



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2300497 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/755 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.12.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.08.08
(86)	Europeisk søknadsnr	09769279.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.06.24
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.03.30
(30)	Prioritet	2008.06.24, EP, 08158893 2008.06.24, US, 129402 P
(84)	Utpekete stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekete samarbeidende stater	RS
(73)	Innehaver	Octapharma AG, Seidenstrasse 2, 8853 Lachen, Sveits
(72)	Oppfinner	BORGVALL, Carin, Nordenflychtsvägen 55, S-11275 Stockholm, Sverige ERICSSON, Ulrika, Nordenflychtsvägen 55, S-11275 Stockholm, Sverige GILLJAM, Gustav, Nordenflychtsvägen 55, S-11275 Stockholm, Sverige JERNBERG, Mats, Nordenflychtsvägen 55, S-11275 Stockholm, Sverige WINGE, Stefan, Nordenflychtsvägen 55, S-11275 Stockholm, Sverige
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å rense koagulasjonsfaktor VIII
(56)	Anførte publikasjoner	AU-B2- 687 451, EP-A- 1 707 634, US-A- 5 605 884, WO-A-2005/082483, WO-A-2005/121163 WO-A-2008/008975 , WO-A-2009/007451, WO-A-94/08686 ARAKAWA ET AL: "Induced binding of proteins by ammonium sulfate in affinity and ion-exchange column chromatography" JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 70, no. 3, 8 March 2007 (2007-03-08), pages 493-498, XP005917462 ISSN: 0165-022X BURTON S ET AL: "Salt-independent adsorption chromatography: new broad-spectrum affinity methods for protein capture" JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, AMSTERDAM, NL, vol. 49, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 275-287, XP002987338 ISSN: 0165-022X GENG X ET AL: "Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 866, no. 1-2, 15 April 2008 (2008-04-15), pages 133-153, XP022595824 ISSN: 1570-0232 [retrieved on 2008-02-05] JOHANSSON B-L ET AL: "Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation aimed for capture of positively charged biomolecules at high-salt conditions" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 1016, no. 1, 17 October 2003 (2003-10-17), pages 35-49, XP004458172 ISSN: 0021-9673 JOHANSSON B-L ET AL: "Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation media aimed for capture of negatively charged biomolecules at high salt conditions" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 1016, no. 1, 17 October 2003 (2003-10-17), pages 21-33, XP004458171 ISSN: 0021-9673

FREMGANGSMÅTE FOR Å RENSE KOAGULASJONSFAKTOR VIII

Beskrivelse

- 5 Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å rense koagulasjonsfaktor VIII (forkortet som FVIII) og en fraksjon inneholdende FVIII som er oppnådd ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Bakgrunn for oppfinnelsen

- 10 Hemofili er en gruppe av arvelige genetiske lidelser som svekker kroppens evne til å kontrollere blodsammenløping eller koagulering. I sin mest vanlige form, Hemofili A, hvor koagulasjonsfaktor FVIII er manglende, forekommer Hemofili A i omtrent 1 av 5000-10000 fødte guttebarn. FVIII proteinet er en essensiell kofaktor i blodkoagulasjon med multifunksjonelle egenskaper. Mangelen på FVIII kan behandles
15 med plasmaavledede konsentrater av FVIII eller med rekombinant produsert FVIII. Behandling med FVIII konsentrater har ført til et normalisert liv for hemofilipasienter. Historisk sett er hemofili A blitt behandlet med FVIII som stammer fra humant blodplasma. I blodplasma, under normale forhold, er FVIII molekylet alltid assosiert med dets kofaktor; von Willebrandt faktor (vWf), som stabiliserer FVIII molekylet fra
20 ulike former av degenerering.

- Plasmaavledede FVIII produkter forekommer på markedet med forskjellige renheter og med større eller mindre mengder av vWf til stede. Vanligvis inneholder produkter med lav mengde av vWf tilsatt humant albumin og/eller andre stabilisatorer som
25 inkluderer økt saltkonsentrasjon for å stabilisere FVIII molekylet. Metodene anvendt for å rense FVIII var normalt en kombinasjon av forskjellige presipiteringsmetoder slik som kryopresipitering, aluminiumhydroksid presipitering osv. og kromatografitrinn, hovedsakelig ionebytter-, affinitets- og gelfiltreringstrinn.
- 30 For å forbedre FVIII produkter ble affinitetskromatografi anvendt, som effektivt fjernet kontaminanter til en høy grad av FVIII renhet som inkluderer muligheten til å redusere også vWf (Farrugia et al., Biotechnology and plasma fractionation industri; The impact of advances in the production of coagulation FVIII. Biotechnology, Vol. 3, No. 1, February 1993). Ulempen med immunoaffinitetskromatografi var at den er relativt
35 kostbar og at de monoklonale antistoffer anvendt som affinitetsligander var av animalsk opprinnelse.

På midten av 80 tallet var der noen virustransmisjoner assosiert med plasmaavledede FVIII produkter. Selv om dette problem ble løst gjennom implementering av spesifikke virusreduksjonstrinn, var dette startpunktet på utviklingen av rekombinante FVIII produkter (rFVIII). I 90 årene ble det første rFVIII produktet markedsført, og opp til
 5 dags dato er der tre forskjellige rFVIII produkter (to full-lengde molekyler og ett B-domaine deletert molekyl hvor en inaktiv del av FVIII molekylet er blitt fjernet for å øke produktiviteten av vertcellen (Eriksson et al., The manufacturing process for B-domain deleted recombinant FVIII, Seminars in Hematology, Vol 38, No 2, Suppl. 4 (April), 2001: pp24-31)) med en høy renhetsgrad (alle uten vWf).

10

Rensemetsmetodene anvendt for å rense rFVIII var alle en kombinasjon av ulike kromatografiteknikker (se Bhattacharyya et al., Review article; Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, No. 3, July-September 2003). En var den kjente immunoaffinitetsteknikken (selv om der er
 15 produkter som løser dette, f.eks. med peptidaffinitet (Kelly et al., Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of FVIII) eller et gjæravledet antistoff fragment (VIIISelect FVIII affinitetsharpiks – GE Health care, katalog nr 17-5450 som snart kommer på markedet) som anvendt for plasma FVIII.

20

Da vWf er fraværende i alle rFVIII produkter, må man ta visse forholdsregler for å stabilisere FVIII molekylet mot aktivitetstap (aggregering, proteaser, overflateadsorpsjon osv.). I ett av produktene tilsettes et chelaterende middel (EDTA osv.) for å beskytte FVIII mot degenerering av metalloproteaser (US-A-5 831 026). Tilsetning
 25 av albumin, aprotinin, insulin eller til og med og ko-uttrykke rFVIII med vWf (og fjerne den nedstrøms i rensesyklusen) er strategier som er blitt gjennomført for å øke stabiliteten av rFVIII molekylet (se Bhattacharyya et al., Review article; Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol. 4, No. 3, July-September 2003).

30

En annen strategi (for å opprettholde en prosess uten pattedyr tilsetningsstoffer og chelatdannende midler) er beskrevet i EP-A-1 707 634, hvor en kombinasjon ved økte mengder av salter bidrar til stabiliteten og den høye utvinning av rFVIII produktet (Wang et al, Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of
 35 Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15). Denne teknikken har imidlertid en mulig ufordelaktighet. Det relativ høye saltinnholdet gjør den f.eks. ikke egnet til å prosesseres direkte i en ionebytter uten fortykning (og mulig destabilisering Parti et al., In vitro

stability of recombinant FVIII. Haemophilia (2000), 6, 513-522. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 87, No. 3, Aug 5, 2004).

