



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 169875

(13) B

(51) Int Cl<sup>5</sup> A 61 K 37/02, 37/04, 35/16, C 07 K 15/06

**Styret for det industrielle rettsvern**

(21) Søknadsnr	844610	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	20.03.84, PCT/DK84/00019
(22) Inng. dag	20.11.84	(85) Videreføringsdag	20.11.84
(24) Løpedag	20.03.84	(30) Prioritet	21.03.83, DK, 1274/83
(41) Alm. tilgj.	20.11.84		09.05.83, DK, 646/83
(44) Utlegningsdato	11.05.92		01.12.83, DK, 5494/83

(71) Patentsøker Nordisk Insulinlaboratorium, Niels Steensensvej 1, DK-2820 Gentofte, DK  
(72) Oppfinner Mirella Ezban Rasmussen, København, DK  
Ole Nordfang, Allerød, DK  
(74) Fullmektig Johan H. Gørbitz, Bryn & Aarflot AS, Oslo

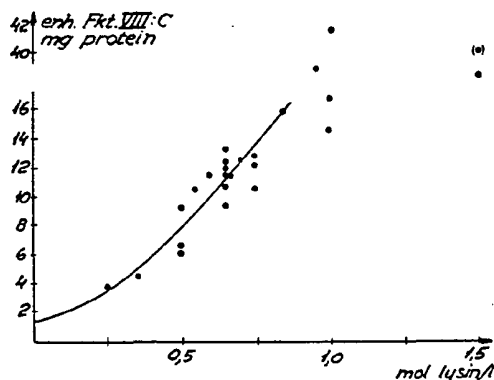
(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et konsentrat av den anti-hemofile Faktor VIII**

(56) Anførte publikasjoner Norsk (NO) utl. skrift nr. 145563, USA (US) patent nr. 3652530, 3631018, 3682881, Newman et al., "Methods for the Production of Clinically Effective Intermediate- and High- Purity Factor- VIII Concentrates, Brit. J. Haematology 21, 1972.

(57) Sammendrag

Fremstilling av et høyrent konsentrat av den anti-hemofile Faktor VIII (AHF) ved felling av en vandig oppløsning av kryopresipitat fra blodplasma i et første trinn med en slik mengde polyetylen glykol (PEG), fortrinnsvis ca. 4 vekt%, at en vesentlig del av det tilstedeværende fibrinogen utfelles, hvorefter den for fibrinogen befrikkede oppløsning i et annet trinn underkastes en ny felling med fortrinnsvis ca. 12 vekt% PEG i nærvær av et innsaltningmiddel, såsom en aminosyre, spesielt lysin eller arginin, eller et karbohydrat, hvorpå det utskilte bunnfall med konsentrert innhold av den tilstedeværende Faktor VIII utvinnes.

Det oppnådde Faktor VIII-konsentrat med et meget lavt innhold av immunoglobuliner og andre plasmaproteiner har en oppløselighet i vandig injeksjonsmedium på 45 - 50 enheter/ml og en høy spesifikk aktivitet på opptil 50 enheter/mg protein.



Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et konsentrat av den anti-hemofile Faktor VIII, kalt AHF, som er i det vesentlige fritt for denaturert AHF og andre plasmaproteiner som er til stede i utgangsmaterialet for konsentratet, men ikke for faktor VIII:RP, hvilket konsentrat er lyofiliserbart uten proteintilsetning, og oppviser en oppløselighet i et vandig injeksjonsmedium på 45-50 enheter AHF pr. ml og en spesifikk aktivitet på 3,85-50 enheter AHF pr. mg protein som stammer fra utgangsmaterialet for konsentratet, ved hvilken fremgangsmåte en oppløsning av et kryoprecipitat fra blodplasma eller en annen faktor VIII-holdig blodfraksjon renses for å fjerne prothrombin og derefter underkastes fraksjonering med polyetylenglykol, PEG, omfattende et trinn for utfelning av hovedparten av fibrinogen ved hjelp av 2-6 vekt% PEG 200-20.000 ved 6-22°C og pH 6,0-8,5 og et etterfølgende trinn for utfelning av AHF, fortrinnsvis ved 18-22°C.

