



F1000103510B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 103510 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.07.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 07K 1/14, 14/755, A 61K 35/16

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 922105

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 08.05.1992

(24) Alkupäivä - Löpdag 05.11.1990

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 08.05.1992

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/DK90/00279

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

09.11.1989 DK 5621/89 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kaersgaard, Per, Kratmosevej 45, 2950 Vedbaek, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab, Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä tekijän VIII eristämiseksi
Förfarande för isolering av faktor VIII

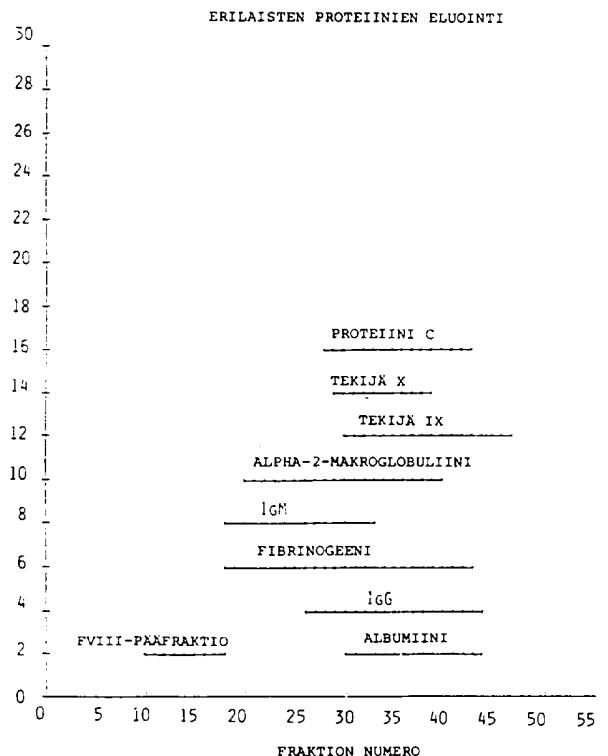
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 104356 (C 07G 7/00), US A 4675385 (A 61K 35/14), WO A 89/09784 (C 07K 3/20)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Selostetaan menetelmä tekijä VIII:n eristämiseksi muista vereen liuenneista proteiineista, jolloin plasma alistetaan geelisuodatukseen ryhmäerotusolosuhteissa, mikä tuottaa fraktion, joka sisältää tekijää VIII erittäin suurena saantona ja lähes muista proteiineista vapaana.

Det beskrivs ett förfarande för isolering av faktor VIII från andra proteiner upplösta i blodplasma varvid plasman görs till föremål av gelfiltrering under gruppseparationsförhållanden vilka åstadkommer en fraktion innefattande faktor VIII i ytterst högt utbyte och nästan fri från andra proteiner.



Menetelmä tekijän VIII eristämiseksi - Förfarande för isolering av faktor VIII

5 Esillä oleva keksintö kohdistuu menetelmään biologisten yhdisteiden, kuten proteiinien, erityisesti hyytymistekijän VIII, eristämiseksi ruumiinnesteistä, kuten plasmasta, käyttämällä geelisuodatusta ensimmäisenä eristysvaiheena.

10 Tekijä VIII, joka tunnetaan myös verenvuototautia estävänä tekijänä A tai AHF, on plasmaproteiini, joka osallistuu veren hyytymisen sisäsyntyisyyteen. Tekijä VIII kiertyy veri-plasmassa äärimmäisen alhaisessa pitoisuudessa kahden proteiinin eikovalenttisen yhdistelmän muodossa, jossa on tekijä VIII hyydyttävää toimintaa (tekijä VIII:C) ja ristoseitiini-kofaktoritoimintaa (von Willebrand Factor (vWF)) vastaavasti, sanotun yhdistelmän molekyyli-painon ollessa $1-20 \times 10^6$ D.

15 Noin viideltä sadasta tuhannesta henkilöstä, jotka sairastavat verenvuorotautia hemofilia A, puuttuu tekijä VIII:C tai se on viallinen.

20 von Willebrand -tekijä sitoutuu aktivoituneisiin verihiutaleisiin sellaisella tavalla, että aktivoituneiden verihiutaleiden aggregoituminen tehostuu. Tämä vaikutus voidaan havaita in vitro aggregoimalla ristoseitiini-indusoidut verihiutaleet. von Willebrandin sairauden ohessa havaitaan pidentynyt verenvuotoaika, joka johtuu von Willebrand -tekijän biologisen aktiivisuuden puutteesta tai laskeneesta tasosta.

25 Verenvuototautisia, jotka sairastavat hemofilia A:ta, ja potilaita, jotka sairastavat von Willebrandin taudin vaikeaa lajia, hoidetaan nykyisin konsentraateilla, jotka käsittävät tekijän VIII:C/vWF, joka on hoito, joka on pidentänyt potilaiden elämänlaatua ja taloudellista tilaa huomattavasti sekä on pidentänyt näiden potilaiden elinikää.

30 Tekijää VIII (tekijä VIII:C ja/tai vWF) sisältävät farmaseuttiset valmisteet voidaan valmistaa verestä tai veri-plasmasta. Tällaisten valmisteiden valmistaminen voidaan suorittaa erilaisilla tunnetuilla tavoilla, joille kaikille on tunnusomaista erityisesti tekijän VIII:C alhaiset saannot. Lähes kaikille menetelmille on tunnusomaista alkupuhdistusvaihe, joka käsittää kryopresipitoinnin. Kryopresipitoinnilla jäädytetty plasma sulatetaan lämpötilassa $0-4$ °C, mikä tuottaa presipitaatin, joka käsittää tekijän VIII, joka voidaan kerätä esimerkiksi sentrifugoimalla. Vaikkakin kryopresipitointi on suhteellisen yksinkertaista, sen oleellisena haittana on se, että kun sitä
35
.. käytetään laajassa mittakaavassa, so. plasmapoolit, jotka käsittävät yli 5 kg, se tuot-

taa alhaisen tekijä VIII:C-saannon (30-45 % plasman painosta), mikä tarkoittaa, että lopullinen saanto on alhainen riippumatta siitä, mitä seuraavia puhdistusvaiheita käytetään.

