



F10000937968

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****93796****(15) Patentti myönnetty
Patent meddelat 12 06 1995****(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6****A 61K 35/16, A 61L 2/04****SUOMI-FINLAND****(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	903575
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.07.90
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.01.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	13.07.90
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.95
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/DK89/00003
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
15.01.88 DK 182/88 P	

(71) Hakija - Sökande**1. Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Danmark, (DK)****(72) Keksijä - Uppfinnare****1. Kihl, Jesper, Porsevaenget 21, 2800 Lyngby, Danmark, (DK)
2. Myrup, Allan, Muldvad 11, 2800 Lyngby, Danmark, (DK)
3. Nordfang, Ole, Selskovvej 6, 3400 Hilleroed, Danmark, (DK)****(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab****(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning****Menetelmä tekijän VIII:n vesiliuosten pastöroimiseksi
Förfarande för pastörisering av vattenlösningar av faktor VIII****(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer**

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmässä tekijä VIII:n vesiliuosten pastöroimiseksi liuos kuumennetaan 55-65°C:n lämpötilaan 5-15 tunnin ajaksi sakkaridin tai sokerialkoholien sekä 1-4, mieluiten 1,5-2,5 KY hepariinia/g valmistusta liuosta ollessa läsnä. Hepariinilla on stabiloiva vaikutus, jolloin tekijä VIII:n degradoituminen vähenee tai sitä rajoitetaan.

I ett förfarande för pastörisering av vattenlösningar av faktor VIII upphetas lösningen till en temperatur av 55-65°C för 5-15 timmar i närvaro av en sackarid eller en sockeralkohol och 1-4, företrädesvis 1,5-2,5 IU heparin/g färdig lösning. Heparinet har en stabiliserande effekt, varvid degradering av faktoren VIII avvikas eller begränsas.

Menetelmä tekijä VIII:n vesiliuosten pastöroimiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää hyytymistekijä VIII:n, erityisesti ihmisen tekijä VIII:n vesiliuosten pastöroimiseksi. Keksinnön tavoitteena on poistaa tai inaktivoida tarttuva virus, joka saattaa olla läsnä tekijä VIII:n sisältävissä valmisteissa. Keksinnön erityistavoitteena on suorittaa tekijä VIII:n vesiliuosten lämpökäsittely olosuhteissa, joissa kaikki virukset inaktivoituvat varmasti, samalla kun saadaan terapeuttisen ihmisen hyytymistekijä VIII-proteiinin suuri saanto.

Ihmisen hyytymistekijä VIII (tästäedes tekijä VIII), jota myös kutsutaan antihemofiiliseksi tekijäksi (AHF), on osa veren hyytymisjärjestelmää. Tekijä VIII:n tulee olla läsnä, jotta hyytyminen tapahtuu. Henkilöt, joilta puuttuu kokonaan tai osaksi kyky syntetisoida tekijä VIII:aa, sairastavat A-hemofilia nimistä tautia, joka on synnynnäinen sairaus. Taudille ovat tunnusomaisia usein toistuvat verenvuodot, erityisesti niveliin ja lihaksiin.

Sen vuoksi on välttämätöntä antaa henkilöille, joilta puuttuu tekijä VIII, tekijä VIII:n sisältäviä valmisteita. Tällainen A-hemofiliapotilaiden korvaushoito aloitettiin Euroopassa vuonna 1965. Tämän korvaushoidon tuloksena A-hemofiliapotilaiden keskimääräinen elinaika on huomattavasti pidentynyt. Niinpä A-hemofiliapotilaiden keskimääräinen elinikä on Ruotsissa pidentynyt vuoden 1948 noin 16 vuodesta noin 56 vuoteen vuonna 1978. Lisäksi korvaushoito on vähentänyt vammauttavien verenvuotojen lukumäärää A-hemofiliapotilailla ja siten parantanut potilaiden kykyä ansaita elantonsa ja parantanut heidän elinolosuhteitaan.