Det er kjent at blodets evne til å koagulere styres av et system av koagulasjonsproteiner, hvorav AHF eller Faktor VIII er en viktig komponent.

Personer med hemofili-A eller blødesykdom har helt eller delvis mistet evnen til å produsere AHF. Til behandling av denne sykdom injiseres AHF-holdige preparater, og det har derfor betydning å råde over preparater inneholdende passende høye konsentrasjoner av AHF og med lavest mulig innhold av andre proteiner, såsom fibrinogen og immunglobuliner.

Især ved behandling av inhibitorpasienter, d.v.s. pasienter som produserer antistoffer mot AHF og som derfor skal ha preparatet tilført i overskudd, med høye doser av AHF, er det viktig at den spesifikke aktivitet (enh. AHF/mg protein) er høy, idet en tilførsel av "andre proteiner" i større mengder kan fremkalle uønskede bivirkninger. Med 1 enhet AHF forstås faktor VIII aktiviteten av 1 ml. normalt blodplasma. Bivirkninger ved AHF-behandling forårsaket av immunglobuliner er f.eks. beskrevet av Tilsner et al., Münch. Med. Wschr. 124 (1982) nr. 22, s. 553-557.

AHF utvinnes normalt av det såkalte kryoprecipitat, som hovedsakelig består av fibrinogen, albumin, IgG og IgM, mens AHF utgjør mindre enn 1 % av den totale proteinmengde. Den

spesifikke aktivitet av et kryoprecipitat er typisk 0,1 - 0,3 enh. AHF/mg protein.

Det er kjent at man kan fjerne en del av det unødvendige protein ved felling med glycin eller polyetylenglykol (PEG). Eventuelt kan felling utføres flere ganger, først med den ene og deretter med den annet fellingsmiddel.

Det har således lenge vært kjent å felle AHF med ca. 2 M glycin ved lav temperatur, jfr. Webster et al., se Amer. J. Med. Sc. 250, nr. 6, s. 643-650 (1965). Webster anvendte et kryoprecipitat som ble oppløst i vann og fraksjonert ved lav temperatur (<10°C) med stigende konsentrasjoner av glycin inntil 2,3 molar. Ved denne type felling utnyttet at AHF i kulden utfelles sammen med fibrinogen ved tilsetning av glycin. Herved oppnås en spesifikk aktivitet på 0,3 - 0,5 enh. AHF/mg protein.

Fra beskrivelsen til EP patent nr. 32655, er det kjent at man ved å gjennomføre fraksjoneringen av gjenoppløst kryoprecipitat med 2 M glycin som fellingsmiddel ved høyere temperaturer, såsom 30 - 45°C, først får utfelt en stor del av de andre proteiner, såsom fibrinogen, slik at AHF forblir i supernatanten, hvorfra det kan utvinnes.

Når PEG anvendes som fellingsmiddel, foretas hyppigst en fraksjonert PEG-felling, hvor hoveddelen av fibrinogenet og noe IgM fjernes ved felling med lav PEG-konsentrasjon (2 - 6 %), hvoretter AHF utfelles fra den albumin-holdige supernatant med høy PEG-konsentrasjon (5 - 15 %). Slike PEG/PEG-fellinger er beskrevet av bl.a. Newman et al., Brit. J. Haematology 21, 1972, s. 1; US-patent 3.652.530; DK patentnr. 146.855, FR patent nr. 2.460.305, DK patentans. nr. 3602/81, norsk patentnr. 145.563. Ved disse metoder oppnås et AHF-konsentrat med en spesifikk aktivitet på 1 - 3 enh./mg protein.

Prosesser med flertrinnsfelling, hvor mer enn ett fellingsmiddel anvendes, er likeledes kjent. F.eks. kan glycinfelling ved lav temperatur utføres både før og etter PEG/PEG-fellinger, eventuelt kan glycinfelling utføres såvel før som etter PEG/PEG-fellingene. Dette er beskrevet i US-patentskrift 3.631.018. Vanligvis oppnås herved preparater med en spesifikk aktivitet på 1 - 3 enh./mg protein.