- 5 Lisäksi tekijä VIII -valmisteiden tuottamiseen on sisällytetty tavallisesti virusten inaktivoituvaihe. Virusten inaktivoituvaiheet ovat lisänneet merkittävästi turvallisuutta valmisteiden virussisällön suhteen mutta ne laskevat useimmissa tapauksissa lisää tekijän VIII:C saantoa.
- 10 Tekijän VIII erittäin alhainen kokonaissaanto on johtanut näiden valmisteiden puutteeseen useilla alueilla ja siksi tarvitaan uusia menetelmiä tekijän VIII puhdistamiseksi suurena saantona tekijän VIII kysynnän tyydyttämiseksi hemofiliaa potevien hoidossa.
- 15 Uudet menetelmät tekijän VIII erottamiseksi suoraan plasmasta suurena saantona olisivat erittäin mielenkiintoisia, koska 70 % plasman tekijä VIII -pitoisuudesta katoaa jo kryopresipitaatiossa tai ennen sitä.

20 Äskettäin on yritetty eristää tekijä VIII suoraan plasmasta käyttämällä affiniteettikromatografiaa (Thromb. Haemost., 61, (2), 234-237 (1989)) mutta saatiin vain alle 60 %:n saanto ja spesifinen aktiivisuus 1 IU tekijää VIII/mg proteiinia eristettyä tekijää VIII-sisältävästä fraktiosta.

25 Geelisuodatus, jota myös nimitetään geelinläpäisykromatografiaksi tai kokoekskluusiokromatografiaksi, on diffuusiokontrolloitu menetelmä, jota käytetään liuotteiden erottamiseen niiden koon mukaan. Liuotteet viedään kolonnin läpi, johon on pakattu inerttejä huokoisia geelipartikkeleita, joiden huokoskoko sulkee pois suurimmat molekyylit, kun taas pienemmät molekyylit hajaantuvat stationaariseen faasiin geelipartikkelien sisään. Täten suuremmat molekyylit, jotka suljetaan täydellisesti pois geelipartikkeleista, eluoidaan ensin "välisijatilavuudella", kun taas pienemmät molekyylit kulkevat pitemmän aikaan kolonnissa ja eluoituvat pienenevän koon mukaan nousevilla "eluintitulavuuksilla".

35 Geelisuodatus voidaan suorittaa kahdella erilaisella tavalla:

1. Ryhmäerotustapa

Ryhmäerotustavassa liuotteet erotetaan kahteen ryhmään, joiden molekyylikoossa on suuri ero, toisen ryhmän ollessa eluoitu välisijatilavuudella ja toisen ryhmän ollessa eluoitu myöhemmin paljon suuremmalla eluointitilavuudella, joka on usein lähellä "pakatun kolonnin kokonaistilavuutta"; tätä menetelmää käytetään ensisijaisesti proteiinien erottamiseen liuenneista suoloista tai puskurin vaihtamiseen ja sitä nimitetään "suolanpoistoksi". "Suolan poistamiseksi" käytetään jäykkiä geelejä, joiden huokoskoko on pieni, ja menetelmä voidaan suorittaa käyttämällä suuria määriä materiaalia (näytetilavuudet ovat 20-30 % pakatun kolonnin tilavuudesta) ja käyttämällä suuria virtausnopeuksia (noin yksi pakatun kolonnin tilavuus puskuria tunnissa), jolloin kolonnin kapasiteetti on suuri.

2. Fraktionointitapa

Fraktionointitavassa erotetaan liuotteet, joiden molekyylipaino on erilainen; tämä menetelmää käytetään usein proteiinien erottamiseen. Tähän käytetään geelipartikkeita, joissa on suurempia huokosia, ja geelisuodatusväliaine valitaan siten, että varmistetaan se, että proteiinit eluoidaan välisijatilavuuden ja eluointitilavuuden, joka vastaa pakatun kolonnin kokonaistilavuutta, välissä. Substanssit eluoidaan paljon tarkemmin kuin käyttämällä ryhmäerotusolosuhteita ja ne voivat limittyä. Suuret virtausnopeudet eivät ole toivottuja, koska tämä ei mahdollista proteiinien tehokasta erottamista ja kolonnin panostus täytyy pitää alhaisena, jotta saadaan yksittäisten proteiinien järkevä erotus. Täten geelisuodatusta, jota käytetään fraktionointitavassa, on suositeltu vain proteiinien erottamiseen viimeisenä siloitusvaiheena, jossa fraktionoitava tilavuus on pieni (Jagschies, Ullmanns Encyklopedia of Industrial Chemistry, vol B3(10), 1988 ja Bio/Technol., 4, 954-58 (1986)).

Tekijää VIII on yritetty eristää plasmasta käyttämällä geelisuodatusta (J. Lab. Clin. Med., 72, (6), 1968, 1007-1008 ja J. Clin. Invest., 48, 1969, 957-962). Kokeissa havaittiin hyvä puhdistuminen mutta saannot olivat vain noin 40-50 %. Saadun tekijää VIII sisältävän fraktion puhtauden havaittiin olevan riippuvainen lähtöplasmasta, sillä suuri lipidi- ja kylomikronipitoisuus tuotti samean tekijä VIII -fraktion, jossa on pienempi spesifinen aktiivisuus. On huomattava, että käytetty geelinsuodatustekniikka ei salli suurien plasmamäärien käsittelemistä, vaikka esitutkimukset osoittivat, että paljon konsentroidumman Cohn-fraktio I:n geelisuodatus näytti mahdolliselta.

Lisäksi Paulssen et al. (Thromb. Diathes. Haemorr., 22, 1969, 577-583) havaitsivat, että tekijä VIII voidaan erottaa muista plasmaproteiineista käyttämällä geeliväliaine-Sepharose 6B:tä mutta tämä kromatografia käyttämällä geelisuodatusta näytti mahdolliselta vain suuressa mittakaavassa, kun uudelleenliuotettua kryopresipitaattia
5 käytettiin lähtömateriaalina.

US-patentissa 3 637 489 selostetaan menetelmä verikomponenttien erottamiseksi käyttämällä geelisuodatusta ja käyttämällä huokoisia lasipallosia. Menetelmä on tarkoitettu erityisesti immunologisesti aktiivisten materiaalien erottamiseen muista
10 konstituenteista seerumissa tai plasmassa.

On suoritettu lukuisia yrityksiä geelisuodatuksen käyttämiseksi tekijän VIII puhdistamiseen, mutta yritykset ovat keskittyneet osittain puhdistettujen plasmafraktioiden geelisuodatukseen (uudelleenliuotettu kryopresipitaatti ja siitä edelleen puhdistetut
15 fraktiot). Kaikki yritykset on suoritettu käyttämällä joko pieniä pylvään panostuksia ja/tai pieniä virtausnopeuksia tai niiden yhdistelmiä.