WO-A-2009/007451 omhandler en rensemetode for FVIII ved anvendelse av en
5 harpiks av blandet form eller multimodal harpiks. Rensemetoden er basert på å bringe FVIII proteinet i kontakt med en multimodal harpiks eller harpiks av blandet form som inneholder ligander som omfatter en hydrofob del og en negativt ladet del og eluering av nevnte FVIII protein med en elueringsbuffer som inneholder minst 1,5 M salt og minst 40 % (vekt/volum) av etylenglykol, propylenglykol eller en blanding derav, og
10 kalsiumioner.

EP-A-1707634 omhandler en metode for å isolere rekombinant produserte proteiner ved blant annet forskjellige metoder slik som immunoaffinitetskromatografi, affinitetskromatografi, proteinpresipitering, bufferutvekslinger, ionebytterkromatografi, hydro-
15 fob interaksjonskromatografi, hydrofobe/ionebytterkromatografi-medier av blandet form, chelatdannende kromatografi, karbohydrat affinitetsliknende lektin- eller heparin-affinitetskromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi, elektroforese, dialyse, forskjellige presipiteringsmidler slik som polyetylenglykol, ammoniumsulfat, etanol, hydroksy apatitt adsorpsjon, filtermembran adsorpsjon, ligander koplet til
20 magnetiske partikler osv. Den identifiserer imidlertid særlig kromatografiske rensetrinn.

WO-A-2005-082483 omhandler en fremgangsmåte for å rense antistoffer fra en eller flere forurensninger i en væske, hvilken fremgangsmåte omfatter å bringe nevnte
25 væske i kontakt med en første kromatografiharpiks som omfatter en bærer hvortil multimodale ligander er blitt immobilisert for å adsorbere antistoffene til harpiksen, hvor hver multimodale ligand omfatter minst en kationbyttergruppe og minst ett aromatisk eller heteroaromatisk ringsystem. Et elueringsmiddel tilsettes for å frigi antistoffene fra harpiksen, og eluatet bringes i kontakt med en andre kromatografi-
30 harpiks.

WO-A-2005/121163 omhandler en fremgangsmåte for isoleringen av ett eller flere proteiner fra en proteinoppløsning. Prosessen omfatter trinnene med å tilveiebringe en proteinoppløsning som omfatter ett eller flere spesifikke proteiner og med en for-
35 håndsinnstilt pH og en forhåndsinnstilt ionestyrke eller konduktivitet, tilføre proteinoppløsningen til en kolonne med pakket sjikt eller ekspandert sjikt som omfatter et

adsorpsjonsmiddel, og med oppnåelse av ett eller flere proteiner fra kolonnen, hvor proteinoppløsningen er blitt supplert med en alkohol.

5 **Beskrivelse av oppfinnelsen**

Ett formål med den foreliggende oppfinnelse var å unngå manglene med de tidligere kjente renseprosessene ved å tilveiebringe en ny prosess. Et annet formål med oppfinnelsen var å tilveiebringe en prosess for å rense FVIII, særlig fra kilder med et høyt saltinnhold, særlig da de anvendes for å fremstille rekombinant FVIII.

10

Dette gjennomføres ved en fremgangsmåte for å rense koagulasjon-FVIII i en rensekvens hvor det anvendes kromatografi hvor minst en kromatografi gjennomføres ved anvendelse av en multimodal harpiks. Betegnelsen "multimodal harpiks" som anvendt heri, betyr et kromatografimaterial som har en bærer og enheter bundet til bæreren, hvilke enheter interagerer med kjemiske grupper på substansene som skal separeres og er i stand til å interagere med FVIII i en blanding ved ioniske interaksjoner og andre typer av interaksjoner slik som hydrogenbinding og/eller hydrofob interaksjon.

15

Ifølge oppfinnelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å rense eller anrike koagulasjon-FVIII ved å anvende kromatografi som omfatter trinnene med å tilveiebringe en fraksjon inneholdende FVIII i en vandig oppløsning med en høy ionestyrke; bringe fraksjonen som inneholder FVIII i kontakt med en multimodal harpiks, eventuelt vaske den multimodale harpiks med adsorbert FVIII med en vandig vaskebuffer; eluere FVIII som inneholder fraksjoner med en vandig elueringsbuffer som omfatter minst en aminosyre som er positivt ladet ved pH 6 til 8; og eventuelt samle FVIII inneholdende fraksjoner i rensset eller anriket form.

25

Multimodal (eller blandet-modus) kromatografi er et verktøy for å rense proteiner.

30

Beskrevet i f.eks. Manufacturer data sheet GE Health Care (11-0035-45AA) Cato Adhere, Manufacturer data sheet GE Health Care (28-9078-88AA) Capto MMC og patentsøknad EP 07114856.3 "A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins".

35

Teknikkene har bestemte fordeler og ufordelaktigheter. En fordel er muligheten til å binde proteiner innen en høyere saltkonsentrasjon, sammenlignet med den oftere anvendte ionebytterkromatografi. En ufordelaktighet er at elueringen ofte inkluderer

relativt barske betingelser som f.eks. pH under eller over nøytral pH, alene eller i kombinasjon med andre elueringsparametere. FVIII er et relativt ustabilt protein, f.eks. med hensyn til pH verdier utenfor den nøytrale verdien; pH 6-8 (Wang et.al, Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of Pharmaceuticals, 5 259 (2003), 1-15.). Oppfinnelsen løser dette problemet ved milde elueringsbetingelser i et pH område omkring nøytral pH som bibeholder aktiviteten av FVIII molekylet og forenkler bruk av multimodal kromatografi i kombinasjon med stabiliseringseffektene av den økte saltkonsentrasjonen, beskrevet i f.eks. EP-A-1 707 634.

10 I henhold til en utførelsesform av oppfinnelsen kan den multimodale kromatografi gjennomføres i en kromatografikolonne. Dette kan betraktes som et første oppfangningstrinn. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan også gjennomføres på en batch måte. Den foreliggende oppfinnelse forenkler også en fremgangsmåte for å rensen uten tilsetning av human avlede eller animalsk avlede

15 stabiliseringstilsetningsstoffer og bruken av en hel prosess som har fravær av dette (monoklonalt antistoff-baserte immunoaffinitetsharpikser). Bruken av den multimodale harpiks, særlig som oppfangningstrinn, forenkler også en høyere bindingskapasitet sammenlignet med konvensjonelle ionebyttere, som resulterer i et mere konsentrert produkteluat fra trinnet, som er en fordel for produktstabiliteten.

20

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er typisk relatert til rensingen av rekombinant FVIII (FVIII) særlig B-domene deletert rekombinant FVIII.

FVIII oppløsningen omfatter typisk FVIII i en høy saltkonsentrasjonsoppløsning som 25 tilsvarer en ledningsevne av fra 25 til omtrent 200 mS/cm ved 25°C.

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen anbringes FVIII på den multimodale harpiksen og etter binding til den multimodale harpiksen utføres deretter eluering med en passende buffer.

30

Etter påføring av blandingen som omfatter FVIII og binding av FVIII til den multimodale harpiksen, elueres FVIII molekylet fra den multimodale harpiksen ved å anvende en elueringsbuffer som omfatter minst en aminosyre som er positivt ladet ved en pH 6 til 8, særlig er aminosyren som er positivt ladet ved en pH fra 6 til 8 lysin, arginin 35 og/eller histidin.

Bufferen kan i tillegg omfatte minst en hydroksylgruppe som inneholder organisk forbindelse slik som en alkohol, minst en aminogruppe som inneholder organisk forbindelse slik som en aminosyre, en kilde som tilveiebringer Ca^{2+} ioner, minst en forbindelse for å regulere ionestyrken av bufferen slik som uorganiske salter, f.eks. NaCl, særlig i konsentrasjoner $\leq 1\text{M}$, en ikke-ionisk detergent og en buffersubstans for å regulere pH fra omtrent 6 til omtrent 8, særlig til omtrent en nøytral verdi.