Når det i denne sammenheng felles med glycin ved lav temperatur, utnytttes det AHF-holdige bunnfall, d.v.s. at det ved etterfølgende PEG-fellinger på gjenoppløst AHF-holdig precipitat kun er en lav konsentrasjon av glycin i oppløsningen.

Anvendes glycin ved høy temperatur i forbindelse med PEG-felling, utføres først en glycin-felling som etterlater AHF i supernatanten hvor konsentrasjonen av glycin er høy, og derefter felles AHF derfra med en PEG-felling ved høy PEG-konsentrasjon. Herved oppnås en spesifikk aktivitet på 1 - 3 enh./mg protein.

Ved denne type glycin/PEG-felling ble det oppnådd et konsentrat som ligner et konsentrat oppnådd ved PEG/PEG-felling. Som det fremgår av tabell 1 inneholder 1. fellings-supernatant mer IgM og IgG etter en varm felling med 2 M glycin enn etter en felling med lav PEG-konsentrasjon (4%). Etter slutfellingen med høy PEG-konsentrasjon (9%), inneholder konsentratet fra glycin/PEG-fellingen imidlertid mindre IgM og IgG enn konsentratet fra PEG/PEG-fellingen.

TABELL 1

Sammenligning mellom PEG/PEG- og varm glycin/PEG-felling av AHF fra gjenoppløst kryoprecipitat

Fraksjon	% AHF	% IgM	% IgG
Kryoprecipitat	100	100	100
1. PEG, 4%, supernatant	72	38	55
<u>PEG/PEG</u> , 4 %, 9 % konsentrat	40	24	15
Glycin supernatant	68	76	79
<u>Glycin/PEG</u> , 9 %, konsentrat	36	18	8

Årsaken til dette er ikke tidligere erkjent, men det må antas at den polare aminosyre i glycinsupernatanten virker innsaltende, især på basiske proteiner, således at IgM og IgG ikke så lett utfelles med PEG. Det ved glycin/PEG-fellingen oppnådde konsentrat har imidlertid stadig et uønsket høyt innhold av fibrinogen, IgG og IgM, jfr. tabell 2 nedenfor.

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et høyrent, direkte lyofiliserbart AHF-konsentrat som har en så

høy oppløselighet og spesifikk aktivitet at det kan administreres intravenøst i injeksjonsdoser på 1000 enheter oppløst i 2-5 ml injeksjonsmedium, og som inneholder faktor VIII-kompleksets annen bestanddel faktor VIII: RP, som virker stabiliserende på den koagulasjonsaktive faktor VIII:C.

Dette oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, som kjennetegnes ved det som er angitt i karakteristikken til krav 1.

Det bemerkes at det ikke er en entydig sammenheng mellom et AHF-konsentrats spesifikke aktivitet og dets oppløselighet, idet sistnevnte avhenger av arten av øvrige proteiner, særlig fibrinogen, men at en høy spesifikk aktivitet alt annet likt også vil innebære en høy oppløselighet.

Oppfinnelsen er basert på den overraskende erkjennelse at man kan oppnå et særlig rent AHF-preparat inneholdende såvel faktor VIII:C som faktor VIII:RP, men som i det vesentlige er befridd for andre proteiner, især immunglobuliner, ved å fraksjonere et kryoprecipitat med PEG på en slik måte at det først utfelles hovedparten, fortrinnsvis minst 80 % av fibrinogenet, og at det i et etterfølgende trinn felles med mer PEG i nærvær av et innsaltningsmiddel. Tilsetningen av innsaltningsmidlet medfører ikke i seg selv utfellinger, men på grunn av tilstedeværelsen av innsaltningsmidlet, modifiseres betingelsene under den etterfølgende PEG-felling, slik at det oppnås en skarpere fraksjonering, d.v.s. et renere AHF-preparat med en høy spesifikk aktivitet, jfr. tabell 2 nedenfor. Den høye renhet bevirker at preparatet har en oppløselighet på 45-500, oftest 200-500 enheter Faktor VIII:C (AHF) pr. ml. Da en normal injeksjonsdose er 1000 enheter, kan man således klare seg med ca. 2 - 5 ml injeksjonsmedium. Da oppløseligheten av de beste AHF-preparater på markedet er angitt å være 40 - 50 enheter pr. ml svarende til et injeksjonsvolum på 20 - 25 ml, medfører preparatet fremstilt ifølge oppfinnelsen således en meget betydelig lettelse for pasienten.