Geelisuodatus on tunnettu proteiinien fraktionointimenetelmänä jo vuodesta 1959 ja sitä käytetään laajasti biokemiallisissa tutkimuslaboratorioissa proteiinien karakteri-
20 sointimenetelmänä ja menetelmänä proteiinien puhdistamiseksi näytteistä, joiden tilavuudet ovat pieniä, esim. alle 1 litran. Geelisuodatusta ei ole käytetty tähän keksintöön mennessä suuressa mittakaavassa plasman fraktionointiin proteiinien erottamiseksi ainoan käytön oltua etanolin ja suolojen suolanpoisto albumiiniliuoksista. Täten kuten viitekirjoissa todetaan: "Pääsyy, miksi geelisuodatukselta ei ole tullut
25 pääteknikkaa plasman fraktionoinnissa, on vähäinen proteiinin läpimeno kolonnin tilavuutta kohti" (J.H. Berglöf: "Fractionation by Gel Filtration", s. 163-173, J.M. Curling (toim.): "Methods of Plasma Protein Fractionation", Academic Press, London, 1980) ja "Valitettavasti proteiinimassat, joita voidaan käsitellä kohtuullisen ko-
30 koisissa kolonneissa, ovat pieniä ja näytteen laimennusta ei voida laiminlyödä. Siksi menetelmää ei paljon käytetä plasman fraktionoinnissa" (J.J. Morgenthaler et al.: "Preservation of structure and function during isolation of human plasma proteins", s. 127-138, Smit Sibinga et al. (toim): Plasma Fractionation and Blood Transfusion", Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1985).

35 US-patentissa 4 675 385 selostetaan menetelmä tekijä VIII -esihyydyttävän proteiinin eristämiseksi plasmavalmisteesta, joka käsittää tekijän VIII, suuren molekyyli-
painon konstituentit ja alhaisen molekyyli- painon konstituentit, jaksoittaisella suuren

suorituskyvyn ekskluusiokromatografialla valmistamalla ensimmäisessä vaihessa plasmavalmisteen puskuroitu vesipitoinen koostumus ja erottamalla alhaisen molekyylipainon konstituentit viemällä koostumus huokoisen suuren suorituskyvyn nestekromatografiapallosten kromatografiakolonneihin pallosten koon ollessa noin 5 13 mikronista noin 35 mikroniin ja eluimalla kolonni puskuroidulla vesipitoisella eluentilla. Hyvän erottamisen saavuttamiseksi US-patentti 4 675 385 opettaa kolonnien käytön, joissa sivusuhte ei ole alle 10-40, mikä vähentää kapasiteettia, muttei varmista tekijä VIII -konstituenttien hyvää erottumista alhaisen molekyyli-
10 proteiinien, joissa esiintyy tekijä VIII:C-aktiivisuutta, hyvää erottumista toisista plasmavalmisteen konstituenteista, joka valmiste saadaan vain suorittamalla toinen HPLC.

Täten tähän keksintöön mennessä on hyväksytty tosiasia, että geelisuodatus ei ole 15 sopiva menetelmä proteiinien erottamiseen plasman fraktionoinnissa, kun käsitellään suuria tilavuuksia, esim. yli 5 litraa.

Nyt on yllättäen havaittu, että kun valitaan geelisuodatusmateriaalit, jotka on suunniteltu suurille virtausnopeuksille, on tekijän VIII erottaminen mahdollista puhtaan 20 fraktion muodossa ja hyvin suurena saantona suoraan plasmasta hyvin vähäisellä mekaanisella erottamisella ilman että on turvauduttava normaaliin alkukryopresipitointiin.

Esillä oleva keksintö kohdistuu menetelmään tekijän VIII erottamiseksi tekijän 25 VIII:C ja vWF:n yhdistelmän muodossa muista veriplasmassa olevista proteiineista käyttämällä geelisuodatusta.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että eristetty plasma tai sulatettu äskettäin jäädytetty plasma alistetaan geelisuodatukseen ryhmässä erotusolo- 30 suhteita, joissa käytetään suurta panostusta ja suurta virtausnopeutta geelisuodatusväliaineen koostuessa partikkeleista, jotka ovat inerttejä tekijään VIII ja niiden fraktionointialue on välillä 1×10^3 - 8×10^7 . Fraktionointialue voi vaihdella esim. välillä 5×10^4 - 4×10^7 .

Edullisessa suoritusmuodossa lisätyn plasman tilavuus on vähintään 5 % pakatun 35 kolonnin tilavuudesta. Lisätyn plasman määrä on edullisesti 15-40 % pakatun kolonnin tilavuudesta.

Keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan edullisesti käyttämällä virtausnopeutta vähintään 0,3 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa, edullisimmin 0,5-2 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa.

- 5 Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Esillä olevassa keksinnössä käytetään geelisuodatusväliainetta, jossa on jäykkyys, joka sallii nopean eluaation. Lisäksi geelin tulee olla kemiallisesti ja immunologisesti inertti tekijään VIII geelisuodatuksen aikana. Kokeet ovat osoittaneet, että
10 esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä voidaan suorittaa käyttämällä kaupallisia geelejä, kuten Sepharose CL-4B, Sepharose CL-6B, Sepharose 4FF, Sepharose 6FF, Sephacryl S-400, Sephacryl S-500, Fractogel TSK HW-65(F) ja Matrex Cellufine CGL 2000, jotka kaikki ovat sopivia esillä olevan keksinnön tarkoitukseen. Tällaisten geelien partikkelikoko (märkä) on tavallisesti välillä noin 32 µm - noin
15 200 µm.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän erään suoritusmuodon mukaisesti jäädytetty plasma sulatetaan ja varmistetaan, että kaikki tekijä VIII on liuennut, minkä jälkeen sulatettu plasma lisätään edullisesti kolonniin välittömästi sen jälkeen, kun kaikki tekijä VIII on liuennut. Lämpötilan ei anneta edullisesti nousta liian korkeaksi, jotta vältetään tekijän VIII liian laaja hajoaminen. Plasma voidaan esikäsitellä lisäämällä esim. hepariinia, sitraattia, sakkaroosia, aminohappoja, suoloja tai muita stabilointiaineita ja suodattaa, sentrifugoida, konsentroida ultrasuodatuksella, esipresipitoida käyttämällä tavallisia presipitointiaineita tai esikäsitellä
20 muulla tavalla ennen sen lisäämistä kolonniin kunhan optionaalinen esikäsitely ei vaikuta merkittävästi plasman tekijä VIII -pitoisuuteen.

On osoittautunut, että keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan erittäin suuri tekijän VIII saanto. Tavallisesti yli 70 % plasman tekijä VIII -pitoisuudesta palautuu tuotteeseen ja menetelmä tuottaa erittäin puhtaita tuotteita, joiden spesifinen aktiivisuus on 1 - noin 4 IU tekijää VIII:C/mg proteiinia. Tämä voi osittain johtua seikasta, että käytettäessä keksinnön mukaista menetelmää tekijä VIII erottuu proteolyttisistä entsyymeistä, jotka normaalisti aiheuttavat tekijän VIII:C hajoamisen hyvin varhain eristysprosessissa.

