle vynálezu, neboť pouze při těchto podmínkách se koncentrát FVIII i po ohřevu až 2 hodiny na 100 °C vodou aqua ad injectabilia beze zbytku rozpouští.

Rozhodujícím předpokladem pro to, aby byl FVIII SDH podle vynálezu schopen tříhodinového ohřevu na 100 °C bez denaturace a přesto byl beze zbytku ve vodě rozpustný a aniž se do vysušovacího pufru vymrazováním musí přidávat stabilizátor v podobě proteinů nebo cukrů, je šokové zmrazení roztoku FVIII v tekutém dusíku při teplotě - 195 °C před sušením vymrazováním. Koncentrát FVIII, vyrobený podle vynálezu, FVIII SDH s převedením ve své biologické struktury a biologické aktivitě nemění a denaturace proteinů ohřevem nenastává.

K přezkoušení účinku výrobního postupu podle vynálezu na strukturu proteinů byla provedena řada fyzikálních a biologických testů (Kotitschke R. a kol., Hämostaseologie 14, str. 100 až 103, 1994, Arrighi S. a kol., Thromb Haemost 74 (3), str. 868 až 873, 1995). Zejména se zkoušelo působení tepelného zpracování na proteiny za podmínek výrobního způsobu podle vynálezu, jelikož FVIII je jak známo extrémně stálý při skladování a citlivý na tepelné zpracování.

Obvykle vyžaduje tepelné zpracování roztoku FVIII stabilizaci FVIII přísadou určitých stabilizátorů. Tepelné zpracování FVIII ve stavu vysušeném vymrazováním bez patrné ztráty aktivity je dále známo pouze u produktů FVIII, jejichž specifická aktivita po výrobě z plasmy je velmi nízká (například < 20), nebo kterým je nutno přidávat stabilizátory ve formě proteinů nebo cukrů (tabulka I).

Produkt FVIII SDH podle vynálezu lze s překvapením bez patrné ztráty aktivity přechovávat při teplotě 100 °C až dvě

hodiny, pokud obsah zbytkové vlhkosti nepřesahuje přibližně 1,8 % a teplota zmrazení před sušením vymrazováním je pod -195 °C. Z uvedených údajů vyplývá, že zahřátý a nezahřátý produkt FVIII při zkouškách struktury a aktivity vykazoval identické výsledky (obr. 2 a tabulka IV).

Tabulka IV

Haemocitin (R) SDH:FVIIIIC/FVIIIAG

Ošetření	FVIIIIC (x10)	FVIIIAG (x10)	FVIIIIC/FVIIIAG (/10)
Kryo	0,98	1,66	5,9
Al(OH) ₃	0,79	1,38	5,7
TNBP/Tween	0,59	1,01	5,8
S.-Eluat	3,18	4,68	6,8
ZP (UF/DF)	5,79	8,55	6,8
GT	5,57	6,95	8
SDH	5,25	6,8	7,7
Kryo	1,29	1,3	9,9
Al(OH) ₃	0,99	1,01	9,8
TNBP/Tween	0,67	0,7	9,6
S.-Eluat	4,46	5	8,9
ZP (UF/DF)	6,31	6,45	9,7
GT	6,25	5,9	10,5
SDH	5,55	5,7	9,7
Kryo	0,98	0,98	10
Al(OH) ₃	0,81	0,73	11
TNBP/Tween	0,61	0,67	9,1
S.-Eluat	3,8	4,34	8,8
ZP (UF/DF)	6,2	6,38	9,7
GT	5,78	5,7	10,1
SDH	5,52	5,3	10,4

Vynález blíže objasňují připojené obrázky:

Seznam obrázků

Na obr.1 je schematicky naznačena výroba FVIII SDH ve výhodném provedení.

Na obr.2 je znázorněn poměr FVIIIIV/FVIIIag v různých výrobních operacích tří šarží FVIII SDH.