I en ytterligere utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan alkoholen velges fra gruppen av metanol, propanol og etylenglykol; aminosyren kan velges fra gruppen av arginin, lysin og histidin; kilden som tilveiebringer Ca^{2+} kan være CaCl_2 , de uorganiske saltene kan velges fra gruppen av KCl og NaCl; den ikke-ioniske detergent kan velges fra gruppen av Tween 20, Tween 80 og Pluronic F68; buffersubstansen kan velges fra gruppen av natriumcitrat, histidin, HEPES, MES og natriumacetat ved en pH mellom 6-8.

Konsentrasjonen av aminosyren som er positivt ladet ved en pH fra 6 til 8 er særlig til stede i en mengde på minst $>0,4\text{M}$, særlig $>0,5\text{M}$. Dersom konsentrasjoner større enn 1M av den spesielle aminosyren anvendes, fører dette ikke til ytterligere fordeler. Mengden arginin er typisk i området fra omtrent $0,4\text{M}$ til omtrent $1,0\text{M}$, særlig i området fra omtrent $0,7\text{M}$ til omtrent $0,9\text{M}$. Hydroksylgruppen som inneholder organisk forbindelse slik som en alkohol, f.eks. etylenglykol er spesielt til stede i mengder fra 0 % (volum/volum) til 30 % (volum/volum), særlig fra omtrent 5 % til 15 %. Kalsiumionkonsentrasjonen bør være i området fra $0,0001\text{M}$ til omtrent $0,1\text{M}$, særlig fra omtrent $0,001\text{M}$ til $0,03\text{M}$. Konsentrasjonen av forbindelsen for å regulere ionestyrken av bufferen bør være i området for å tilveiebringe en ledningsevne som er fra 15 til omtrent 200 mS/cm ved 25°C . Mengden av ikke-ionisk detergent er typisk i området fra omtrent 0,001 % til 1 %.

I en utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen tilføres en vaskebuffer til den multimodale harpiksen. Denne kan anvendes for å vaske bort kontaminanter og bibeholde FVIII, før FVIII frigis.

I en ytterligere utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inneholder den "multimodale" kromatografiharpiks minst en av de etterfølgende enheter:

- i) en positivt ladet N-benzyl-N-metyletanolamin ligand
- ii) en negativt ladet 2-(benzoylamino)butansyre ligand,
- iii) en fenylpropyl ligand,

- iv) en n-heksyl ligand,
- v) en 4-merkpto-etyl-pyrdin ligand,
- vi) en 3-((3-metyl-5-((tetrahydrofuran-2-ylmetyl)-amino)-fenyl)-amino)-benzosyre ligand eller kombinasjoner derav.

5

Spesielt, i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, er den "multimodale" kromatografi-harpiksen valgt fra de etterfølgende kommersielt tilgjengelig harpikser HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

- 10 I en annen utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er det multimodale kromatografitrinn kombinert med et FVIII affinitetskromatografitrinn hvor affiniteten er tilveiebrakt ved en proteinligand slik som et antistoff fragment som uttrykkes i gjær.

- 15 I henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter rensesekvensen videre trinn for fjerning av patogen/inaktiveringstrinn som omfatter et kjemisk basert inaktiveringstrinn, et størrelsesbasert fjerningstrinn, kromatografitrinn eller kombinasjoner derav, og hvis trinn er basert på ulike fysiologiske egenskaper rettet mot patogenet som skal fjernes.

20

I en særlig utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter rensesekvensen ytterligere de etterfølgende trinn:

- i. anvendelsen av en anionisk membran slik som Sartobind Q, særlig for DNA reduksjon;
- 25 ii. kationisk multimodal harpiks slik som Capto MMC;
- iii en kationbytterharpiks slik som SP Sepharose FF;
- iv. anvendelsen av en sekundær anionisk membran slik som Sartobind Q, særlig for ytterligere DNA reduksjon;
- v. et kjemisk basert inaktiveringstrinn for viruser med lipidkappe, særlig løsnings-
- 30 middel/detergent-inaktiveringen ved å anvende tri-n-butylfosfat og Triton X-100 som omtalt i EP-A-131 740;
- vi. en affinitetsharpiks basert på en proteinligand uttrykt i gjær, slik som VIIISelect eller en anion multimodal kromatografiharpiks slik som Capto Adhere;
- 35 vii. et patogenfiltrerings-fjerningstrinn med en gjennomsnittlig porestørrelse på omtrent 20 nm slik som Planova 20N;
- viii. en anionbytterharpiks slik som Q Sepharose FF;

ix. en størrelsesekskluderingskromatografiharpiks som Superdex 200pg.

I fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er særlig elueringsbetingelsene for kation-
byttertrinnet basert på Ca^{2+} ioner, en konsentrasjon som strekker seg fra 0,15-0,25 M
5 og den totale ledningsevnen for elueringsbufferen som ikke overskrider 25 mS/cm ved
25°C.

Dersom fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendes, er renheten av det oppnåelige
produktet > 4000 IU/mg, etter det siste rensetrinn foretrukket >9000 IU/mg og mere
10 foretrukket >10000/mg protein og <1000 pg/1000 IU FVIII, foretrukket <100 pg/
1000 IU FVIII og mere foretrukket <10 pg/1000 IU FVIII med hensyn til DNA konta-
minering.

En sammensetning er derfor også formålet med oppfinnelsen hvilken sammensetning
15 omfatter en renset rekombinant FVIII som er oppnådd ved fremgangsmåten ifølge
oppfinnelsen (uten tilsetning eller bruk av noen humane eller animalske tilsetnings-
stoffer slik som albumin eller monoklonalt antistoff-baserte immunoaffinitetsligander).

Vedlegg 1 viser et flytskjema for en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen hvor oppfang-
20 ingstrinnet gjennomføres på en multimodal harpiks. En celleduspensjon prosesseres
ved tilsetning av salt, separering av cellene etterfulgt av et DNA reduksjonstrinn, fore-
trukket på en Q membran. Q membranen (f.eks. Sartobind Q fra Sartorius) er en
sterk basisk anionbytter med kvaternære ammoniumgrupper som ionebytterenhet.
Innen spesifikke pH områder og ledningsevneområder binder Q membranen spesifikt
25 DNA, mens produktet (og vertcelleproteiner) forblir i gjennomstrømningen. I
motsetning til konvensjonell ionebytter-kolonnekromatografi, er den ladede liganden
bundet til en membranbærer som forenkler en høy gjennomstrømning og som er
enkel i bruk. Oppfangingstrinnet omfatter metoden ifølge oppfinnelsen ved å anvende
den multimodale harpiksen. Oppfangingstrinnet etterfølges av en separasjon på en
30 kationbytter, SP Sepharose FFTM (GE HealtCare) etterfulgt av en ytterligere DNA
reduksjon på en Q membran. En virusinaktiveringsbehandling ved løsningsmiddel-
detergent metoden (S/D metoden) som f.eks. omtalt i EP-A-131740 gjennomføres og
et ytterligere rensetrinn på f.eks. VIII SelectTM affinitetsharpiks. Et ytterligere
konsentrasjonstrinn/ poleringstrinn gjennomføres på en anionbytterkolonne, f.eks. på
35 Q Sepharose FFTM (GE HealtCare). Det konsentrerte produktet prosesseres deretter på
en gelfiltreringskolonne (f.eks. Superdex 200 p.g.TM (GE HealtCare)) for å bytte buffer

og fjerne potensielle aggregater og fragmenter. Det oppnådde produkt, GF eluat, samles. De respektive trinnene er forklart mere detaljert i eksemplene.