TABELL 2

Effekt av glycintilsetning under PEG/PEG-felling fra  
gjenoppløst kryoprecipitat

Prosess	AHF enh./mg	% IgG	IgM	% Fibr.
Kryoprecipitat	0,32	100	100	100
4 % PEG/9 % PEG	2,53	15	24	1
2 M glycin/9 % PEG	2,27	8	18	2
4% PEG/12 % PEG + 2 M glycin	4,36	4	13	0,5

Ved fellingen ifølge oppfinnelsen er glycin således anvendt som innsaltningsmiddel, idet det stabiliserer de uønskede proteiner ved å holde dem i oppløsning, men derimot de hittil kjente metoder utnytter glycins utsaltende effekt på fibrinogen/AHF. Ved anvendelse av innsaltningsmiddel under en PEG/PEG-felling oppnås altså en mer selektiv utfelling av AHF.

Uten å ville være bundet til noen bestemt teori antas det at innsaltningsmidlets virkning beror på at det øker forskjellen i overflateladning mellom Faktor VIII og de øvrige proteiner, særlig IgG.

Det er viktig å fjerne hovedparten av fibrinogenet i første trinn, fordi AHF-preparatet ellers ville være sterkt forurenset med fibrinogenet og fordi tilstedeværelsen av fibrinogen i annet trinn vil motvirke innsaltningseffekten og hindre en selektiv utfelling av Faktor VIII.

Som innsaltningsmiddel ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen benyttes hensiktsmessig en aminosyre, spesielt basiske aminosyrer, fortrinnsvis lysin eller arginin tilsatt i form av hydrokloridet. Andre anvendelige aminosyrer er histidin, samt polare aminosyrer såsom serin, glutamin, glycin og  $\epsilon$ -aminoheksansyre. Andre anvendelige innsaltningsmidler er karbohydrater såsom mono- eller disakkarider, f.eks. glukose og sakkrose, men også oligosakkarider samt sukkeralkoholer, f.eks. sorbitol og glycerol.

En oversikt er gitt i tabell 3.

TABELL 3

Effekt av innsaltningsmidler på PEG/PEG-felling  
av AHF fra gjenoppløst kryoprecipitat

Innsaltningsmiddel	Spes. aktivitet enh./mg	% utbytte av AHF fra plasma
Intet	2,53	18
2 M glycin	4,36	17
0,5 M lysin	8,4	18
0,5 M arginin	7,0	14
1,0 M $\epsilon$ -aminoheksansyre	5,0	10
1,5 M glukose	3,85	18
1,0 M sakkarose	5,35	20

Det foretrukne innsaltningsmiddel er lysin-HCl. På tegningen er vist lysins innflytelse på PEG/PEG-felling av AHF uttrykt som henholdsvis enh. AHF/mg protein (fig. 1) og % utbytte i forhold til kryoprecipitatet ved forskjellige lysinkonsentrasjoner (fig. 2). Lysin tilsettes fortrinnsvis i konsentrasjoner på 0,1 - 0,9, spesielt 0,4 - 0,8, helst 0,5 - 0,7 mol/l.

Som det fremgår av fig. 1, er det proporsjonalitet mellom tilsatt lysinmengde og spesifikk aktivitet av sluttproduktet, men selv små lysinmengder har en klar effekt. Som det fremgår av fig. 2 faller utbyttet av AHF ved den anvendte PEG-konsentrasjon imidlertid, hvis det anvendes mer enn 0,7 M lysin, idet denne mengde lysin også virker innsaltende på AHF.

Et annet foretrukket innsaltningsmiddel er arginin-HCl, hvis innflytelse på PEG/PEG-fellingen av AHF fremgår av nedenstående tabell 4, hvor det sees at tilfredsstillende utbytter oppnås ved konsentrasjoner på 0,2 - 0,8. Under hensyn til utbyttet er den foretrukne mengde 0,3 - 0,5, spesielt 0,4 mol/l.