35

Keksinnön mukainen menetelmä mahdollistaa suurten plasmamäärien käsittelyn olosuhteissa, joissa plasmaa käytetään suurina panostuksina ja suurina virtausnope-

uksina geelisuodatuksessa, joka tuottaa tekijän VIII erittäin suuren talteenoton erittäin puhtaana. Täten tarjotaan erittäin tehokasta menetelmää, jolla on teollista käyttöä.

5 Geelisuodatuksesta peräisin oleva (olevat) tekijää VIII sisältävä (sisältävät) fraktio (fraktiot) tai useammista geelisuodatuksista peräisin olevat yhdistetyt fraktiot voidaan sitten konsentroida ja puhdistaa käyttämällä itsessään tunnettuja tekniikoita, kuten ultrasuodatus, presipitoinnit, ioninvaihto, affiniteettikromatografia tai niiden kaltaiset.

10

Jäljelle jäävät plasmaproteiinit, kuten albumiini, immunoglobuliinit, protrombiini-kompleksi, antitrombiini III ja muut voidaan myös eristää geelisuodatuksen myöhemmistä fraktioista käyttämällä itsessään tunnettuja tekniikoita, kuten alkoholilla presipitointi, PEG-presipitoinnit, kromatografia tai niiden kaltaiset.

15

Tekijä VIII:C-aktiivisuuden määrittäminen voidaan suorittaa käyttämällä joko kaksivaiheista testiä tai yksivaiheista testiä. On todistettu tosiasia, että yksivaiheiset ja kaksivaiheiset testit voivat johtaa tekijä VIII:C-aktiivisuuden erilaisiin määrittelyihin näytteessä. Lisäksi tiedetään, että toistetut määrittelyt käyttäen samaa testiä samassa
20 näytteessä voivat tuottaa vaihteluita tekijä VIII:C-aktiivisuuden määrittelyssä.

Tässä käytettynä ilmaus "plasma" tarkoittaa verta, josta on poistettu kaikki verisolut ja verihiutaleet esimerkiksi sentrifugoimalla.

..

25 "Tekijä VIII:Ag" tarkoittaa tekijän VIII kaltaista antigeeniä ja "vWF:Ag" von Willebrand -tekijän kaltaista antigeeniä. "Pakatun kolonnin tilavuus" on määritetty pakatun geeliväliaineen ja välisijatilavuuden tilavuudeksi. "Välisijatilavuus" on määritetty geelipartikkelien välisen puskurin tilavuudeksi ja "eluointitilavuus" on spesifisen materiaalin eluoimiseen käytetyn puskurin tilavuus. Ilmausta "kolonnin täyte"
30 on käytetty kerrokseen lisätyn materiaalin tilavuuden ilmaisemiseen laskettuna prosenttina pakatun kolonnin tilavuudesta. Ilmauksen "fraktionointialue" on tarkoitettu tarkoittavan (globulaaristen) proteiinien tai suurempien molekyylien molekyyli-
35 paisten aluetta, jolle toimittaja on suositellut geelimateriaalia.

Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää selostetaan edelleen viitaten piirustuksiin ja esimerkkeihin, jotka selventävät keksinnön suoritusmuotoja. Esimerkit on
..

annettu vain keksinnön valaisemiseksi eikä niitä ole tehty keksinnön piirin rajoittamiseksi, joka on määritetty oheistetuissa patenttivaatimuksissa.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan lisäksi viitaten oheisiin piirustuksiin, joissa

5

kuvio 1 esittää käyrää, joka esittää tekijän VIII eluoitumisen geelisuodatuksella esillä olevan keksinnön mukaisesti ja joka on määritetty erilaisilla testeillä, ja

10

kuvio 2 esittää erilaisten plasmaproteiinien eluointijärjestyksen geelisuodattamalla tämän keksinnön mukaisesti.

Esimerkki 1

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi

15 Halkaisijaltaan 2,6 cm:n kolonniin pakattiin Sepharose CL-4B:tä lopulliseen 60 cm:n korkeuteen.

Erästä tanskalaisesta veripankista peräisin oleva jäätynyt plasma sulatettiin 25 °C:een vesikylvyssä. 1 IU hepariinia/ml lisäämisen jälkeen 50 ml plasmaa (16 %
 20 pakatun kolonnin tilavuudesta) lisättiin kolonniin käyttäen virtausta 100 ml/h, minkä jälkeen kolonni eluoiitiin käyttämällä 200 ml/h puskurin pakotettua virtausta, joka vastaa 0,63 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa. Kolonnin tasapainottaminen ja eluointi suoritettiin käyttämällä puskuria 0,02 M sitraattia, 0,15 M NaCl, pH 7,4. Puskuriin lisättiin lisäksi 2,55 ml 1 M CaCl₂ litraa kohti, mikä tuottaa vapaan kalsiumionin (Ca²⁺)
 25 konsentraation noin 7 x 10⁻⁵M. Vapaan kalsiumionin konsentraatio tarkistettiin käyttämällä kalsiumselektiivistä elektrodiä, joka oli Ingold GmbH:sta (Frankfurt/Main, Saksa). Fraktiot kerättiin ja jokaiselle fraktiolle määritettiin OD₂₈₀, tekijä VIII:C (käyttämällä sekä yksivaiheista hyytymistestiä sekä kaksivaiheista kromogeenistä testiä), tekijä VIII:Ag, albumiini, IgG, fibrinogeeni, IgM, alfa-2-makroglobuliini, tekijä IX, tekijä X, proteiini C ja antitrombiini III. Proteiini mitattuna
 30 OD₂₈₀:lla, eluoiitiin pienenä huippuna välisijatilavuudessa (fraktiot 10-18), mitä seurasi erittäin suuri leveä huippu (fraktiot 19-50, vrt. kuvio 1). 82 % tekijä VIII:C-aktiivisuudesta määritettynä kaksivaiheisella ja 91 % tekijä VIII:C-aktiivisuudesta määritettynä yksivaiheisella hyytymistestillä eluoiitiin yhdessä kasaumahuipussa, jossa on välisijatilavuus (tekijän VIII pääfraktio) yhdessä aikaisemman pienen proteiinihuipun kanssa. Loput tekijästä VIII eluoiitiin pienessä seuraavassa huippuhännässä
 35 välittömästi tekijän VIII pääfraktion jälkeen (fraktiot 19-26). Tekijä VIII:Ag ja

vWF:Ag eluoituivat yhdessä tekijän VIII:C kanssa, mutta niissä oli hieman laajemat niitä seuraavat huippuhännät. Kaikki muut määritetyt plasmaproteiinit eluoituivat fraktiossa, joka on tekijän VIII pääfraktion jälkeen yhdessä suuren leveän huipun kanssa (katso kuvio 2). Tekijästä VIII:C erotettujen plasmaproteiinien molekyyli-