Vedlegg 2 og 3 viser en alternativ utførelsesform hvor det spesifikke affinitetstrinn (VIIISelect™ (GE HealtCare)) som beskrevet i vedlegg 1, erstattes med en multimodal kromatografi; Capto Adhere™ (GE HealtCare). Overraskende utviste rensesekvensen, som beskrevet i vedlegg 2, den samme renhet som rensesekvensen beskrevet i vedlegg 1 (som inkluderer det spesifikke antistoffbaserte affinitetstrinn). Dette resultat ble gjentatt med det samme utgangsmaterialet, som beskrevet i vedlegg 3. Dette viser det store potensialet for bruk av den multimodale renseteknikk mere enn en gang (både i oppfangningstrinnet; Capto MMC™ (GE HealtCare) og i et ytterligere nedstrøms rensetrinn med Capto Adhere™ (GE HealtCare) som beskrevet i vedlegg 2 og 3) ved å anvende de spesifikke elueringsbetingelsene for FVIII, i henhold til oppfinnelsen.

Oppfinnelsen er ytterligere beskrevet ved de etterfølgende ikke-begrensende eksempler.

EKSEMPLER

I alle eksemplene er den faktiske verdi av M (molar) mol/kg (dvs. 10 gram salt tilsettes til 1000 gram vann – ikke 10 gram salt tilsettes vann opp til 1000 ml).

Eksempel 1: Fremstilling av FVIII inneholdende cellesuspensjon.

25 Celler

Cellelinjen som anvendes er et derivat av human embryonisk nyrecelle 293 (HEK 293), som er tilpasset serumfri vekst. Verten, HEK 293F, ble stabilt transfektet med en ekspresjonskassetten som bærer genet for B-domene deletert human FVIII under kontroll av en sterk promotor (EP-A-1 739 179).

30

Dyrkingsmetode

Cellene ble dyrket i et serumfritt medium i vanlig utstyr og i henhold til generelle metoder som er vel kjent i teknikken, f.eks. rystekulturer eller omrørte kulturer i t-kolber, rystekolber og bioreaktorer (engangssystemer og konvensjonelt omrørte tanker) kjørt som batch, fed-batch, perfusjons- eller kontinuerlige kjemostatkulturer (Freshney, R I (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4th ed. Wiley-Liss; Spier, R E ed (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, New York;

Enfors, S-O and Häggström, L (2000) Bioprocess technology: fundamentals and applications, Högskoletryckeriet, Royal Institute of Technology, Stockholm; Vinci, V A and Parekh, S R (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Human Press, USA). Perfusjon av medium ble typisk anvendt for å øke
 5 celletall og produkt titre utover standard batch-kultur nivåer. Produktutbyttet og mengden av vertcelleproteiner avviker avhengig av dyrkingsmåte:

- produkt titret vil typisk øke med celletall
- totalt proteininnhold og DNA innhold vil typisk øke med celletall
- totalt proteininnhold og DNA innhold kan også øke med dyrkingslengde
- 10 - batch-kulturer akkumulerer protein og DNA; ikke noe tilsettes eksternt, ikke noe fjernes
- perfusjonsprosesser renser cellekulturer fra metabolitter, protein, DNA og andre forurensninger; filtre eller cellesentrifuger ble typisk anvendt for celle-retensjon.

15

Da det rekombinante produkt er assosiert med cellene, høstes cellesuspensjon. Egenskapene til det høstede produkt (produkt titre og forurensninger som nevnt over) avviker avhengig av den dyrkingsmetoden som anvendes.

20 Eksempel 2: Fremstilling av cellefritt FVIII utgangsmaterial

Det cellefrie FVIII utgangsmaterialet for den kromatografiske rensing ble oppnådd som følger. En stamopløsning av natriumklorid og kalsiumklorid ble tilsatt til cellesuspensjonen, fremstilt i henhold til eksempel 1, til å gi sluttkonsentrasjoner på henholdsvis
 25 0,3M og 30 mM, og en ledningsevne på 30-40 mS/cm ved 25°C. Oppløsningen ble blandet i omtrent 30 minutter, hvorefter cellene ble fjernet ved sentrifugering og etterfulgt av et filtreringstrinn for å fjerne eventuelle gjenværende cellerester (for å inhibere tilstopping av de etterfølgende kolonnetrinn).

30 Eksempel 3: Elueringsbetingelser for multimodal kationharpiks Capto MMC

De etterfølgende forsøksserier ble gjennomført for å sammenligne forskjellige elueringsbetingelser på den multimodale kationharpiks Capto MMC.

35 Eksempel 3a, evaluering av forskjellig saltkonsentrasjon og pH for å eluere FVIII fra Capto MMC harpiks (referanseeksempel).

Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 10 cm i en C10/20 kolonne (1 kolonnevolum (CV) = 8 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5317)

5

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2.

10 Ekvibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 7,0, ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

Kolonnen ble ekvibrert med ekvibreringsbuffer etterfulgt av påføring av utgangsmaterialet med en strømningsrate på 5 ml/min. FVIII bindes til harpiksen ved disse bufferbetingelser (ingen FVIII kunne detekteres i gjennomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 1, og den resulterende mengden av FVIII som kommer ut fra kolonnen ble analysert med en FVIII:C metode og beregnet i % i forhold til den påførte mengden av FVIII.

20

Tabell 1

Elueringsbetingelser	Eluert volum (CV)	FVIII:C funnet i eluat (%)
0,1 M NaCl, pH 6,5*	10	0
0,3 M NaCl, pH 7,0*	90	0
1 M NaCl, pH 6,5*	20	0
2 M NaCl, pH 6,5** (OgH07-626)	15	0

*Elueringsbuffere inkluderte 0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂ og 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80

25

**Elueringsbufferen inkluderte 0,05 M L-histidin, 0,05 CaCl₂ og 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80

Konklusjon Referanseeksempel 3a

Som det fremgår i tabell 1, er bindingen av FVIII til Capto MMC kolonnen ikke en ionisk interaksjon.

Referanseeksempel 3b, evaluering av elueringsbetingelser for Capto MMC, forskjellig NaCl konsentrasjon med 50 % etylenglykol konstant.

Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket til en sjukthøyde på 2 cm i en XK16/20 kolonne (1 kolonnevolum (CV) = 4 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5317).

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII oppnådd som beskrevet i eksempel 2.

Ekviliberingsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 7,0, ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

Kolonnen ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av påføring av utgangsmaterialet med en strømningsrate på 1 ml/min. FVIII bindes til harpiksen under disse bufferbetingelser (ikke noe FVIII kunne detekteres i gjennomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 2 og den resulterende mengden av FVIII som kom ut fra kolonnen ble analysert med en FVIII:C metode og beregnet i % i forhold til den anvendte mengden av FVIII.

Tabell 2

Elueringsbetingelser*	Eluert volum (CV)	FVIII:C funnet i eluat, (%)
0,5 M NaCl + 50 % etylenglykol pH 6,5	3	23
1 M NaCl + 50 % etylenglykol pH 6,5	6	52
1,5 M NaCl + 50 % etylenglykol pH 7,5	4	73
1,5 M NaCl + 50 % etylenglykol pH 6,5	2	82
2,5 M NaCl + 50 % etylenglykol pH 6,5	3	84

*Alle elueringsbufferne inkluderte 0,02 M L-histidin, 0,02 M CaCl₂ og 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80

Konklusjon Referanseeksempel 3b

5 Som det fremgår fra tabell 2, kan bindingen av FVIII til Capto MMC kolonnen inhiberes ved en kombinasjon av etylenglykol og NaCl. 50 % etylenglykol er vanligvis anvendt som elueringsbuffer for konvensjonelle proteinbaserte affinitetsharpi-
 10 kser. Elueringen av FVIII forbedres dersom etylenglykol kombineres med en økt natriumkloridkonsentrasjon opp til 1,5 M. To ulike pH verdier som ble testet (pH 6,5 og 7,5) forandrer ikke FVIII utvinningen, som indikerer at pH ikke kan anvendes som en elueringsparameter for FVIII, innen stabilitetsgrensene for proteinet (omtrent 6-8). En økning av NaCl konsentrasjonen til 2,5 M forbedrer ikke utvinning av FVIII:C i eluatet.