TABELL 4  
Arginins innflytelse på PEG/PEG-felling av AHF

<u>Mol arginin/l</u>	<u>% utbytte fra plasma</u>	<u>enh. AHF/mg protein</u>
0	20	2,3
0,2	20	4,9
0,4	17	6,4
0,6	14	6,1
0,8	4	4,6

De anvendte konsentrasjoner av PEG og innsaltningsmiddel samt pH under fellingen avhenger særlig av det anvendte innsaltningsmiddel, idet det som generell regel kan sies at de mer ladete innsaltningsmidler kan anvendes i mindre konsentrasjoner. Den valgte innsaltningsmiddelkonsentrasjon hviler på et kompromiss, idet man ved høye konsentrasjoner kan redusere IgG-mengden nesten fullstendig, men samtidig innsaltes også en del Faktor VIII, hvorved utbyttet reduseres.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes PEG med en molekylvekt på 200 - 20.000, fortrinnsvis 2.000 - 12.000, spesielt 3.000 - 6.000, men PEG 3000 foretrekkes. PEG-konsentrasjonen i det første fellingstrinn er 2 - 6 vekt %, fortrinnsvis ca. 4 vekt % og i det annet trinn 6 - 20 vekt %, fortrinnsvis ca. 12 vekt %. pH under første fellingstrinn kan være 6,0 - 8,5, fortrinnsvis 6,2 - 6,6, spesielt 6,4, og under annet trinn 5,0 - 8,5, fortrinnsvis 6,0 - 6,6, spesielt ca. 6,3.

Temperaturen i det første fellingstrinn kan være 6 - 22°C, fortrinnsvis 18 - 22°C. I annet fellingstrinn er temperaturen også fortrinnsvis 18 - 22°C (romtemperatur).

Ved utvinningen av det omtalte Faktor VIII-konsentrat kan man anvende kryoprecipitat fra humant blodplasma eller andre Faktor VIII-holdige blodfraksjoner, likesom man kan anvende plasmafraksjoner fra dyrearter, f.eks. gris. I dette tilfelle vil man normalt ikke anvende kryoprecipitatet, men en blodfraksjon oppnådd f.eks. ved PEG-felling.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen skal i det følgende forklares nærmere ved hjelp av noen eksempler, som også illustrerer opparbeidelsen av konsentratet. Til preparatfrem-



stilling kan AHF-oppløsningen om ønsket underkastes en varmebehandling i 10 timer ved 60°C i nærvær av en passende stabilisator for å oppnå en hepatitis-sikring og/eller om ønsket frysetørring.

#### EKSEMPEL 1

Kryoprecipitat fra 600 ml human blodplasma inneholdende 240 enheter Faktor VIII:C gjenoppløses i 28 ml citrat/glukosebuffer og befris for protrombinkompleks ved adsorpsjon med  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Derefter tilsettes 4 vekt % PEG 3000. pH justeres til 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og lysin-HCl tilsettes til en konsentrasjon på 0,55 mol/l. Ytterligere 8 vekt % PEG 3000 tilsettes, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter inkubering i 45 minutter ved romtemperatur, isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i citrat/glukose-NaCl, pH 7,8. Det gjenoppløste bunnfall som inneholdt 112 enheter faktor VIII:C og 9 mg totalprotein, har således en spesifikk aktivitet på 12 enheter Faktor VIII:C (AHF) pr. mg protein, og utbyttet av Faktor VIII:C fra plasma er 20 %. Det ble ikke foretatt oppløselighetsbestemmelse, men det må antas at oppløseligheten er minst 200 enheter Faktor VIII:C/ml, jfr. eksempel 5 og 6.

Disse resultater er opptatt i nedenstående tabell 5 sammen med resultatet for sammenligningsforsøk uten lycintilsetning. Tabellen viser at det ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan oppnås en vesentlig økning i spesifikk aktivitet og en reduksjon av innholdet av immunglobulin G i forhold til en PEG/PEG-felling uten tilstedeværelse av innsaltningsmiddel.

#### EKSEMPEL 2

30 ml kryo-oppløsning oppnådd analogt med eksempel 1 og adsorbent med  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , tilsettes 4 vekt % PEG 3000. pH justeres til 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og "innsaltningsmiddel" tilsettes. Derefter tilsettes ytterligere 8 vekt % PEG 3000, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter

inkubering i 45 minutter ved romtemperatur isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i citrat/glukose-NaCl, pH 7,8.