Na obr. 3 je seznam ošetřovacích center hemofilie.

Pro obr. 2 platí, že šarže (a) se odlišuje od šarží (b) a (c) zřetelně sníženým poměrem výchozího produktu výroby kryo-FVIII. Aby bylo možno znázornit v tomto grafu sloupce pro jednotlivé parametry v přibližně porovnatelné velikosti, byly jednotlivé parametry 10 x znásobeny nebo 10 x děleny. Poměr musí být v tomto znázornění dělen 10, aby se poznalo, že pro šarže (b) a (c) v každé výrobní operaci je tento poměr blízký jednotce =1,0. Kryo-šarže a vykazuje poměr přibližně 0,6, což je důkazem ztracené aktivity FVIII při výrobě a skladování této kryo-šarže. Výrobní postup k vysoce vyčištěnému koncentrátu FVIII zvedá poměr na 0,8, avšak nikoli na 1,0. Při této studii je však rozhodující porovnání poměru zahřátých a nezahřátých vzorků. Tyto poměry pro oba produkty jsou přibližně stejné a tím je potvrzena poměrně nepatrná ztráta aktivity způsobená tepelným zpracováním.

Účinek výrobního postupu na strukturu proteinů je přezkoušen pomocí rozdělení molekulové hmotnosti a pomocí elektroforézy gelu SDS-polyakrylamidu (PAGE). Dodatečně se nezahřátý produkt (FVIII SD) a zahřátý produkt (FVIII SDH) přezkušoval na vznik neoantigenů (R. Kotitschke s kol., Hämostaseologie 14, str. 100 až 103, 1994, S.Arighi a kol., Thromb Haemost 73 (3), str. 868 až 873, 1995). Výsledkem těchto zkoušek je identita FVIII SD a FVIII SDH, čímž je prokázáno, že v koncentrátu FVIII, vyrobeném podle vynálezu, zůstává struktura proteinů nezměněná.

Obr. 3 ukazuje sledování FVIII SDH při použití. Sledování se započalo v roce 1993 na sedmi sledovacích centrech pro hemofilii A. Do sledování bylo zahrnuto 51 pacientů s nejdelsí dobou sledování 27 měsíců. V Maďarsku byli před rokem 1993 téměř všichni pacienti trpící hemofilií A ošetřováni kryoprecipitátem a/nebo pouze koncentrátem FVIII. Proto bylo možno přezkoušet incidenci inhibitoru na poměrně homogenní skupině pacientů po ošetření FVIII SDH a porovnat incidenci inhibitoru této skupiny (skupiny I) se skupinou v Německu (skupina II), která byla v ošetrovacích centrech pro hemofilii A předem ošetřována různými koncentráty FVIII. U žádného z 51 pacientů se inhibitor nevyskytl. Pacienti byli vyšetřováni v období 4 až 26 měsíců, převážná většina v období 12 měsíců. Maximální počet kumulativních ošetrovacích dnů obnášel 349. Ošetrovací den zahrnuje množství FVIII, kterého bylo použito k ošetření jedné příhody krvácení.

"Odezvy", "in vivo recovery" a poločas se určovaly 1-hodinovým testem FVIII a chromogenním substrátem (u 16 pacientů) - pro porovnání slouží tabulka V. Tyto údaje odpovídají údajům publikovaným různými autory v minulosti pro pd koncentráty FVIII (pd = plasma derived = vyrobených z plasmy).

Tabulka V

FVIII SDH: Biologické poločasy a in vivo zotavení u 16 pacientů trpících hemofilií A

1-stupňový test chromogenní substrát		
in vivo zotavení %	71 ± 15	77 ± 17
odezva (%)	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,4
Poločas	13,0 ± 2,8	12,7 ± 3,2

Vynález blíže objasňují, nijak však neomezují, následující příklady praktického provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Výroba FVIII z plasmy člověka, který není imunogenní po substituci na pacientech.