Valmisteita, jotka sisältävät tekijä VIII:n, valmistetaan ihmisverestä tai veriplasmasta. Tätä varten tunnetaan erilaisia valmistusmenetelmiä. Kaikissa niissä lähtöprosessi on samanlainen. Luovuttajan veri lasketaan pussiin, joka

sisältää koaguloitumisen estoainetta. Koaguloitumisen estoa-
aine voi olla sitraatti-fosfaatti-dekstroosia (CPD), happo-
sitraatti-dekstroosia (ACD) tai hepariinia. Veren plasma
erotetaan muista komponenteista sentrifugoimalla. Tämä
erottaminen voi tapahtua luovuttajalta verta otettaessa
niin kutsutulla plasmafereesillä. Veriplasma varastoidaan
jäädytettynä. Jäätynyt veriplasma sulatetaan ja suoritetaan
niin sanottu kylmäsaostus. Saatava kylmäsakka sisältää te-
kijä VIII:n ja muodostaa lähtökohdan myöhemmälle valmistuk-
selle.

Tämä voidaan suorittaa tunnettuun tapaan käyttämällä saos-
tusmenetelmiä epäsuotavan proteiiniaineen poistamiseksi.
Tämän proteiinimateriaalin saostaminen voi tapahtua esimer-
kiksi lisäämällä etanolia (Mattock et al, EP-patenttihak-
emus n:o 0062456, 1982), polyetyleeniglykolia (Sarno et al,
EP-patenttihakemus n:o 0221556, 1987) tai glysiiniä (Mitra
et al, EP-patenttihakemus n:o 0126789, 1984). Muita tunnet-
tuja menetelmiä epäsuotavan proteiiniaineen poistamiseksi
liuoksista, jotka sisältävät tekijä VIII:n, on kromatograa-
fisten menetelmien käyttö (esimerkiksi kuten Chavin et al
kuvaavat EP-patenttihakemuksessa n:o 0104356, 1984).

Lisäksi tiedetään, että veriplasman, joka on valmistettu
käyttämällä hepariinia antikoagulanttina, niin sanotun he-
parinisoidun veriplasman käyttäminen voi lisätä tekijä
VIII:n saantoa kylmäsakassa (Rock et al, EP-patenttihakemus
n:o 0053046, 1982). Hepariini on sulfatoitujen polysakkari-
dien ryhmä, jonka molekyylipaino on 5000-40000, tavallises-
ti 15000-25000, ja sillä on hyytymistä estävä vaikutus ve-
riplasmassa. Vaikka hepariini voi lisätä tekijä VIII:n
saantoa, hepariinia ei käytetä laajalti antikoagulanttina,
koska se estää veren monien muiden komponenttien käytön te-
rapeuttisiin tarkoituksiin.

Hepariinilla on hyytymistä estävä vaikutus veressä tai ve-
riplasmassa. Hepariini sinänsä osaksi estää trombiinin muo-
dostumisen, osaksi se toimii katalyyttinä trombiini-anti-

trombiini III -kompleksin muodostuksessa. Trombiini on eräs proteiini, joka pystyy pilkkomaan tekijä VIII-molekyylin. Tekijä VIII on tärkeä hyytymistekijä veren hyytymisjärjestelmässä. Tekijä VIII:n aktivoituminen aiheuttaa tekijä VIII-molekyylin pilkkoutumisen. Tämä aktivoituminen voi tapahtua aktivoidun tekijä X:n, aktivoidun proteiini C:n tai trombiinin avulla, joista viimeksi mainittu on tärkein. Hepariniin lisääminen vaikuttaa siis luonnolliseen hyytymisjärjestelmään ja stabiloi siten tekijä VIII:n.

Hepariini ei vaikuta vapaiden kalsiumionien pitoisuuteen veressä tai veriplasmassa, joka sisältää tekijä VIII:n. Tämä on päinvastoin kuin sitraatti- tai sitraattia sisältävissä antikoagulanteissa, kuten sitraatti-fosfaatti-dekstroosissa (CPD), joissa läsnäoleva sitraatti toimii kelaatin muodostajana ja muodostaa kompleksin kalsiumin kanssa. Koska kalsiumin läsnäolo on tärkeä tekijä VIII:n stabiiliuden kannalta, hepariniin käyttäminen antikoagulanttina saattaa olla väline parannettaessa tekijä VIII:n stabiiliutta.

Tekijä VIII:n stabiiloiminen hepariinilla heparinisoidussa veriplasmassa tapahtuu siis osaksi estämällä trombiinin muodostuminen, mikä huonontaa tekijä VIII:aa, ja osaksi muuttamatta kalsiumionien läsnäoloa.