5 lipainot ovat seuraavat:

	Antitrombiini III	65000 D
	Proteiini C	62000 D
	Tekijä X	59000 D
10	Tekijä IX	57000 D
	Alfa-2-makroglobuliini	718000 D
	IgM	900000 D
	Fibrinogeeni	340000 D
	IgG	150000 D
15	Albumiini	67000 D

Tekijä VIII:C-aktiivisuuden määrittely käyttäen kaksivaiheista kromogeenistä testiä suoritettiin käyttämällä kromogeenistä substraattimenetelmää (KABI, Coatest Factor VIII), alkuperäisessä menetelmässä käytetään testiputkia 37 °C:ssa ja se on oli mo-

20 difioitu suoritettavaksi käyttämällä mikrotiitterilevyjä käyttäen vähemmän reagensseja. Käytetään 50 mikrolitran näytettä tai standardia, jota inkuboidaan sen jälkeen kun siihen on sekoitettu 75 mikrolittraa fosfolipidiliuosta, tekijää IXa, tekijää X ja CaCl₂, 37 °C:ssa 15 minuuttia, minkä jälkeen lisätään 50 mikrolittraa substraattia. 20 minuutin lisäinkuboinnin 37 °C:ssa jälkeen reaktio sammutetaan lisäämällä

25 50 mikrolittraa 1 M sitruunahappoa. Värin kehittyminen luetaan 405 nm:ssä vertailun ollessa 492 nm:ssä.

Tekijä VIII:C-aktiivisuuden määrittely käyttäen yksivaiheista testiä suoritettiin käyttämällä APTT-menetelmää (Activated Partial Thromboplastin Time). 100 mik-

30 rolittraa näytettä tai standardia pipetoidaan kulhoihin, minkä jälkeen lisätään 100 mikrolittraa puutteista plasmaa (tekijä VIII-puutteinen plasma, General Diagnostic) ja liuosta lämpösäädettiin 37 °C:ssa 5 minuuttia. 100 mikrolitran 0,03 M CaCl₂ lisäämisen jälkeen määritettiin aika, jossa liuos hyytyi.

35 Kvantitatiivisia määritettyjä varten tuotettiin kalibraatiokäyrät, jotka perustuvat vasten WHO-standardia (3rd Int. Standard of FVIII, Human plasma, 3,9 IU/ml) kalibroidun ominaisstandardin laimennussarjoihin. Tässä kuvatussa kaksivaiheisessa

testissä on alempi (noin 10 kertaa) havaintoraja kuin yksivaiheisessa testissä. Lisätessä hepariinia on edullista käyttää kaksivaiheista testiä, koska silloin voidaan poistaa kaikki mahdolliset hepariinin vaikutukset testiin helpommin laimentamalla.

- 5 Tekijä VIII:Ag määritettiin ELISAA käyttämällä käyttäen tekijä VIII -inhibiittori-
 potilaasta peräisin olevia vasta-aineita mikrotiitterilevyjen päällystysaineina (Nunc,
 Kamstrup, 4000 Roskilde, Tanska) ja käyttämällä samasta inhibiittori-
 potilaasta peräisin olevia peroksidaasilla merkittyjä F(AB')₂-fragmenteja sitoutuneen tekijän
 VIII määrittämiseen (Thromb. Haemost., 53(3), 1985, 346-350). Standardikäyrät
 10 valmistettiin käyttämällä yhdistettyä normaalia plasmaa, joka oli kalibroitu vasten
 WHO-standardia (1st IRP, established 1982).

- vWF:Ag määritettiin myös käyttämällä ELISAA mutta käyttämällä kanin antihu-
 maania vWG (DAKO, Tanska) päällystysmateriaalina ja peroksidaasilla merkittyä
 15 kanin antihumaania vWF (DAKO, Tanska) sitoutuneen vWF:n määrittämiseen.
 Standardikäyrät valmistettiin käyttämällä samaa normaalia plasmaa kuin tekijä
 VIII:Ag:n ELISAn osalta.

- Tekijä IX määritettiin käyttämällä yksivaiheista hyytymistestiä samalla tavoin kuin
 20 tekijässä VIII:C käyttäen vain tekijä IX -puutteista plasmaa. IgG määritettiin käyt-
 tämällä säteisimmunodiffuusiota (Immunochemistry, 2, 1965, 235-254) ja albumiini,
 fibrinogeeni, alfa-2-makroglobuliini, tekijä X, proteiini C ja antitrombiini III ha-
 vaittiin käyttämällä raketti-immunoelektroforeesia (Anal. Biochem., 15, 1966,
 45.52). OD₂₈₀ määritettiin käyttämällä spektrofotometriä (Spectronic 601, Milton
 .. Roy Company) ja proteiini käyttäen Kjeldahlia määritettiin Ph. Eur. 2. painos, I,
 .. V.3.5.2 mukaisesti presipitoimatta TCA:lla. Puhdistettujen fraktioiden spesifinen
 aktiivisuus laskettiin tekijän VIII:C-konsentraation suhteena joko OD₂₈₀:aan tai
 proteiinin konsentraatioon määritettynä Kjeldahlia käyttäen. Käytettäessä OD₂₈₀
 25 spesifisen aktiivisuuden laskemiseen eivät erilaisten kokeiden tulokset ole suoraan
 verrattavissa, jollei käytetä samaa lähtöplasmaa, koska tekijää VIII sisältävä plasma
 30 on usein sameaa, katso Ratnoff et al.:n tulokset (J. Clin. Invest., 48, 1969, 957-962).
 ..

Erilaiset kokeissa käytetyt geelisuodatusväliaineet olivat seuraavista lähteistä:

- 35 Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B, Sepharose CL-2B, Sepharose 6FF, Sepharose
 4FF, Sephacryl S-400 ja Sephacryl S-500 olivat kaikki Pharmaciasta (Hillerød,
 .. Tanska), Biogel A-5m, Fine oli BioRadista (Bie & Berntsen, Rødovre, Tanska),

Fractogel TSK HW-65(F) oli Merckiltä (Struers, Rødovre, Tanska) ja Matrex Cellufine GCL 2000 oli Amiconista (Helsingborg, Ruotsi).