Dárcovská plasma: Devět dílů dárcovy krve se přidá do jednoho dílu 3,8% stabilizačního natriumcitrátového roztoku. Ihned po odběru se krev odstředí a dárci se znova infundují (plasmaferese) erytrocyty rozmělněné ve fyziologickém solném roztoku. Plasma se zmrazí nejpozději do 18 hodin.

Plasma se nechá roztát při teplotě + 2 °C až + 4 °C. Plasma od většího počtu dárců se smísí. Kryovysrážení (kryoprecipitát) se získá známým způsobem odstředěním.

Suspenduje se 1 kg kryoprecipitátu získaného z přibližně 100 l plasmy ve 3 kg směsi voda/ethanol (10 g ethanolu na 1 litr vody) obsahující 900 mezinárodních jednotek heparinu.

Hodnota pH suspence se nastaví za míchání 0,1M kyselinou octovou na 7,0. Směs se zahřeje na teplotu místnosti a míchá se 30 minut. Do takto získaného roztoku se přidá 108 g suspence 2% hydroxidu hlinitého na kilogram nasazeného kryo a míchá se 15 minut při teplotě místnosti. Přísadou 0,1M kyseliny octové se hodnota pH nastaví na 6,55 a teplota se sníží na 15 °C. Sraženina se odstředí a vyhodí.

K virové inaktivaci se zbytek zpracuje směsí tri-(n-butylfosfátu (TNBP) (hmotnostně 0,3%) a Tweenu^R80 (hmotnostně 1%). Na 1 kilogram roztoku FVIII se spotřebuje 10,52 g Tweenu^R

80 a 3,16 ml TNBP. Tween^R80 se rozředí 4 ml destilované vody. Hodnota pH se nastaví 1M roztokem hydroxidu sodného na 7,1 a roztok se předejde na teplotu 25 °C. Směs TNBP a Tween^R80 se přidá za míchání v průběhu 15 minut. Roztok FVIII smíšený se systémem TNBP/Tween^R80 se míchá 13 hodin při teplotě přibližně 25 °C. Roztok FVIII se pak podrobí chromatografii na iontoměničovém gelu. Sloupec se vyváží před vnesením proteínového roztoku pufrům o hodnotě pH 6,95 sestávajícím z NaCl (0,12M), citrátu sodného (0,01 M), glycinu (0,12 M) a chloridu vápenatého (0,001M). Extinkce sloupcového eluátu se měří při 280 nm. Sterilizovaný roztok FVIII se nanese na vyvážený gel a dodatečně se promyje vyvažovacím pufrům až do dosažení UV-signálu základní čáry. K odstranění doprovodných proteinů se sloupec promyje pufrům zvýšené iontové síly sestávajícím z chloridu sodného (0,16M), z citrátu sodného (0,01 M), z glycinu (0,12M) a z chloridu vápenatého (0,001M) při hodnotě pH 6,95.

Eluování FVIII se provede následujícím elučním pufrům: 0,25M chloridu sodného, 0,01M citrátu sodného, 0,12M glycinu, 0,001M chloridu vápenatého při hodnotě pH 6,95. Chromatografický eluát obsahující FVIII se zkoncentruje ultrafiltrací na přibližně polovinu objemu nasazeného eluátu a zředí se pufrům, sestávajícím z 0,01M citrátu sodného, z 0,12M glycinu, z 0,001M chloridu vápenatého až na aktivitu FVIII roztoku přibližně 110 mezinárodních jednotek FVIII na mililitr. Roztok FVIII se sterilizuje a plní se do skleněných lahviček na 10 ml konečného obsahu (20 ml-skleněné lahvičky). Skleněné lahvičky, naplněné roztokem FVIII se ponoří do tekutého dusíku o teplotě -195 °C a nato se vysuší vymrazováním na zbytkovou vlhkost produktu FVIII 0,5%.