Tekijä VIII:n sisältäviä valmisteita voidaan valmistaa hepariiniveriplasmasta korkealla tekijä VIII-aktiivisuussaanolla kylmäsakassa (Smit-Sibinga et al, Lancet, ii, 449, 1981). Syynä tähän on osaksi se, että hepariini stabiloi tekijä VIII:n plasmassa, osaksi se, että hepariini lisää tekijä VIII:n saostumista kylmäsaostuksessa.

Jotta kylmäsakkaan saataisiin suurempi tekijä VIII:n saanto, on tärkeää, että hepariini lisätään plasmaan verta luovuttajalta otettaessa. Hepariniin lisääminen myöhemmin sitraattia sisältävällä antikoagulantilla valmistettuun veriplasmaan ei lisää tekijä VIII:n saantoa kylmäsakassa (Mikaelsson et al, Blood, Vol. 62, N:o 5, 1983, s. 1006). Sama-

ten hepariinin lisääminen tekijä VIII:n sisältävien valmisteiden valmistusvaiheessa kylmäsakan uudelleenliuottamisen jälkeen tai sen aikana ei paranna tekijä VIII:n saantoa. Siten hepariinin vaikutus riippuu sen lisäämisestä verta luovuttajalta otettaessa. Toisaalta sekä hepariinin että kalsiumin lisääminen sitraattia sisältävään veriplasmaan tai fraktioihin saattaa lisätä tekijä VIII:n saantoa.

Vakava ongelma ihmisen verestä tai veriplasmasta valmistettujen valmisteiden tai fraktioiden terapeuttisessa käytössä on se, että veri tai veriplasma saattaa sisältää tarttuvan viruksen. Esimerkkejä tällaisista tarttuvista viruksista ovat hepatiitti B-virus, hepatiitti non-A, non-B-virus ja ihmisen immuunikatovirus. Tarttuvan viruksen siirtyminen on tunnettua ei ainoastaan tekijä VIII:n sisältäviä valmisteita käytettäessä, vaan myös yleensä ihmisen verestä tai veriplasmasta valmistettuja valmisteita käytettäessä. Esimerkkejä tällaisista valmisteista ovat hyytymisekijä IX, hyytymistekijä XIII, immunoglobuliini, antitrombiini III.

Tarttuvan viruksen poistamiseksi ihmisen verestä tai veriplasmasta valmistetuista terapeuttisista valmisteista tai niitä sisältävistä liuoksista tunnetaan useita erilaisia menetelmiä. Eräässä tällaisessa tunnetussa menetelmässä terapeuttista proteiinia sisältäviä vesiliuoksia kuumennetaan 10 tuntia 60°C:ssa, jolloin estetään varmasti tarttuvan viruksen siirtyminen näitä plasman proteiineja sisältäviä valmisteita käytettäessä. Jottei vesiliuoksessa oleva terapeuttisesti aktiivinen proteiini pääse denaturoitumaan tai sille tapahdu muuta vahinkoa, on kuitenkin välttämätöntä lisätä stabilointiaineita lämpökäsittelyn aikana.

Rasvahappojen suoloja tai aminohappoa lisätäänkin stabilointiaineiksi, kun ihmisen albumiini- tai proteiini-konsentraattia sisältäviä liuoksia lämpökäsitellään 10 tuntia 60°C:ssa (Gellis et al, J. Clin. Invest., 27, 239, 1948). Tämän menetelmän käyttämisen ihmisen albumiini- tai proteiini-konsentraatin käsittelyyn seurauksena tarttuvia

viruksia ei ole siirtynyt näitä valmisteita käytettäessä tämän menetelmän vuonna 1948 tapahtuneen käyttöönoton jälkeen. Tässä menetelmässä ei tapahdu tai tapahtuu vain merkityksetöntä terapeuttisen plasman albumiini-proteiinin hävikkiä.

Liuoksia, jotka sisältävät plasminogeeniä, voidaan stabiloida lyysiini-aminohapolla, kun niitä lämpökäsitellään 60°C:ssa 10 tunnin ajan (Baumgarten et al, US-patentti n:o 3227626, 1966). Tämän patentin mukaan tämä menetelmä tuhoaa läsnä olevan hepatiittiviruksen.

Liuokset, jotka sisältävät hyytymistekijä XIII:a, voidaan kuumentaa 60°C:een 10 tunnin ajaksi aminohapon, monosakkaridin tai sokerialkoholin läsnäollessa (Fukushima, patentti n:o Sho 51-134878, 1976). Noin 50 %:n hävikki tekijä XIII-aktiivisuudessa on raportoitu tämän menetelmän yhteydessä.