Tabell 6 angir de oppnådde resultater for forskjellige innsaltningsmidler. Det ble ikke foretatt oppløselighetsbestemmelser, men det antas at oppløseligheten er minst 200 enheter Faktor VIII:C/ml, jfr. eksempel 5 og 6.

TABELL 5

n = 3 (Middeltall av 3 forsøk)	Enheter Faktor VIII:C i sluttprodukt *	mg protein i sluttpro- dukt *	derav IgG mg	% Faktor VIII:C fra plasma	Spesifikk aktivitet enheter/mg protein
4% PEG - 0 1/2% PEG	109	38	10	19	2,06
4% PEG - 12% PEG	104	74	30	18	1,40
4% PEG - 12% PEG med 0,55 M lysin-HCl	112	9	0,3	20	12,44

\* bestemt ved OD<sub>280</sub>,  $E_{280}^{1\%} = 10$

10

TABELL 6

Innsaltningsmiddel mol/l	Enheter Faktor VIII:C i sluttprodukt *	mg protein i sluttpro- dukt *	derav IgG mg	% Faktor VIII:C fra plasma	Spesifikk aktivitet enheter/mg protein
intet	108	108	24	19	1,0
2M glycin	102	21	2	18	4,9
1,5 M lysin - HCl	51	2,5	1	9	20,0
1,0 M sakkarose	123	29	5	22	4,2
0,35 M arginin	108	17		19	6,4

169875

EKSEMPEL 3

Kryoprecipitat fra 2,5 l plasma gjenoppløses i 100 ml citrat/glukosebuffer og befris for protrombinkompleks ved adsorpsjon med  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Det tilsettes 4 vekt % PEG 3000. pH justeres til 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og arginin-HCl tilsettes til en konsentrasjon på 0,40 mol/l. Ytterligere 8 vekt % PEG 3000 tilsettes, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter inkubering i 45 minutter ved romtemperatur isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i 20 ml citrat/sakkarose/NaCl, pH 7,8. Konsentratet inneholder 360 enheter Faktor VIII:C og 52 mg protein (spesifikk aktivitet 7 enh./mg). Det ble ikke foretatt bestemmelse av oppløseligheten av konsentratet, men det antas å være minst 200 enheter/ml, jfr. eksempel 5 og 6.

EKSEMPEL 4

Kryoprecipitat fra 2,5 l plasma gjenoppløses i 100 ml citrat/glukosebuffer og befris for protrombinkompleks ved adsorpsjon med  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Det tilsettes 4 vekt % PEG 3000. pH justeres til 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og lysin HCl tilsettes til en konsentrasjon på 0,55 mol/l. Ytterligere 8 vekt % PEG 3000 tilsettes, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter inkubering i 45 minutter ved romtemperatur, isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i 5 ml citrat/sakkarose/NaCl, pH 7,8. Konsentratet inneholder 460 enh. Faktor VIII:C og 30 mg protein (spesifikk aktivitet 15 enh./mg). Det ble ikke foretatt bestemmelse av oppløseligheten av konsentratet, men det antas å være minst 200 enheter/ml, jfr. eksempel 5 og 6.

EKSEMPEL 5

Kryoprecipitat fra 80 kg plasma gjenoppløses i 2500 ml citrat-buffer og befries for protrombinkompleks ved adsorpsjon med  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Det tilsettes 4 vekt% PEG 3000. pH justeres til 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og lysin-HCl tilsettes til en konsentrasjon på 0,55 mol/l. Ytterligere 8 vekt% PEG 3000 tilsettes, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter inkubering i 45 minutter ved romtemperatur, isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i 60 ml citrat/sakkarose/NaCl. Oppløsningen sterifiltreres og dispenseres i 15 hetteglass. Etter frysing og frysetørkning inneholder hvert hetteglass 1000 enh. AHF med en spesifikk aktivitet på 37 enh./mg protein.

Da de ialt 15.000 enh. AHF er utvunnet av 60 ml oppløsning, kan det fastslåes at oppløseligheten er minst 250 enh. pr. ml.