Lahvičky s vymrazením vysušeným produktem se umístí do autoklávu a 30 minut se udržují na teplotě 100 °C. Teplota se měří přístrojem "Datatrace Micropack" firmy Hero Instruments

Electronic Vertriebs GmbH, Německo. Hned po vyjmutí lahviček z autoklávu se lahvičky přenesou do chladničky (s teplotou přibližně + 4 °C) k ochlazení. Aktivita FVIII zahřátého vzorku obnáší 95 % nezahřátého vzorku.

Příklad 2

Stejným způsobem jako podle příkladu 1 se vyrobí a rozpustí 1 kg kryoprecipitátu. Zpracování kryoprecipitátu až do ultrafiltrace se provede stejně jako v příkladu 1. Ke zředění FVIII-zkoncentrovaného eluátového sloupcového chromatografického roztoku se použije pufru sestávajícího z 0,01M citrátu sodného, z 0,12M glycinu, z 0,01M chloridu vápenatého až do aktivity FVIII 50 mezinárodních jednotek FVIII na ml. Roztok FVIII se sterilizuje a plní se do skleněných lahviček po 10 ml konečného obsahu (20 ml-skleněné lahvičky). Zmrazení těchto lahviček i vysušení vymrazováním a tepelné zpracování se provádějí stejně jako podle příkladu 1.

Průmyslová využitelnost

Neimunogenní FVIII obsahující produkt pro výrobu léčiv

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby produktů obsahujících neimunogenní faktor VIII, v y z n a č u j í s e t í m, že
 - (a) se podrobuje roztok obsahující faktor VIII zpracování systémem tri(n-butyl)fosfát/detergent,
 - (b) tepelně se zpracovává vymrazením vysušený produkt obsahujícího FVIII při teplotě 100 °C po dobu 15 až 120 minut, s výhodou 30 minut, přičemž vymrazením vysušený produkt, obsahující FVIII, vykazuje po tepelném zpracování zbytkovou vlhkost hmotnostně 0,3 až 1,8 %.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í s e t í m, že se roztok, obsahující faktor VIII, před sušením vymrazováním šokově ochladí na teplotu pod -190 °C.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í s e t í m, že se jako detergentu používá polyoxyethylenového derivátu sorbitanového esteru.

4. Způsob podle nároku 1 až 3, v y z n a č u j í s e t í m, že se před stupněm (a) odstraňují fibrinogen a popřípadě další faktory srážlivosti komplexu PPSB vysrážením ethanolem a/nebo adsorpcí na hydroxidu hlinitém z roztoku obsahujícího FVIII.

5. Způsob podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í s e t í m, že se po stupni (a) odstraňují tri(n-butyl)fosfát a detergent ionexovou chromatografií z roztoku obsahujícího FVIII.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í s e t í m, že se roztok, obsahující FVIII jakožto eluát ionexové chromatografie diafiltruje a/nebo ultrafiltruje.