Edelleen liuoksia, jotka sisältävät proteinaasin estäjän antitrombiini III:n, voidaan stabiloida sitruunahapon suoloilla ennen niiden kuumentamista 10 tuntia 60°C:ssa (Holleman et al, Thromb. & Haemo., 38, 201, 1977). Terapeuttisen proteiinin antitrombiini III:n hävikki on tässä menetelmässä noin 30 %.

Tekijä VIII:n stabiloimiseksi lämpökäsittelyllä tunnetaan erilaisia menetelmiä.

Erästä menetelmää, jossa tekijä VIII stabiloidaan kuumentamalla 10 tuntia 60°C:ssa jonkin polyolin kanssa, on kuvattu (US-patentti n:o 4440679, 1984). Tässä menetelmässä lisätään esimerkiksi sakkaroosia, valinnaisesti yhdessä glysiini-aminohapon kanssa, sellaisena määränä, että liuos sisältää lisäyksen jälkeen 62 paino-% sakkaroosia tai se on kylästynyt sakkaroosilla.

Erästä samantapaista menetelmää tekijä VIII:n stabiloimiseksi samalla tavoin lämpökäsittelemällä 10 tuntia 60°C:ssa

käyttämällä sokerialkoholia tai disakkaridia on kuvattu (EP-patenttihakemus n:o 0117064, 1984). Tässä menetelmässä lisätään esimerkiksi 66 paino-% sakkaroosia tai sorbitolia stabilointiaineeksi lämpökäsittelyn ajaksi.

Tunnetaan eräs menetelmä, jossa käytetään joko jonkin neutraalin aminohapon, sakkaridin tai sokerialkoholin ja jonkin karboksyylihapon, joka sisältää 3-10 hiiliatomia, suolan yhdistelmää, tekijä VIII:n stabiloimiseksi lämpökäsittelyllä 60°C:ssa 10 tunnin ajan (EP-patenttihakemus n:o 0077879, 1983). Ihmisen albumiinia voidaan lisätä lisästabilointiaineeksi. Tässä menetelmässä lisätään esimerkiksi 25 paino-% glysiiniä ja 20 paino-% natriumkaprylaattia stabilointiaineeksi.

Edelleen tunnetaan eräs menetelmä tekijä VIII:n lämpökäsittelyksi 10 tuntia 60°C:ssa samalla vähentäen kontaminoivan fibrinogeenin pitoisuutta (DE-Offenlegungsschrift n:o 2916711, 1980). Stabilointiaineena on jokin sakkaridi tai sokerialkoholi yhdessä suuren aminohappopitoisuuden kanssa. Läsäoleva aminohappo saa tekijä VIII-liuoksessa olevan fibrinogeenin saostumaan. Tässä menetelmässä lisätään esimerkiksi 50 paino-% sakkaroosia ja 2M glysiiniä tekijä VIII-liuokseen lämpökäsittelyn ajaksi.

Lopuksi vielä UK-patentista 2172000 tunnetaan menetelmä liuoksen, joka sisältää tekijä VIII:n lisäksi hepariini- tai muita polysakkaridijäämiä, joita ei ole poistettu kokonaan aikaisemmissa puhdistusvaiheissa, lämpökäsittelyksi 10 tuntia 60°C:ssa. Näissä aikaisemmissa kokeissa tällaisten hepariiniäämämäärien ei todettu vaikuttavan mitenkään tekijä VIII:n saantoon lämpökäsittelyn jälkeen (katso s. 4, rivit 6-7 UK-patenttijulkaisussa 2172000).

Aikaisemmin tunnetuille menetelmille vesiliuoksessa olevan tekijä VIII:n stabiloimiseksi lämpökäsittelyllä 60°C:ssa 10 tunnin ajan on tunnusomaista, että tekijä VIII:n saanto lämpökäsittelyn jälkeen on alhainen. Edellä mainittujen

patenttijulkaisujen esimerkeissä raportoidaankin tekijä VIII:n saanto 10 tunnin 60°C:ssa suoritettun lämpökäsittelyn jälkeen seuraavan taulukon mukaisesti.