EKSEMPEL 6

Kryoprecipitat fra 13 liter plasma gjenoppløses i 525 ml citrat/glucose-buffer og befries for protrombin-kompleks ved adsorpsjon ved  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Det tilsettes 4 vekt% PEG 3000. pH innstilles på 6,4 med 0,5 M HCl, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved romtemperatur. Utfelt protein fjernes ved sentrifugering, og lysin-HCl tilsettes til en konsentrasjon på 0,55 mol pr. liter. Ytterligere 8 vekt% PEG 3000 tilsettes, og pH justeres til 6,3 med 0,1 M NaOH. Etter inkubering i 45 minutter ved romtemperatur isoleres bunnfallet ved sentrifugering og gjenoppløses i 2,1 ml citrat/sakkarose/NaCl, pH 7,8. Konsentratet, som er på 3,1 ml, inneholder 2180 enh. FVIII:C og 81 mg protein. Oppløseligheten er således 703 enheter pr. ml, og den spesifikke aktivitet 27 enh./mg.

EKSEMPEL 7

I dette eksempel undersøkes det hvorvidt den innsaltende virkning av glycin kunne forbedres ved tilsetning av NaCl, som hever ionestyrken, og hvorvidt NaCl, som er et kjent innsaltning-middel, alene har tilstrekkelig innsaltende virkning under en PEG-felning til å føre til et ønsket konsentrat.

For ytterligere å variere prosessbetingelsene ble det valgt å gjennomføre felningen ved lav temperatur (6-9°C).

50 g kryoprecipitat gjenoppløses i 200 ml destillert H<sub>2</sub>O ved romtemperatur. 12,3 ml 1,3% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> og 7,9 g PEG 3000 (3%) tilsettes. pH justeres til 6,7 med 1 M HAC, og blandingen nedkjøles til 10°C. Etter nedkjøling fjernes bunnfall ved sentrifugering i 15 minutter ved 9°C. Ytterligere 8% PEG, 2 M glycin (13%) og 14% NaCl tilsettes, hvorefter pH justeres til 5,7, og blandingen nedkjøles til 6°C. Bunnfallet isoleres ved sentrifugering i 15 minutter ved 6°C og gjenoppløses i 50 ml (1/5 kryo vol.) 5mM citrat, 0,13 M NaCl og 0,1 M glycin, pH 7,3.

FVIII og proteininnholdet i det gjenoppløste konsentrat var lavt. Derfor ble det med varierende NaCl- og glycin-konsentrasjonen undersøkt om innsaltningen som forventet skyldes glycin. Som det fremgår av nedenstående tabell ble FVIII bare i liten grad utfelt uten NaCl. NaCl-tilsetning alene medfører imidlertid ikke øket proteinutfelning (som PEG-tilsetning). Tvert i mot virker NaCl i høy grad innsaltende. Ved den lave temperatur medvirker glycin til å felle FVIII, men den høye spesifikke aktivitet kan ikke oppnåes uten NaCl-tilsetning.

Virkning av glycin og varierende NaCl-konsentrasjon.

% NaCl	+13% glycin			uten glycin		
	mg* protein	%FVIII:C utbytte	Spes.akt. enh./mg	mg* protein	%FVIII:C utbytte	spes.akt. enh./mg
0	5,86	5	0,22	6,50	14,4	0,58
5	3,96	26	1,74			
10	2,26	58	6,73	3,89	15,9	1,07
12	2,18	41	4,90			
14	0,88	17	5,02	2,82	5,2	0,49
Kryoprec.	100		0,58			
3% PEG/ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> supernatant		73	0,77			

% bestemt som E<sub>280</sub>

EKSEMPEL 8 (Bestemmelse av faktor VIII:PR-innholdet)

Det fremgår av Zimmermann, US patent 4 361 509 at det for å oppnå en adskillelse av de to komponenter i faktor VIII-komplekset må benyttes spesifikke rensningsmetoder, så som immunadsorpsjon eller ionebyttekromatografi.