Esimerkki 2

5

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi käyttämällä erilaisia geelisuodatusväliaineita

10 Halkaisijaltaan 2,6 cm:n kolonniin pakattiin erilaisia geelisuodatusväliaineita, joilla on erilainen fraktionointialue ja erilainen rakenne. Kaikissa tapauksissa pakatun kerroksen lopullinen korkeus oli 60 cm. Plasma sulatettiin kuten esimerkissä 1 kuvataan ja 1 IU hepariinia lisättiin. Jokaista geelisuodatusta varten kolonniin panostettiin 50 ml plasmaa (16 % pakatun kolonnin tilavuudesta). Kolonnin panostus ja puskurilla eluointi suoritettiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan. Virtausnopeus oli kaikissa 15 tapauksissa sama paitsi kokeessa, jossa käytettiin Biogel A-5m, jossa virtausnopeus laskettiin 50 ml:aan/h nousseesta vastapaineesta johtuen. Fraktiot kerättiin ja jokaisesta fraktiosta määritettiin OD_{280} ja tekijä VIII:C käyttämällä Coatestiä. Tekijän VIII pääfraktion spesifinen aktiivisuus laskettiin tekijän VIII:C/ml suhteena OD_{280} :een. Kokeet toistettiin n kertaa käyttäen erilaisia plasmoja kutakin panostusta 20 kohti ja saannon keskiarvot ja spesifinen aktiivisuus laskettiin. Tekijän VIII pääfraktio valittiin samalla tavalla kuin esimerkissä 1 kuvataan ja saanto on annettu tekijän VIII:C pitoisuutena tekijän VIII pääfraktiossa lisätyn plasman tekijän VIII:C pitoisuusprosenttina.

25 Fraktionointialue ja partikkelikoko erilaisten väliaineiden osalta ja lasketut keskiarvot on annettu seuraavassa taulukossa I.

Taulukko I

Geelisuodatus- väliaine	Fraktionoin- alue MW	Kokeiden määrä n	Saanto- %	Spesifinen aktiivisuus	Partikkelien halk. määrä, µm
A	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	3	95	0,16	40-165
B	$6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	4	82	0,88	40-165
C	$7 \times 10^5 - 4 \times 10^7$	3	68	0,24	60-200
D	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	3	96	0,71	40-165
E	$6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	3	86	1,35	40-165
F	$6 \times 10^4 - 8 \times 10^7$	3	91	0,28	40-105
G	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	1	71	0,12	40-80
H	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	2	84	0,18	32-63
I	$1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$	2	92	0,18	45-105
J	$1 \times 10^4 - 8 \times 10^6$	3	101	0,75	40-105

A: Sepharose CL-6B; B: Sepharose CL-4B; C: Sepharose CL-2B; D: Sepharose
 5 6FF; E: Sepharose 4FF; F: Sephacryl S-500;
 G: Biogel A-5m, Fine; H.: Fractogel TSK HW-65(F);
 I: Matrex Cellufine GCL 2000; J: Sephacryl S-400.

Esimerkki 3

10

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi käyttämällä erilaisia kolonnin
 panostuksia

15

Halkaisijaltaan 2,6 cm kolonniin pakattiin Sepharose 4FF lopulliseen korkeuteen
 60 cm. Plasma sulatettiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan. Sulattamisen jälkeen plas-
 man pH säädettiin 7,0:aan käyttämällä 0,5 M HCl, 1 IU hepariinia ml kohti lisättiin
 ja plasma suodatettiin 10 mikrometrin nailonsuodattimen läpi. Kolonniin lisättiin
 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml ja 70 ml plasmaa vastaavasti. Lisääminen, virtaus ja pus-
 kurilla eluointi suoritettiin, kuten esimerkissä 1 kuvataan, joskin puskuri säädettiin
 20 7,0:aan. Fraktiot kerättiin ja jokaisesta fraktiosta määritettiin OD₂₈₀ ja tekijä VIII:C
 käyttämällä Coatestiä. Tekijän VIII pääfraktion spesifinen aktiivisuus laskettiin teki-
 jän VIII:C/ml suhteena OD₂₈₀:een. Kokeet toistettiin kolme kertaa käyttäen erilaisia
 plasmoja kutakin panostusta kohti ja keskiarvot (X) laskettiin. Tekijän VIII pääfrak-
 tion tilavuus (ml) on tekijää VIII sisältävän fraktion tilavuus, joka voidaan kerätä en-

nen kuin suuri leveä proteiinihuippu (OD_{280}) eluoidaan ja se valitaan samalla tavalla kuin esimerkissä 1 kuvataan. Saanto on annettu tekijän VIII:C pitoisuutena tekijän VIII pääfraktiossa lisätyn plasman tekijän VIII:C pitoisuusprosenttina.

5 Lasketut arvot on annettu seuraavassa taulukossa II.

Taulukko II

Lisätyn plasman määrä			Tekijän VIII pääfraktio millilitroina	Saanto pro- sentteina	Spesif. aktiivi- suus
ml:na	% pakatun kolonnin tilav.	osa no.			
30	9,4	1	70	88	0,81
		2	70	95	0,18
		3	70	90	0,63
		x	70	91	0,54
40	12,6	1	70	76	0,68
		2	70	85	0,17
		3	70	93	0,61
		x	70	85	0,49
50	15,7	1	80	91	0,57
		2	80	90	0,20
		3	80	85	0,53
		x	80	89	0,43
60	18,8	1	80	79	0,81
		2	80	85	0,16
		3	90	95	0,61
		x	83	86	0,53
70	22,0	1	80	85	0,82
		2	100	90	0,21
		3	100	93	0,53
		x	93	89	0,52

Esimerkki 4

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi käyttämällä erilaisia eluointiarvoja

5

Samaan kolonniin kuin esimerkissä 3 käytettiin, lisättiin 50 ml plasmaa, joka sulatettiin kuten edellä. Sulattamisen jälkeen plasman pH säädettiin 7,0:aan käyttämällä 0,5 M HCl, 1 IU hepariinia ml kohti lisättiin ja plasma suodatettiin 10 mikrometrin nailonsuodattimen läpi. Käyttämällä kolmea erilaista annosta plasmaa virtausnopeudet 100, 200 ja 300 ml/h tutkittiin vastaavasti. Plasman lisäyksen ja sitä seuraavan eluoinnin aikana käytettiin samaa virtausta. Eluointi suoritettiin käyttämällä samaa puskuria kuin esimerkissä 3 kuvataan. Fraktiot kerättiin ja jokaisesta fraktiosta määritettiin OD₂₈₀ ja tekijä VIII:C käyttämällä Coatestiä. Tekijän VIII pääfraktion spesifinen aktiivisuus ja saanto kuten esimerkissä 3. Tekijän VIII pääfraktion tilavuuden keskiarvot (X), saanto ja spesifinen aktiivisuus laskettiin. Tulokset on annettu seuraavassa taulukossa III.