Eksempel 3c variasjon av arginin som en elueringskomponent for Capto MMC

15

Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 8 cm i en Tricorn 5/100 kolonne (1 kolonnevolum (CV) = 1,6 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5317-10).

20

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialet som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2.

Ekvibreringsbuffer

25

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 7,0, ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

Kolonnen ble ekvibrert med en ekvibreringsbuffer etterfulgt av tilføring av utgangsmaterialet med en strømningsrate på 0,6 ml/min. FVIII er bundet til harpiksen under disse bufferbetingelser (ikke noe FVIII kunne detekteres i gjennomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige sekvensielle elueringsbetingelser (omtrent 10 kolonnevolumer (CV) hver) i tabell 3, og den oppnådde mengden av FVIII som eluerte fra kolonnen ble analysert med FVIII:C metoden og beregnet i % i forhold til den anvendte mengden av FVIII.

30

35

Tabell 3

Elueringsbetingelser*	FVIII funnet i eluat, (%)
20 % etylenglykol	0
0,1 M arginin + 20 % etylenglykol	0
0,2 M arginin + 20 % etylenglykol	0
0,3 M arginin + 20 % etylenglykol	0
0,4 M arginin + 20 % etylenglykol	1
0,5 M arginin + 20 % etylenglykol	10
0,6 M arginin + 20 % etylenglykol	37
0,7 M arginin + 20 % etylenglykol	32
0,8 M arginin + 20 % etylenglykol	8
0,9 M arginin + 20 % etylenglykol	1
1,0 M arginin + 20 % etylenglykol	0

*Alle elueringsbufferne inkluderte 0,01 M L-histidin, 0,3 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ og 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5

5

Konklusjon Eksempel 3c (ifølge oppfinnelsen)

Som det fremgår fra tabell 3, kan bindingen av FVIII til Capto MMC kolonnen overraskende inhiberes ved en kombinasjon av etylenglykol og arginin. Eluering av FVIII observeres i eluater som inneholdt opp til 0,9 M arginin sammen med 20 % (vekt/vekt) etylenglykol.

10

Eksempel 3d (ifølge oppfinnelsen), sammenligning av arginin og lysin som en elueringskomponent for Capto MMC

15 Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 4-8 cm i en Tricorn 50/100 eller C10/20 kolonne (1 kolonnevolum (CV) = 1,6-3 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5317).

20 Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2.

Ekvilibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 7,0, ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

- 5 Kolonnen ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av påføring av utgangsmaterialet med en strømningsrate som representerer en kontaktid på 1-2 minutter. FVIII bindes til harpiksen under disse bufferbetingelser (ikke noe FVIII kunne detekteres i gjennomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 4 og den oppnådde mengden av FVIII som
- 10 kom ut fra kolonnen ble analysert med FVIII:C metode og beregnet i % i forholdt til den påførte mengden av FVIII.

Tabell 4

Elueringsbetingelser*	Eluert volum, (CV)	FVIII funnet i eluat, (%)
0,5 M lysin + 20 % etylenglykol	40	3
0,65 M lysin + 20 % etylenglykol	40	16
0,75 M lysin + 20 % etylenglykol	40	13
0,4 M arginin + 20 % etylenglykol	20	4
0,75 M arginin + 20 % etylenglykol	20	89

- 15 *Alle elueringsbuffere inkluderte 0,01 M L-histidin, 0,3 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ og 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5

Konklusjon Eksempel 3d (ifølge oppfinnelsen)

- Som det fremgår fra tabell 4 har bindingen av FVIII til Capto MMC kolonnen blitt
- 20 studert med 20 % etylenglykol i kombinasjon med lysin og arginin ved forskjellig konsentrasjon. Arginin eluerer FVIII bedre enn lysin, en konsentrasjon på 0,75M synes å gi omtrent 90 % utvinning. Det synes å være mulig å anvende små mengder av hver aminosyre i kombinasjon med etylenglykol, som et vasketrinn for å fjerne forurensninger fra FVIII molekylet, før eluering av FVIII med f.eks. 0,75 M arginin.

25

Eksempel 3e, evaluering av renhet og utvinning ved anvendelse av forskjellige vaske- og elueringsbetingelser for Capto MMC harpiksen.

Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket i forskjellige kolonnestørrelser (2-9 cm sjikthøyde, volum 1,6 – 48 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5317).

5

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var proteinoppløsninger som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2, med en typisk renhet på omtrent 100 IU FVIII/ mg protein (som man vil se i eksempel 9, tabell 18).

10

Ekvibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 7,0, ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

- 15 Kolonnen ble ekvibrert med ekvibreringsbuffer etterfulgt av tilføring av utgangs- materialet med passende strømningsrater (avhengig av kolonnestørrelse, omtrent 13- 300 cm/t). FVIII bindes til harpiksen under disse bufferbetingelser (ikke noe FVIII kunne detekteres i gjennomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet for- skjellige vaske- og elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 5, og den oppnådde
- 20 mengden av FVIII som kom ut fra kolonnen ble analysert med FVIII:C metode og beregnet i % i forhold til den anvendte mengden av FVIII.

Tabell 5

Vaskebuffer	Elueringsbuffer	FVIII utvinning, (%)	Renhet** eluat, (IU/mg)
20 % etylenglykol + 0,4 M arginin, 40 CV	0,8 M arginin + 20 % etylenglykol	83	5741
20 % etylenglykol + 0,45 M arginin, 20 CV	0,8 M arginin	69	na

- 25 *Alle buffere inkluderer 0,01 M L-histidin 0,3 M NaCl, 0,01 M CaCl₂ og 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5

**Målt med Bradford

Konklusjon Eksempel 3e

Som det fremgår i tabell 5 vil kombinasjonen av 20 % etylenglykol og 0,4 M arginin i et vasketrinn før anvendelse av høyere konsentrasjon av arginin i elueringsbufferen gi høyt utbytte og rent produkt, idet konsentrasjonen av arginin i vaskebufferen ikke bør
5 overskride 0,4 M på grunn av den relativt lave resulterende FVIII utvinning.

Konklusjon Eksempel 3

Det blir klart at kation multimodal harpiksen (Capto MMC) ikke kan elueres ved å anvende konvensjonelle ionebytter-elueringsbetingelser (høyt saltinnhold) eller
10 hydrofobe interaksjonsharpikser (lavt saltinnhold). En økt mengde av ladet aminosyre alene eller i kombinasjon med etylenglykol kunne overraskende frigi det bundne FVIII molekylet fra Capto MMC harpiksen. I tillegg kunne NaCl, arginin, lysin og etylenglykolkonsentrasjonene varieres under vasking og eluering av harpiksen, for å optimalisere utvinning og renhet av Capto MMC eluatet.

15

Eksempel 4: Elueringsbetingelser for multimodal anionharpiks Capto Adhere (sammenligning)

De etterfølgende serier av forsøk ble gjennomført for å evaluere forskjellige eluerings-
20 betingelser på den multimodale anionharpiks Capto Adhere.

Kolonne og harpiks

Capto Adhere harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 13,5 cm i en C10/20 kolonne. Capto Adhere harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5444).