Menetelmän kuvaus	Tekijä VIII-aktiivisuus- saanto prosentteina
-------------------	---

US-pat. 4440679, esimerkki 1A	63
US-pat. 4440679, esimerkki 1B	61
EP-pat.hak. 0077870, taulukko 1	40-70
EP-pat.hak. 0117064, esimerkki 1	58
EP-pat.hak. 0117064, esimerkki 2	56
EP-pat.hak. 0117064, esimerkki 3	58
EP-pat.hak. 0117064, esimerkki 4	57
DE-Off. 2916711, esimerkki 2	52

Alhainen tekijä VIII:n saanto aikaisemmin tunnetuissa menetelmissä on niiden vakava haitta. Koska tekijä VIII:n sisältäviä valmisteita ja fraktioita valmistetaan luovuttajilta saadusta ihmisen verestä tai veri-plasmasta, tämä aine on erittäin rajallinen raaka-aine.

Niinpä Tanskassa käytetään vuosittain noin 20 miljoonaa KY tekijä VIII:aa (1987), mikä vastaa noin 400 000 luovuttajaa. 1 KY (kansainvälinen yksikkö) tekijä VIII:aa vastaa 1 ml:n normaalia plasmaa tekijä VIII-aktiivisuutta. Samanlaisesti näiden valmisteiden valmistuskustannukset ovat erittäin korkeat ja tekijä VIII-aktiivisuuden saanto alhainen, minkä vuoksi tekijä VIII on erittäin kallis proteiini. Niinpä 1 KY:n tekijä VIII:aa erittäin puhtaassa tekijä VIII-valmisteessa hinta on Tanskassa noin 4 Dkr. Tekijä VIII:n vuosikulutus Tanskassa vastaa noin 80 miljoonaa Dkr. On siis erittäin tärkeää, että tekijä VIII:n saanto on korkea.

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää, joka on patenttivaatimuksen 1 johdannossa määriteltä tyyppeä ja jonka tunnusmerkit on määriteltä patenttivaatimuksen tunnusmerkki-

osassa. Tämä menetelmä estää tarttuvan viruksen siirtymisen valmistetta käytettäessä ja se antaa myös korkean tekijä VIII:n saannon.

Menetelmässä lisätään tekijä VIII:n liuokseen hepariinia stabilointiaineeksi yhdessä jonkin sakkaridin tai sokeri-alkoholin kanssa ja lämpökäsittely suoritetaan sinänsä tunnetulla tavalla, mieluiten 10 tuntia 60°C:ssa. Tällä tavoin saadaan hämmästyttävän korkea tekijä VIII:n saanto.

Kun hepariinia lisätään stabilointiaineeksi yhdessä jonkin sakkaridin tai sokerialkoholin kanssa sitraattia ja tekijä VIII:aa sisältävän vesiliuoksen 10 tunnin lämpökäsittelyssä 60°C:ssa, tärkeää on vain trombiinin estovaikutus. Tätä vaikutusta voidaan voimistaa sitomalla hepariini von Willebrand-tekijään. Läsnäolevan sitraatin vuoksi kalsiumtaso ei nouse, jolloin tekijä VIII stabiloituu.

Hepariinilisäyksen vaikutuksen voidaan siis katsoa johtuvan siitä, että se vaikuttaa luonnolliseen hyytymissysteemiin, jonka seurauksena tekijä VIII stabiloituu.

Tämä on päinvastainen ilmiö kuin aikaisemmissa lisäyksissä tekijä VIII:n vesiliuosten 10 tunnin lämpökäsittelyssä 60°C:ssa. Sakkarideilla, sokerialkoholilla, aminohapoilla tai orgaanisten happojen suoloilla on stabiloiva vaikutus siinä mielessä, että nämä stabilointiaineet vaikuttavat proteiinin hydrataatioasteeseen tai varauseroon.

Menetelmä, jossa tekijä VIII:n vesiliuosta lämpökäsitellään 10 tuntia 60°C:ssa käyttämällä hepariinia stabilointiainena yhdessä jonkin sakkaridin tai sokerialkoholin kanssa, voidaan suorittaa mille tahansa tekijä VIII:n sisältävälle fraktiolle tai valmisteelle.