15

Taulukko III

Virtaus		Plasman	Tekijän VIII	Saanto pro-	Spesif. aktiivi-
		osa no.	pääfraktio	sentteina	suus
ml/h	pakatun kolonnin tilav.	millilitroina			
100	0,31	1	80	89	0,75
		2	80	88	0,17
		3	80	80	0,65
		x	80	86	0,52
200	0,63	1	80	84	0,99
		2	80	88	0,18
		3	80	89	0,79
		x	80	87	0,65
300	0,94	1	70	85	0,72
		2	80	96	0,18
		3	80	83	0,44
		x	77	88	0,45

20

Esimerkki 5

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi käyttämällä erilaisia kolonnin panostuksia

5

Halkaisijaltaan 10 cm kolonniin pakattiin Sepharose 4FF lopulliseen korkeuteen 60 cm. Eräästä tanskalaisesta veripankista peräisin oleva jäädytetty plasma sulatettiin 30 °C:ssa vesikylvyssä. Kolonniin lisättiin 925 g, 1427 g ja 2000 g plasmaa vastaavasti. Virtausta pidettiin noin 4200 ml/h plasman lisäämisen ja eluoinnin aikana käyttäen Masterflex-letkupumppua (Buch & Holm, Herlev, Tanska), mikä vastaa noin 0,89 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa. Eluointiin käytettiin samaa puskuria kuin esimerkissä 1. OD₂₈₀:tä tarkkailtiin jatkuvasti käyttämällä Pharmacia Monitor UV-1:tä. Kun OD₂₈₀ alkoi nousta välisijatilavuuteen, aloitettiin tekijän VIII pääfraktion kerääminen ja se lopetettiin, kun OD₂₈₀ osoitti, että suuri proteiinihuippu alkoi olla eluoitunut. Tekijän VIII pääfraktiossa olevat tekijä VIII:C-pitoisuudet määritettiin käyttämällä yksivaiheista hyytymistestiä ja proteiini määritettiin käyttämällä Kjeldahlia. Spesifinen aktiivisuus laskettiin tekijä VIII-pääfraktiossa olevien tekijä VIII:C-yksikköjen kokonaisluvun suhteena tekijän VIII pääfraktiossa olevan proteiinin milligrammojen kokonaismäärään. Tekijän VIII:C saanto laskettiin tekijän VIII pääfraktiossa olevan tekijän VIII:C pitoisuuksina lisätyssä plasmassa olevan tekijän VIII:C pitoisuuksien prosentteina.

Tulokset on annettu taulukossa IV.

25 **Taulukko IV**

Lisätyn plasman määrä		Tekijän VIII pääfraktio grammoina	Saanto pro- sentteina	Spesif. aktiivi- suus IU/mg
grammoina	% panostetun kolonnin tila- vuudesta			
925	19,6	1192	74	2,50
1497	31,8	1860	73	2,24
2000	42,4	2200	81	1,08

Esimerkki 6

Plasman geelisuodattaminen tekijän VIII eristämiseksi käyttämällä teollisuuskoista kolonnia

5

Halkaisijaltaan 29 cm:n kolonniin pakattiin Sepharose 4FF. Sen jälkeen kun oli tasapainotettu samalla puskurilla kuin esimerkissä 1, geelikorkeus oli 53 cm. 10 kg erästä tanskalaisesta veripankista peräisin olevaa jäädytettyä plasmaa sulatettiin ja se kuumennettiin 30 °C:een, minkä jälkeen se lisättiin kolonniin. Lisätty määrä oli 10 28,8 % pakatun kolonnin tilavuudesta. Virtausta 30 ml/h, joka vastaa 0,86 pakatun kolonnin tilavuutta, ylläpidettiin käyttäen Masterflex-letkupumppua lisäämisen ja eluoinnin aikana käyttäen tasapainotuspuskuria. OD₂₈₀:tä tarkkailtiin jatkuvasti käyttämällä Pharmacia Monitor UV-1:tä ja silloin kuin osoitettiin ensimmäinen OD₂₈₀:n nousu välisijatilavuuteen, kerättiin tekijän VIII pääfraktio. Kaiken kaikkiaan kerättiin 15 11,73 kg tekijän VIII pääfraktiota. Sitten määritettiin tekijä VIII:C-pitoisuudet käyttämällä yksivaiheista hyytymistestiä ja proteiini määritettiin käyttämällä Kjeldahlia. Tekijän VIII fraktiosta havaittiin kaiken kaikkiaan 8798 IU tekijää VIII:C ja alle 2346 milligrammaa proteiinia, mikä tuottaa tekijän VIII:C saannon 880 IU/kg plasmaa, mikä vastaa 88 % saantoa tuotteen muodossa, jonka 20 spesifinen aktiivisuus on yli 3,75 IU/mg proteiinia.

Keksinnön mukaisella menetelmällä saatu tekijän VIII fraktio voidaan puhdistaa lisäksi tavalla, joka on analoginen uudelleen liuotetun kryopresipitaatin konventionaalisen puhdistuksen kanssa ja käsittää esimerkiksi lisäkromatografiapuhdistuksen ja lyofilisoinnin käyttäen tavallisia täyteaineita vakaan valmisteen muodostamiseksi. Valmiste rekonstruoidaan ennen käyttämistä käyttäen sopivaa konventionaalista apuainetta.

25

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä tekijän VIII eristämiseksi muista veren plasmassa olevista proteiineista käyttämällä geelisuodatusväliainetta, **tunnettu** siitä, että eristetty plasma tai sulatettu äskettäin jäädytetty plasma, joka on esikäsitelty optionaalisesti, kunhan optionaalisella esikäsitelyllä ei ole mitään merkittävää vaikutusta plasman tekijä VIII -pitoisuuksiin, alistetaan suoraan geelisuodatukseen ryhmäerotusolosuhteissa, jolloin lisätyn plasman tilavuus on vähintään 5 % pakatun kolonnin tilavuudesta ja jolloin virtausnopeus on vähintään 0,3 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa geelisuodatusväliaineen ollessa koostettu partikkeleista, jotka ovat inerttejä tekijälle VIII ja joiden fraktionointialue on välillä 1×10^3 - 1×10^8 , ja tekijän VIII pääfraktio kerätään.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että geelisuodatusväliaine koostuu geelimateriaalista, jonka fraktionointialue on välillä 1×10^4 - 8×10^7 .
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että geelisuodatusväliaine koostuu geelimateriaalista, jonka fraktionointialue on välillä 5×10^4 - 4×10^7 .
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lisätyn plasman tilavuus on 15-40 % pakatun kolonnin tilavuudesta.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että virtausnopeus on 0,5-2 pakatun kolonnin tilavuutta tunnissa.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että saatu tekijä VIII puhdistetaan lisäksi tavalla, joka on analoginen uudelleen liuotetun kryopresipitaatin konventionaalisen puhdistamisen kanssa analoginen ja käsittää esimerkiksi lisäkromatografiapuhdistamisen ja lyofilisoinnin käyttämällä tavallisia täyteaineita stabiilin valmisteen muodostamiseksi.