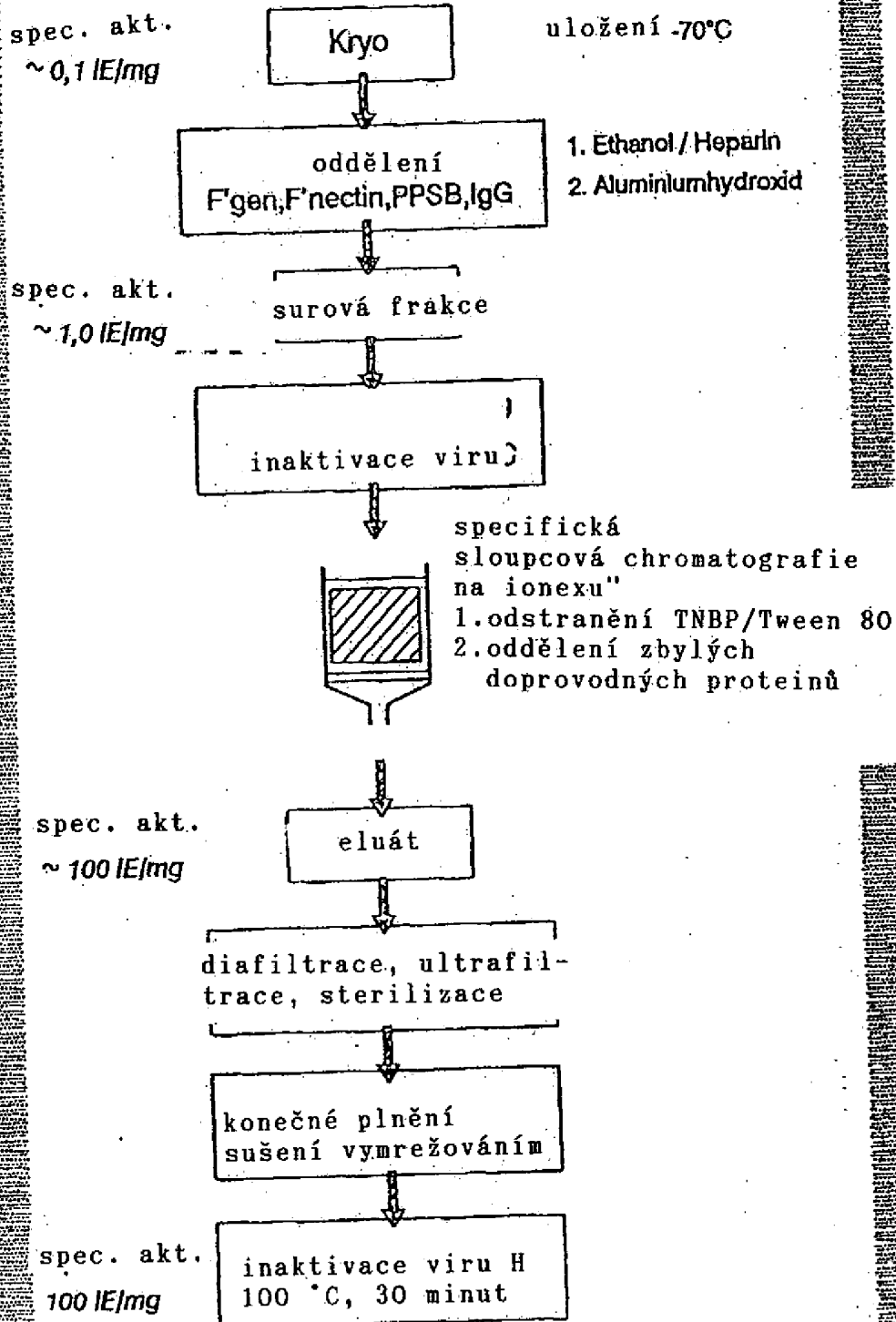
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í s e t í m, že se roztok, obsahující FVIII, po diafiltraci a/nebo ultra-

filtraci sterilizuje.