Sakkaridi tai sokerialkoholi lisätään sitraattiliuoksiin, jotka sisältävät tekijä VIII:n. Parhaaksi todettu suoritusmuoto on lisätä sakkaroosia. Tekijän VIII:n stabiloituminen

paranee sakkaridin tai sokerialkoholin lisäyksen kasvun myötä. Niinpä sitä voidaan lisätä 20 paino-%:sta kyllästymiseen saakka. Parhaaksi katsotun suoritusmuodon mukaan sakkaroosia lisätään 60 paino-% liuoksen painosta. Tekijän VIII:n liuoksen kyllästäminen sakkaridilla tai sokerialkoholilla osaksi aiheuttaa käsittelyvaikeuksia johtuen korkeasta viskositeetista, osaksi tarttuvan viruksen stabiloitumisen.

Hepariinia voidaan lisätä ennen tai jälkeen sakkaridin tai sokerialkoholin lisäyksen 1,0-4,0 KY (kansainvälistä yksikköä) hepariinia/gramma liuosta sakkaridin tai sokerialkoholin lisäyksen jälkeen. Lisäys, joka vastaa 1,5-2,5 KY hepariinia/gramma liuosta, on paras suoritusmuoto.

Liian suurten hepariinimäärien lisääminen aiheuttaa tekijä VIII:n saostumisen. Tämä saostuminen voidaan havaita mittaamalla liuoksen sameus. Onkin todettu, että liuoksen sameuden voidaan havaita kasvavan, kun hepariinia lisätään 4,0 KY hepariinia/gramma liuosta. Proteiinien saostumiseen pätee se seikka, että liuoksen kemikaaliset ja fysikaaliset olosuhteet, kuten proteiinin pitoisuus, proteiinin koostumus, johtavuus, pH tai suolapitoisuus, vaikuttavat saostumisasteeseen. Muutokset esimerkiksi proteiinin pitoisuudessa tai proteiinin koostumuksessa saattavat siten aiheuttaa muutoksia hepariinipitoisuudessa, joka antaa suurimman tekijä VIII:n saannon, ilman että proteiiniliuos alkaa saostua.

Maksimisaannon saamiseksi pH-arvo tulee säätää liuoksessa fysiologiselle tasolle. Niinpä pH-arvon tulisi olla 6,0-7,0, parhaimman menettelytavan mukaan 6,2-7,0.

CaCl_2 :n lisääminen pieninä määrinä saattaa aiheuttaa tekijä VIII:n stabiloitumisen lämpökäsittelyn aikana. Esillä olevassa menetelmässä käytetään 0-150 mmoolia CaCl_2 :a/gramma valmista liuosta.

Sakkaridin tai sokerialkoholin poistaminen tekijä VIII:n liuoksesta lämpökäsittelyn jälkeen voi tapahtua tekijä VIII:n dialyysillä tai saostuksella liuoksesta.

Tekijä VIII-aktiivisuuden määrittäminen voidaan suorittaa joko 2-vaiheisella tai 1-vaiheisella kokeella. Tiedetään, että 1-vaiheiset ja 2-vaiheiset kokeet voivat johtaa varsin erilaisiin tekijä VIII-aktiivisuuden määrittäisiin annetusta näytteestä. Lisäksi tiedetään, että toistetuissa mittauksissa samalla kokeella samasta näytteestä voidaan saada suuria vaihteluja tekijä VIII-aktiivisuuden määrittämisessä. Samoin tiedetään, että tekijä VIII-aktiivisuuden määrittämisessä saatavat tulokset voivat riippua muista läsnäolevista proteiineista tai muista komponenteista annetussa näytteessä.

Tekijä VIII-aktiivisuuden määrittäminen 2-vaiheisessa kokeessa suoritetaan kromogeenisella substraattimenetelmällä (KABI Coatest Factor VIII), jossa alkuperäistä menetelmää koeputkissa 37°C:ssa on muunnettu suoritettavaksi mikrotiitterilevyllä käyttämällä vähemmän reagenttia huoneenlämpötilassa. Käytetään 50 mikrolitraa näytettä tai standardiliuosta, joita kuumennetaan 10 minuuttia, kun niihin on sekoitettu 50 mikrolitraa fosfolipidiä, tekijä IXa:a ja tekijä X:a. Kun niihin on lisätty 25 mikrolitraa 25mM CaCl₂:a, niitä inkuboidaan 15 minuuttia ja sitten lisätään 50 mikrolitraa substraattia.

Vielä 20 minuutin inkuboinnin jälkeen reaktio pysäytetään lisäämällä 50 mikrolitraa 1M sitruunahappoa. Värin muutos luetaan 405 nm:llä vertailuarvon ollessa 492 nm.