25

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholder rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 6C.

30 Ekvilibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 30 ± 3 mS/cm ved 25°C.

Kolonnen ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av påføring av utgangs-
35 materialet. Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 6, og den resulterende mengden av FVIII som kom ut fra kolonnen ble analysert.

Tabell 6

Prøve	Volum, ml	FVIII, IU/ml	Total FVIII, IU	Total FVIII, (%)
Utgangsmaterial (påført)	184	140	25760	100
A (ekvilibreringsbuffer)	159	0,0	0	0
B (høyt saltinnhold)	212	0,0	0	0
C (lavt saltinnhold)	53	0,0	0	0
D (lavt aminosyreinnhold + lavt etylenglykolinnhold)	212	3,5	935	4
E (aminosyre)	32	701	22432	87

Elueringsbetingelse A

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5,
5 ledningsevne 30 ± 3 mS/cm ved 25°C.

Elueringsbetingelse B (høyt saltinnhold)

0,05 M L-histidin, 0,05 M CaCl₂, 2,0 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5,
ledningsevne 140 ± 3 mS/cm ved 25°C.

10

Elueringsbetingelse C (lavt saltinnhold)

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5,
ledningsevne 13 ± 3 mS/cm ved 25°C.

15 Elueringsbetingelse D (lavt aminosyreinnhold + lavt etylenglykolinnhold)

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,3 M argininhydroklorid, 20 % vekt/vekt
etylenglykol, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 28 ± 3 mS/cm
ved 25°C.

20 Elueringsbetingelse E (aminosyre)

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,8 M argininhydroklorid, 0,02 %
vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 53 ± 2 mS/cm ved 25°C.

Konklusjon Eksempel 4

25 Det ble klart at anion-multimodal harpiksen (Capto Adhere) ikke kan elueres ved å
anvende konvesjonelle ionebytter-elueringsbetingelser (høyt saltinnhold) eller hydro-
fobe interaksjonsharpikser (lavt saltinnhold). En økt mengde av en ladet aminosyre

alene eller i kombinasjon med etylenglykol kunne overraskende frigi det bundne FVIII molekylet.

Eksempel 5, sammenligning av et konvensjonelt kationbyttertrinn (SP Sepharose FF)
5 med en kation-multimodal harpiks (Capto MMC) som et rensetrinn (oppfangingstrinn).

Kolonne og harpiks

Capto MMC harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 11 cm i en C10/20 kolonne (1
kolonnevolum (CV) = 8,5 ml). Capto MMC harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare
10 (katalog nr 17-5317).

SP Sepharose FF harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 18 cm i en XK26/20 kolonne
(1 kolonnevolum (CV) = 100 ml). SP Sepharose FF harpiksen ble oppnådd fra GE
Healthcare (katalog nr 17-0729).

15

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene som ble anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII,
oppnådd som beskrevet i eksempel 2 (identisk utgangsmaterial ble anvendt for begge
forsøk). For SP Sepharose FF harpiksen var utgangsmaterialet fortynnet med fortyn-
ningsbuffer til en ledningsevne på 12 mS før påføring på harpiksen, for at FVIII var i
20 stand til å binde.

Fortynningsbuffer SP

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,07 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH
25 6,5

Ekvilibreringsbuffer MMC

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,3 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 7,0,
ledningsevne 31 ± 3 mS/cm ved 25°C.

30

Ekvilibreringsbuffer SP

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5,
ledningsevne 12 ± 2 mS/cm ved 25°C.

35 Kolonnene ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av tilføring av utgangs-
materialet ved en strømningsrate på henholdsvis 5 ml/min og 40 ml/min. FVIII bindes
til harpiksen under disse bufferbetingelser (ikke noe FVIII kunne detekteres i gjen-

nomstrømningen). Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige vaske- og elueringsbetingelser, prinsippet beskrevet i trinn 3d (vasking 0,75 M lysin + 20 % etylenglykol) og eksempel 3b (eluering 1,5 M NaCl + 50 % etylenglykol) for Capto MMC trinnet, og i eksempel 6b for SP Sepharose FF trinnet (vasking 0,15 M NaCl og eluering 0,36 M NaCl). I tabell 7 kan forskjellen mellom de to rensetrinnene studeres.

Tabell 7

Oppfangingsharpiks	Ledningsevne i tilførselsmaterial mS/ cm ved 25°C	Volum tilførselsmaterial, ml	Totalt påført FVIII, IU	FVIII/ml oppfangingsharpiks	FVIII utvinning*, %	Renhet***, IU/mg	DNA/ FVIII, ng/IU
Capto MMC OgH07-648	35	1235	29022	3400	68 %	2414	2,3
SP-Seph FF OgH07-647	12	5759	20147	202	59 %	596	22,1

*Beregnet fra ufortynnet utgangsmaterial

10 **Målt med Bradford

Konklusjon Eksempel 5 (sammenligning)

Resultatene i tabell 7 viser at anvendelsen av Capto MMC trinnet som et oppfangings-/rensetrinn for FVIII viser en rekke fordeler som inkluderer:

- 15 • Bedre FVIII utvinning
- Høyere renhet med hensyn til vertcelleproteiner
- Høyere renhet med hensyn til DNA
- Høyere bindingskapasitet FVIII/ml harpiks
- Kortere prosessetid som skyldes mindre fortynning (MMC harpiksen kan
- 20 prosesseres med en høyere ledningsevne)

Eksempel 6, spesifikk eluering (Ca) og vaskekomponenter for FVIII og rensing derav på en kationbytterharpiks (SP Sepharose FF) (sammenligning).

25 Den etterfølgende serie av forsøk ble gjennomført for å evaluere forskjellige elueringsbetingelser på SP Sepharose FF harpiksen.

Eksempel 6a, natriumklorid og arginin som spesifikk eluerings- og vaskekomponent anvendt som en kationbytterharpiks (SP Sepharose FF).

Kolonne og harpiks

SP Sepharose FF harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 15 cm i en XK16 kolonne.
 SP Sepharose FF harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-0729).

5 Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2 og videre prosessert på en Capto MMC harpiks, som beskrevet i eksempel 9. Eluatet fra Capto MMC kolonnen ble fortynnet 12x med en fortynningsbuffer for å nedsette ledningsevnen til omtrent 12 mS/cm, som muliggjør

10 binding av målprotein til SP Sepharose FF harpiksen.

Fortynningsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,07 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5.

15

Ekvilibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 12 ± 2 mS/cm ved 25°C.

20 Kolonnen ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer etterfulgt av tilføring av utgangsmaterialet. Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 8, og den resulterende mengden av FVIII som forlot kolonnen ble analysert.

25 Tabell 8

Prøve	Volum ml	FVIII IU/ml	Total FVIII, IU	Total %	Spesifikk Aktivitet** IU/mg
Utgangsmaterial (tilførsel)	2830	5	14150	100	178
Ekvilibreringsbuffer. Vasking	300	0,0	0	0	na
Vasking A	600	0,0	0	0	na
Eluering	90	153	13770	97	362

na = Ikke analysert

** Målt med Bradford

Vasking A

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,15 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne $16,5 \pm 18,0$ mS/cm ved 25°C.

5

Elueringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,035 M CaCl₂, 0,34 M NaCl, 0,2M D-sorbitol, 0,045 M arginin-hydroklorid, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 36 ± 2 mS/cm ved 25°C.

10

Konklusjon Eksempel 6a (sammenligning)

Bundet FVIII ble effektivt eluert fra SP Sepharose FF kolonnen når en elueringsbuffer med en ledningsevne på 36 mS/cm ble anvendt. Denne ledningsevne var en effekt av NaCl konsentrasjonen og delvis av CaCl₂- og arginin-konsentrasjonene. Sorbitol og arginin ble inkludert i bufferen for å stabilisere FVIII molekylet under prosessering, frysing og tining.