I de foregående eksempler hvor det som utgangsmateriale anvendes (oppløst) kryoprecipitat, som således inneholder faktor VIII-komplekset, foretaes det på intet tidspunkt slike rensninger, og det er derfor åpenbart for en gjennomsnittsfagmann at de i eksemplene oppnådde faktor VIII-konsentrater stadig inneholder såvel koagulasjonsaktiv faktor VIII:C som som Willebrand-faktoren faktor VIII:RP.

Imidlertid ble det ikke gjennomført målinger av faktor VIII:RP-innholdet, og det er derfor ikke mulig å tilføre tallverdier for disse i de eksisterende eksempler.

Det er imidlertid gjennomført faktor VIII:C og faktor VIII:RP-bestemmelse på en rekke AHF-preparater fremstilt ifølge oppfinnelsen, som forhandles under betegnelsen "NORDIOCTO®" og som er fremstilt analogt med eksempel 5, det vil si i enhetsdoser på 1000 enheter faktor VIII:C ( $\pm 20\%$ ).

Det ble oppnådd følgende resultater:

<u>Preparat</u>	<u>FVIII:RP, enh./dose</u>	<u>FVIII:C, enh./dose</u>
44102	727	847
44203	936	1023
44301	825	1161
44302	942	1109
44401	566	909
44402	808	1034

FVIII-RP er bestemt ved rakettimmunelektroforese med antistoff fra DAKO (A 082). Som standard er anvendt en pool av normal plasma (ca. 1 enh. FVIII-RP/ml).

FVIII:C er bestemt ved en ett-trinnskoagulasjonsundersøkelse. Som standard er anvendt en pool av normal plasma (ca. 1 enh. FVIII:C/ml).

Det er lett å se for en fagmann at det kan oppnås en effekt av innsaltningsmiddel på en PEG/PEG-felling under andre

betingelser enn anført ovenfor. Ved annerledes pH og temperatur, skal det således anvendes andre konsentrasjoner av PEG og innsaltningsmiddel. De mest hensiktsmessige betingelser kan fastlegges ved forsøk.



## P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et konsentrat av den antihemofile faktor VIII (AHF), som er i det vesentlige fritt for denaturert AHF og andre plasmaproteiner som er til stede i utgangsmaterialet for konsentratet, men ikke for faktor VIII:RP, hvilket konsentrat er lyofiliserbart uten proteintilsetning, og oppviser en oppløselighet i et vandig injeksjonsmedium på 45-500 enheter AHF pr. ml og en spesifikk aktivitet på 3,85-50 enheter AHF pr. mg protein som stammer fra utgangsmaterialet for konsentratet, ved hvilken fremgangsmåte en oppløsning av et kryopresipitat fra blodplasma eller en annen faktor VIII-holdig blodfraksjon renses for å fjerne prothrombin og derefter underkastes fraksjonering med polyetylenglykol, PEG, omfattende et trinn for utfelning av hovedparten av fibrinogen ved hjelp av 2-6 vekt% PEG 200-20.000 ved 6-22°C og pH 6,0-8,5 og et etterfølgende trinn for utfelning av AHF, fortrinnsvis ved 18-22°C,

k a r a k t e r i s e r t v e d at supernatanten fra den førstnevnte PEG-felning felles med 6-20 vekt% PEG 200-20.000 ved pH 5,0-8,5 i nærvær av et innsaltningsmiddel valgt blant aminosyrer, fortrinnsvis basiske, karbohydrater og sukkeralkoholer, hvorpå det utskilte bunnfall med konsentrert innhold av AHF utvinnes og om ønsket, frysetørres.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som innsaltningsmiddel anvendes lysin-HCl eller argenin-HCl i en mengde svarende til en lysin- eller argenin-konsentrasjon på henholdsvis 0,1-0,9 og 0,2-0,8 mol pr. liter, fortrinnsvis 0,4-0,8 og 0,3-0,5 mol pr. liter.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som innsaltningsmiddel anvendes et karbohydrat, fortrinnsvis et mono- eller disakkarid.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som innsaltningsmiddel anvendes sakkarose.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det i annet felningstrinn tilsettes PEG svarende til en total konsentrasjon på ca. 12 vekt%.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1-5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den pH som anvendes under annet felningstrinn er 6,0-6,6, især 6,3.