Tekijä VIII-aktiivisuuden määrittäminen 1-vaiheisessa kokeessa suoritetaan APTT-menetelmällä (Activated Partial Thromboplastin Time). 100 Mikrolitraa näytettä tai standardiliuosta pipetoidaan maljoihin ja sitten lisätään 100 mikrolitraa defisienttiä plasmaa (plasmaa, josta puuttuu tekijä VIII, General Diagnostics). Lisätään 100 mikrolitraa APTT-rea-

genssia (General Diagnostics) ja liuosta pidetään 37°C:ssa 5 minuuttia. Kun on lisätty 100 mikrolitraa 0,03M CaCl₂:a, mitataan aika liuoksen koaguloitumiseen.

Kvantitatiivisia määrittämiä varten valmistetaan kalibrointikäyrät, jotka perustuvat kansainvälisen standardiliuoksen, joka on kalibroitu WHO-standardin mukaan, laimennussarjoihin (3rd Int. Standard of F VIII, Human Plasma, 3,9 IU/ml). 2-vaiheisessa kokeessa, kuten tässä todetaan, on (noin 10 kertaa) alhaisempi detektiokynnys kuin 1-vaiheisessä kokeessa. Hepariinin lisäyksen yhteydessä on eduksi käyttää 2-vaiheista koetta, koska hepariinin vaikutus kokeeseen voidaan helpommin poistaa laimentamalla.

Sameuden määrittäminen suoritetaan mittaamalla ekstinktio 400 nm:llä.

Näin kokeet ovat osoittaneet, että hepariinin lisäys pitoisuutena 1,0-4,0 KY/gramma liuosta, joka sisältää tekijä VIII:n, joka on stabiloitu jollakin sakkaridilla tai soke-rialkoholilla lämpökäsittelyn aikana, lisää tekijä VIII:n saantoa.

Keksinnön mukaista menetelmää valaistaan seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

14 ml sitraattiliuosta (0,53 g natriumsitraattia/litra), joka sisältää 1680 KY tekijä VIII:aa, jaetaan 7 putkeen, niin että jokainen putki sisältää 2 ml liuosta. Jokaiseen putkeen lisätään 3 g sakkaroosia, jonka annetaan liueta. Lisäksi jokaiseen putkeen lisätään hepariiniliuosta (500 KY/ml), niin että kukin putki sisältää hepariinia alla olevassa taulukossa ilmoitetun määrän ja noin 48 KY tekijä VIII:aa/gramma valmista liuosta. Putket tulpitetaan ja lämpökäsitellään 10 tuntia 60°C:ssa. Tekijä VIII määritetään 1-vaiheisella kokeella ja liuoksen sameus määritetään ekstinktiona 400 nm:llä.

Hepariinilisäys KY/g liuosta	Tekijä VIII-aktiivisuuden saanto prosentteina	E400
0,0	70	0,35
0,3	70	0,34
0,5	71	0,35
1,0	87	0,35
2,0	91	0,37
4,0	93	0,40
8,0	85	0,63

Esimerkki 2

20 ml sitraattiliuosta (0,53 g natriumsitraattia/litra), joka sisältää 6000 KY tekijä VIII:aa, jaetaan 10 putkeen, niin että jokainen putki sisältää 2 ml liuosta. Jokaiseen putkeen lisätään 3 g sakkaroosia, jonka annetaan liueta. Lisäksi jokaiseen putkeen lisätään hepariiniliuosta (500 KY/ml), niin että kukin putki sisältää hepariinia alla olevassa taulukossa ilmoitetun määrän ja noin 120 KY tekijä VIII:aa/gramma valmista liuosta. Putket tulpitetaan ja lämpökäsitellään 10 tuntia 60°C:ssa. Tekijä VIII määritetään 2-vaiheisella kokeella.

Hepariinilisäys KY/g liuosta	Tekijä VIII-aktiivisuuden saanto prosentteina
0,0	66
1,0	86
1,5	81
2,0	91
2,5	87

Esimerkki 3

8 ml sitraattiliuosta (0,53 g natriumsitraattia/litra), joka sisältää noin 5000 KY tekijä VIII:aa, jaetaan 4 putkeen, niin että jokainen putki sisältää 2 ml liuosta. Jokaiseen

putkeen lisätään 3 g sakkaroosia, jonka annetaan liueta. Lisäksi 2 putkeen lisätään hepariiniliuosta (500 KY/ml), niin että putket sisältävät hepariinia 2,0 KY/g liuosta. Putket tulpitetaan ja lämpökäsitellään 10 tuntia 60°C:ssa. Koe toistetaan eri näyttemateriaaleilla, kaikkiaan 5 kertaa. Tekijä VIII:n pitoisuus vaihteli näissä kokeissa 220-260 KY/g valmista liuosta. Tekijä VIII määritetään 2-vaiheisella kokeella.