15

Eksempel 6b, natriumklorid som en spesifikk eluerings- og vaskekomponent anvendt som en ionebytterharpiks (SP Sepharose FF).

20

Kolonne og harpiks

SP Sepharose FF harpiksen ble pakke til en sjukthøyde på 15 cm i en C10/20 kolonne. SP Sepharose FF harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-0729).

25

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2 og eksempel 9. Eluatet fra Capto MMC kolonnen var fortynnet 12x med en fortynningsbuffer for å nedsette ledningsevnen, som muliggjør bindingen av målprotein til SP Sepharose FF harpiksen.

30

Fortynningsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,01 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5.

35

Ekvilibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 12 ± 2 mS/cm ved 25°C.

Kolonnen ble ekvilibrert med ekvibreringsbuffer etterfulgt av tilførsel av utgangsmaterialet. Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 9, og den oppnådde mengden av FVIII som forlater kolonnen ble analysert.

Tabell 9

Prøve	Volum ml	FVIII IU/ml	Total FVIII IU	Total FVIII %	Spesifikk aktivitet** IU/mg
Utgangsmaterial (tilførsel)	540	12,8	6912	100	799
Vasking ekvibreringsbuffer	120	0,0	0	0	na
Vasking B	490	0,0	0	0	na
Eluering	27	221	5967	86	948

**Målt med Bradford

10

Vasking B

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,15 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 16,5 ± 18,0 mS/cm ved 25°C.

15 Elueringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,035 M CaCl₂, 0,36 M NaCl, 0,2M D-Sorbitol, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 36 ± 2 mS/cm ved 25°C.

Konklusjon Eksempel 6b

20 En elueringsbuffer med en ledningsevne på 36 mS/cm ble anvendt. Sammenlignet med den anvendt i forsøk 5a, ble arginin utelukket og ledningsevnen ble justert til 36 mS/cm ved å tilsette en litt høyere NaCl konsentrasjon. Prosentandel eluert FVIII var noe lavere enn i forsøk 5a som indikerer at arginin har en positiv virkning under prosessen.

25

Eksempel 6c, kalsiumklorid som en spesifikk eluerings- og vaskekomponent anvendt som en kationbytterharpiks.

Kolonne og harpiks

SP Sepharose FF harpiksen ble pakket til en sjikthøyde på 15,5 cm i en XK26 kolonne. SP Sepharose FF harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-0729).

5 Utgangsmaterial

Utgangsmaterialene anvendt var en proteinoppløsning som inneholdt rFVIII, oppnådd som beskrevet i eksempel 2 og eksempel 9. Eluatet fra Capto MMC kolonnen ble for-
tynnet 12x med en fortynningsbuffer for å nedsette ledningsevnen, som muliggjør binding av målproteinet til SP Sepharose FF harpiksen.

10

Fortynningsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,05 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5

15 Ekvibreringsbuffer

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 12 ± 2 mS/cm ved 25°C.

20

Kolonnen ble ekvibrert med ekvibreringsbuffer etterfulgt av tilførsel av utgangs-
materialet. Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 10, og den oppnådde mengden FVIII som forlot kolonnen ble analysert.

Tabell 10

Prøve	Volum ml	FVIII IU/ml	Total FVIII, IU	Total FVIII, %	Spesifikk aktivitet** IU*/mg
Utgangsmaterial (tilførsel)	2000	31,7	63400	10	578
Vasking ekvibreringsbuffer	830	0,0	0	0	na
Vasking B	3320	0,0	0	0	na
Vasking C (sorbitol)	249	0	0	0	na
Eluering (kalsiumklorid)	410	149	61090	96	2811

25

**Målt med Bradford

Vasking B

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,15 M NaCl, 0,02 % vekt/vekt Polysorbate 80, pH
5 6,5, ledningsevne 16,5-18,0 mS/cm ved 25°C.

Vasking C (sorbitol)

0,01 M L-histidin, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,2 M D-Sorbitol, 0,02 % vekt/vekt
Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 12 ± 2 mS/cm ved 25°C.

10

Elueringsbuffer (kalsiumklorid)

0,02 M L-histidin, 0,2 M CaCl₂, 0,1 M NaCl, 0,2 M D-sorbitol, 0,02 % vekt/vekt
Polysorbate 80, pH 6,5, ledningsevne 18,7 (18,0-19,0) mS/cm ved 25°C.

15 Konklusjon Eksempel 6c (6a, 6b)

Dette forsøk (6c) var NaCl konsentrasjonen nedsatt og en høyere CaCl₂ konsentrasjon
ble anvendt i elueringsbufferen. Denne forandring resulterte i en ledningsevne på 18,7
mS/cm. Elueringskapasiteten til FVIII fra SP Sepharose FF var like god som i forsøk 5a
hvor ledningsevnen i elueringsbufferen var 36 mS/cm. Det var et uventet funn at
20 FVIII utvinning var lik eller bedre med en elueringsbuffer med nesten halvparten av
ledningsevnen. Ved ionebytterkromatografi er normalt elueringen av proteiner sterkt
avhengig av ledningsevnen (ionestyrke) eller/og pH. I dette eksempel synes det som
om Ca²⁺ ionet utviser spesifikke effekter, annet enn kun fra ionestyrken, på FVIII
molekylet. Dette er også verifisert ved renheten som er høyere (2811 sammenlignet
25 med henholdsvis 362 og 948 i 6a og 6b) ved anvendelse av Ca-basert eluering med
lavere ledningsevne.

Eksempel 7, rensing med en gjæravledet FVIII affinintetsligand.

30 Det etterfølgende forsøk ble gjennomført for å evaluere elueringsbetingelsene på
affinitetsharpiksen VIIISelect.

Kolonne og harpiks

En C10/20 kolonne ble pakket med VIIISelect harpiksen til en sjukthøyde på syv cm.
35 VIIISelect harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-5450).

Utgangsmaterial

Utgangsmaterialet anvendt var et SP Sepharose eluat som inneholdt rFVIII, oppnådd som prinsipielt beskrevet i eksempel 6b for SP Sepharose FF trinnet (vasking 0,15 M NaCl og eluering 0,36 M NaCl).

5

Buffersammensetninger:Buffer A (ekvilibreringsbuffer med S/D kjemikalier tilsatt)

0,3 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg $\text{CaCl}_2 \cdot (2\text{xH}_2\text{O})$, 0,02 mol/kg L-histidin, 1 % vekt/vekt Triton X-100, 0,3 % vekt/vekt TNBP, pH: $6,5 \pm 0,1$, ledningsevne: 31 ± 3 mS/cm ved $+25^\circ\text{C}$.

10

Vasking B (ekvilibreringsbuffer uten S/D kjemikalier)

0,3 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl_2 , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH: $6,5 \pm 0,1$, ledningsevne: 31 ± 3 mS/cm ved $+25^\circ\text{C}$.

15

Vasking C (vaskebuffer med høy saltkonsentrasjon)

1,0 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl_2 , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH: $6,5 \pm 0,1$, ledningsevne: 85 ± 3 mS/cm ved $+25^\circ\text{C}$.

20

Buffer D (elueringsbuffer)

1,5 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl_2 , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, 50 % (vekt/vekt) etylenglykol (EG), pH: $6,5 \pm 0,1$, ledningsevne 39 ± 3 mS/cm ved $+25^\circ\text{C}$.

25

Ekvilibreringsbuffer, vaskebuffer og elueringsbuffer er ikke begrenset til den angitte pH, konsentrasjoner og typer av buffer, salter eller detergent.