Patentkrav

1. Förfarande för isolering av Faktor VIII från andra proteiner i blodplasma under användning av ett gelfiltreringsmedium, kännetecknat av att isolerat plasma eller upptinat nyfrost plasma, vilket eventuellt har förbehandlats, så länge som
5 ifrågavarande eventuella förbehandling inte har någon signifikant inverkan på innehållet av Faktor VIII i plasmat, direkt utsättes för gelfiltrering under gruppseparationsbetingelser, där volymen tillsatt plasma är åtminstone 5 % av bäddvolymen och där flödes hastigheten är åtminstone 0,3 bäddvolym per timme, varvid gelfiltreringsmediet utgöres av partiklar, vilka är inerta gentemot Faktor VIII och vilka
10 har ett fraktioneringsområde inom intervallet från 1×10^3 till 1×10^8 , och Faktor VIII-huvudfraktionen uppsamlas.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att gelfiltreringsmediet utgöres av ett gelmaterial med ett fraktioneringsområde inom intervallet från 1×10^4
15 till 8×10^7 .
3. Förfarande enligt patentkrav 2, kännetecknat av att gelfiltreringsmediet utgöres av ett gelmaterial med ett fraktioneringsområde inom intervallet från 5×10^4
20 till 4×10^7 .
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, kännetecknat av att volymen av tillsatt plasma är 15-40 % av bäddvolymen.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, kännetecknat av att flödes hastigheten är 0,5-2 bäddvolym per timme.
25
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, kännetecknat av att erhållen Faktor VIII renas ytterligare på ett sätt som är analogt med den konventionella reningen av en återupplöst kryofällning, vilket exempelvis innefattar ytterligare kromatografisk rening och lyofilisering under användning av vanliga hjälpämnen till bildning av ett stabilt preparat.
30

FIG.1 TEKIJÄN VIII ELUOINTI

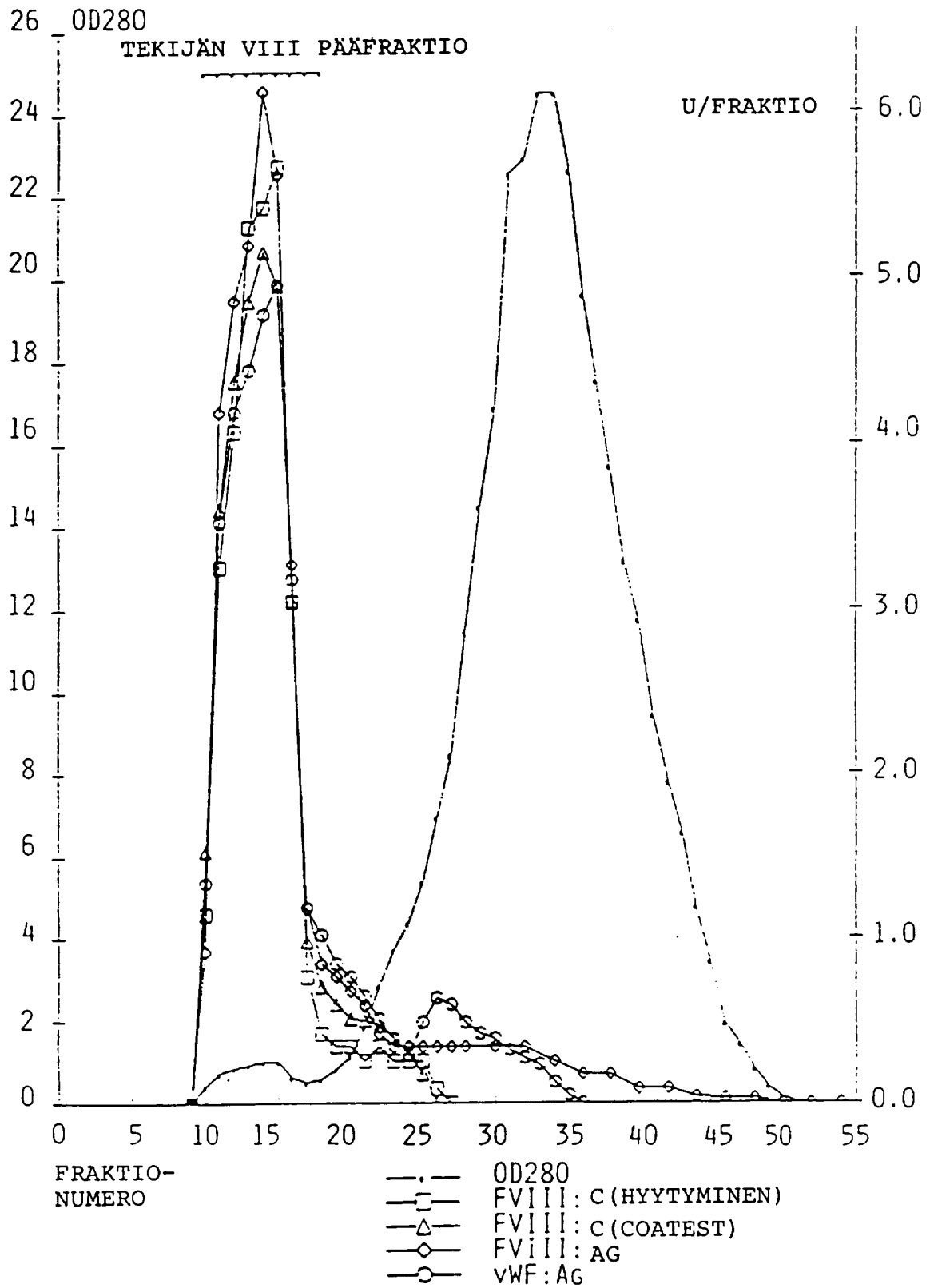


FIG.2 ERILAISTEN PROTEIINIEN ELUOINTI