Koe	KY hepariinia/ g liuosta	Tekijä VIII-aktiivi- suussaanto %	Parannus %
1	0	40	
	0	40	
	Keskiarvo	42	
	2	71	
	2	81	
	Keskiarvo	76	
2	0	51	
	0	55	
	Keskiarvo	53	81
	2	86	
	2	87	
	Keskiarvo	87	63
3	0	55	
	0	60	
	Keskiarvo	58	
	2	85	
	2	89	
	Keskiarvo	87	51
4	0	71	
	0	71	
	Keskiarvo	71	
	2	83	
	2	84	
	Keskiarvo	84	18
5	0	59	
	0	66	
	Keskiarvo	63	
	2	84	
	2	85	
	Keskiarvo	85	35

Keskimääräinen parannus kaikissa kokeissa on 50 %.

Esimerkki 4

2 ml:aan sitraattiliuosta (0,53 g natriumsitraattia/litra), joka sisältää 600 KY tekijä VIII:aa, sekoitetaan 3 g sakkarosia, jonka annetaan liueta. Lisäksi lisätään hepariini-liuosta (500 KY/ml) ja kalsiumkloridia ($10^{-2}M$), niin että putki sisältää hepariinia 2,0 KY, 100 mmoolia kalsiumkloridia ja 120 KY tekijä VIII:aa/g liuosta. Putki tulpitetaan ja lämpökäsitellään 10 tuntia $60^{\circ}C$:ssa. Tekijä VIII määritetään 2-vaiheisella kokeella. Tekijä VIII:n saanto oli 88 %.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä tekijä VIII:n vesiliuosten pastöroimiseksi kuumentamalla liuos 55-65°C:n lämpötilaan 5-15 tunnin ajaksi jonkin sakkaridin tai sokerialkoholin läsnäollessa, t u n -
5 n e t t u siitä, että käytetään puhdistettua sitraattia sisältävää tekijä VIII:n liuosta, johon edelleen lisätään 1-4 KY hepariinia/g valmista liuosta, minkä jälkeen suoritetaan lämpökäsittely.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että lisätty hepariinimäärä on 1,5-2,5 KY/g valmista liuosta.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että pH pidetään arvossa 6,2-7,0 lämpökäsittelyn ajan.
- 20 4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tekijä VIII-pitoisuus pidetään arvossa 10-300 KY/g valmista liuosta.
- 25 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että sakkaridin tai sokerialkoholin määrä on 50-65 paino-% valmiin liuoksen painosta laskettuna.
- 30 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että sakkaridi on sakkaroosi.
7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lämpökäsittely suoritetaan CaCl_2 :n ollessa läsnä määränä, joka ei ylitä 150 mmoolia/g valmista liuosta.

Patentkrav

1. Förfarande för pastörisering av vattenbaserade lösningar av faktor VIII genom upphettning av lösningen till en temperatur av 55-65°C under en tidsperiod av 5-15 timmar i närvaro av en sackarid eller en sockeralkohol, k ä n n e -
5 t e c k n a t av att man använder en renad citratinnehållande lösning av faktor VIII, till vilken man dessutom sätter 1-4 IU av heparin per g färdig lösning följt av värmebehandling.
- 10 2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att den tillsatta heparinmängden utgör 1,5-2,5 IU per g färdig lösning.
- 15 3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att pH-värdet hålles vid 6,2-7,0 under värmebehandlingen.
- 20 4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t av att faktor VIII-innehållet upprätthålles mellan 10 och 300 IU per g färdig lösning.
- 25 5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t av att mängden sackarid eller sockeralkohol utgör 50-65 vikt-% räknat på den färdiga lösningen.
- 30 6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a t av att sackariden är sackaros.
7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t av att man genomför värmebehandlingen i närvaro av CaCl_2 i en mängd som ej överstiger 150 mmol per g färdig lösning.