8. Způsob podle nároku 1 až 7, v y z n a č u j í s e t í m, že se tepelné zpracování provádí v autoklávu.

9. Neimunogenní FVIII obsahující produkt připravitelný způsobem podle nároku 1 až 8.

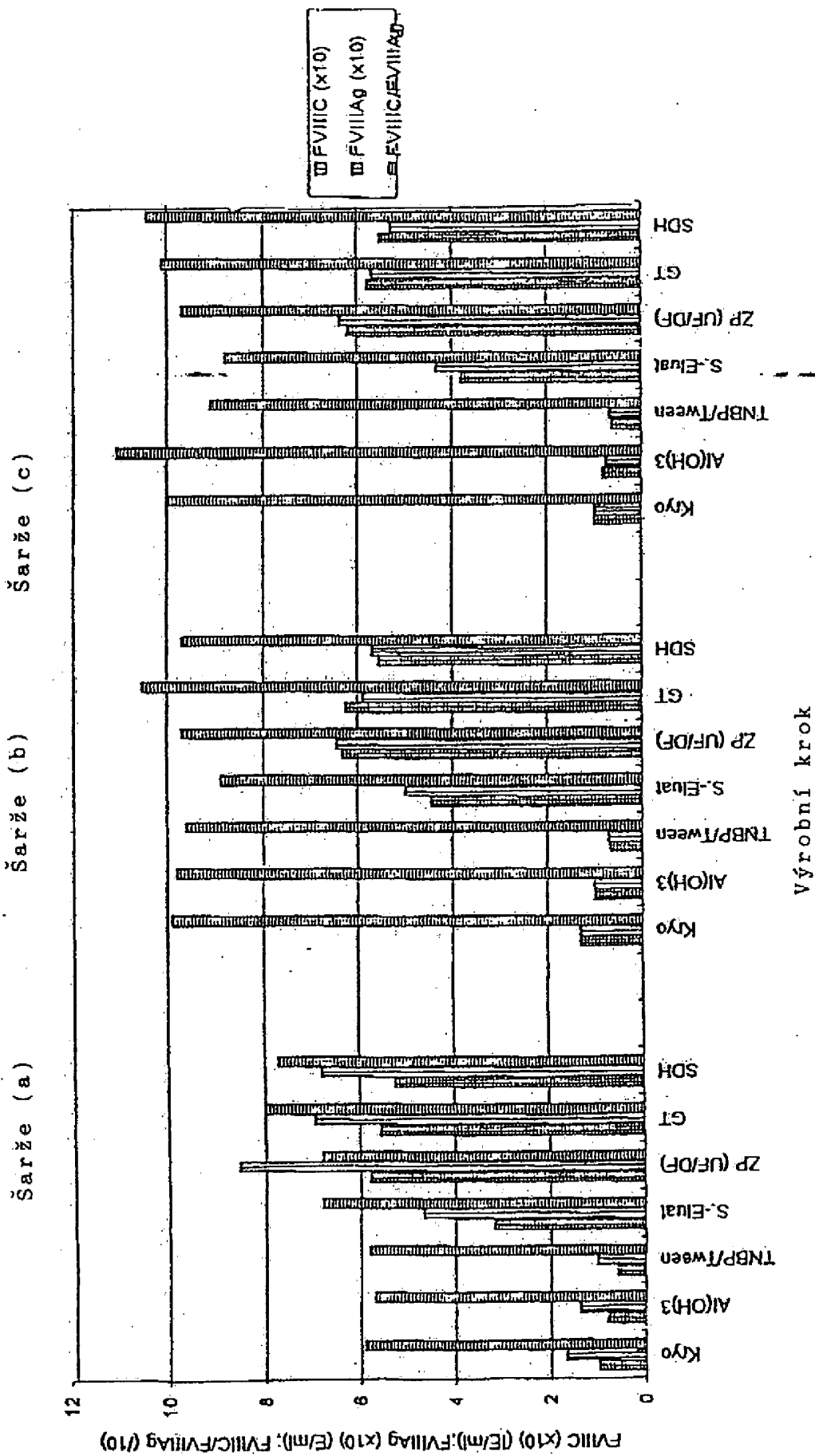
F VIII SDH Výrobní schéma ema



1777 17

FVIII SDH: FVIIIIC/FVIIIAG

OBR. 2



Výrobní krok

DBR. 3

Skupina nemocných	Klinika	Místo	Počet nemocných	Začátek pozorování
I	Heim Pál (HP) Nat. Inst. Hematologie (OV) Krevní transfúze (DB)	Budapest Budapest Debrecen	14 9 14	červen 94 červenec 94 květen 94
II	Charité (B) Friedrichshain (KF) Universita (MS) Universita	Berlin Berlin Frankfurt/Main Münster	1 3 7 7	září. 94 únor 94 září 94 říjen 93