Kolonnen ble ekvilibrert med ekvilibreringsbuffer A etterfulgt av tilførsel av utgangsmaterialet. Harpiksen ble deretter underkastet forskjellige vaske- og elueringsbetingelser som beskrevet i tabell 11, og den oppnådde mengden av FVIII som forlot kolonnen ble analysert.

30

Tabell 11 Resultater fra VIIISelect forsøk

Prøve	Volum (ml)	FVIII (IU/ml)	Total (IU)	Total (%)	Spesifikk aktivitet (IU/mg protein)	DNA inn- hold (pg/ 1000 IU)
Utgangsmaterial (tilførsel)	45	483	21735	100	1959*	1681
Vasking B	127,5	0,1	13	0	-	-
Vasking C	55	0	0	0	-	-
Eluering	27,5	641	17655	81	8758*	1399

*Målt med Bradford

- Figur 1 sølvfarget SDS-PAGE som viser renhetsprofil for utgangsmaterial (spor 1) og VIIISelect eluat (spor 2) etter affinitetskromatografitrinnet.

Konklusjon Eksempel 7

VIIISelect trinnet er et kraftig rensetrinn som gir et rent eluat.

- Eksempel 8, sammenligning av en rensesekvens med VIIISelect affinitetsharpiks eller en multimodal harpiks (Capto Adhere) i stedet (vedlegg 3).

De to ulike rensesystemer ble gjennomført i liten skala i henhold til eksempel 7 (VIIISelect) og eksempel 10 (Capto Adhere).

15

Tabell 12 Sammenligning av FVIII utvinning og renhet ved anvendelse av VIIISelect eller Capto Adhere rensetrinn

VIIISelect system	Spesifikk aktivitet (IU/mg totalt protein)	FVIII, IU utvinning (%)	DNA innhold (pg/ 1000IU)	Capto Adhere system	Spesifikk aktivitet (IU/mg totalt protein)	FVIII, IU utvinning (%)	DNA innhold (pg/1000 IU)
Utgangs- material (Sp-filtrat)	1588*	100	1442	Utgangs- material (SP- filtrat)	1588*	100	1442
VIIISelect Eluat	8759*	81	1399	Adhere eluat	5112*	86	504
Q-elat VIIISelect	na	106	840	Q-eluat (Adhere)	na	105	82
GF-eluat VIIISelect	10322**	88	214	GF-eluat (Adhere)	10679*	103	181

n.a. = Ikke analysert

*Målt med Bradford

**Målt med aminosyreanalyse

5

Figur 2 viser SDS Page sølvfarging av prøver beskrevet i tabell 12; sammenligning av VIIISelect rensesystem og Capto Adhere rensesystem.

10

Spor 1 viser renheten av utgangsmaterialet (SP-filtrat) før VIIISelect kolonnen ble tilført en FVIII konsentrasjon av 483 IU/ml.

Spor 2 viser renheten av VIIISelect eluatet ved tilførsel av en FVIII konsentrasjon på 500 IU/ml.

15

Spor 3 viser renheten etter rensesekvensen SP-VIIISelect-Q Seph, tilført ved en FVIII konsentrasjon på 500 IU/ml.

Spor 4 viser renheten etter rensesekvensen SP-VIIISelect-Q Seph-gelfiltrering, tilført ved en FVIII konsentrasjon på 385 IU/ml.

20

Spor 5 viser renheten av utgangsmaterialet (SP-filtrat) før Capto Adhere kolonnen var tilført en FVIII konsentrasjon av 493 IU/ml.

25

Spor 6 viser renheten av Capto Adhere eluatet tilført ved en FVIII konsentrasjon på 500 IU/ml.

Spor 7 viser renheten etter rensesekvensen SP-Capto Adhere-Q Seph, tilført ved en FVIII konsentrasjon av 500 IU/ml.

30

Spor 8 viser renheten etter rensesekvensen SP-Capto Adhere-Q Seph-gelfiltrering, tilført ved en FVIII konsentrasjon av 493 IU/ml.

Spor 9 viser en molekylmarkør.

35

Konklusjon Eksempel 8

Den samme renhet kan oppnås ved enten å anvende VIIISelect affinitetstrinnet eller Capto Adhere kromatografitrinnet, dersom renheten sammenlignes i sluttproduktet

(GF-eluat). Renheten etter VIIISelect trinnet er høyere sammenlignet med etter Capto Adhere trinnet, men etter de gjenværende rensetrinn (Q og GF) kan ingen forskjell i renhet iakttas med de anvendte analysemetoder. Utvinningen ved anvendelse av Capto Adhere trinnet er noe høyere sammenlignet med sekvensen ved anvendelse av VIIISelect.

Eksempel 9: Rensesekvens i industriell skala, inkluderende VIIISelect affinitetsharpiks

For å studere reproducerbarhet av utvinning og renhet, ble rensetrinn 1-9 beskrevet nedenfor gjennomført på 3-4 batcher i pilotskala. Hver batch stammet fra 40-100L cellesuspensjon, som beskrevet i eksempel 1-2.

TRINN 1 DNA reduksjonstrinn nr. 1 (anionkromatografi)

Primær reduksjon av DNA gjennomføres med filtrering gjennom en Q-membran (Sartobind Q, Sartorius). Q-membranen ekvilibrerer med buffer før filtrering (tabell 13).

Tabell 13 Buffer anvendt for Q-membran

Q-membran/DNA-reduksjon	Ekvibreringsbuffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % Polysorbate 80, pH 7
-------------------------	--------------------	--

Cellefiltratet (fra eksempel 2) prosesseres gjennom Q-membranen og den produkt-inneholdende gjennomstrømning samles. Membranen vaskes med ekvibreringsbuffer for å utvinne eventuelt FVIII tilbake i membranen.

25 TRINN 2 Oppfangingstrinn (multimodal kromatografi, Capto MMC)

Rensing og konsentrasjon (oppfanging) av primært produkt gjennomføres ved 500-10 000 IU av FVIII/ml av multimodal kationbytterkromatografi (Capto MMC) gel. Gelen er før produktpåføring ekvibrert med Capto MMC ekvibreringsbuffer. Filtratet fra trinn 1 påføres på Capto MMC kolonnen som deretter vaskes med Capto MMC ekvibreringsbuffer og deretter vaskes påfølgende med vaskebuffer 1-3 etterfulgt av eluering av FVIII, som beskrevet i tabell 14.

Tabell 14

Multimodal kromatografi/ Capto MMC	Ekvibrerings- buffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl₂, 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 7
	Vaskebuffer 1	1 mol/kg NaCl, 0,05 mol/kg CaCl ₂ , 0,05 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5
	Vaskebuffer 2	0,1 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5
	Vaskebuffer 3	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,4 mol/kg L-arginin-hydroklorid, 10 % (vekt/vekt) etylenglykol, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5
	Elueringsbuffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,8 mol/kg L-arginin-hydroklorid 10 % (vekt/vekt) etylenglykol, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5

TRINN 3 Kationbytterkromatografi, SP Sepharose FF

5

Den FVIII-inneholdende oppløsning (Cato MMC eluat) fra trinn 2 renses ytterligere ved å anvende en SP-Sepharose FF gel (GE Healthcare katalog nr 17-0729). Før produkt-påføring ekvibreres kolonnen med SP-Sepharose ekvibreringsbuffer og protein-oppløsningen fortynnes for å tilfredsstille ionestyrken og pH i ekvibreringsbufferen, for å kunne binde FVIII til gelen. Den fortynnete proteinoppløsning påføres på SP Sepharose kolonnen, som deretter vaskes med ekvibreringsbuffer og vaskes deretter med vaskebuffer etterfulgt av eluering av FVIII, som beskrevet i tabell 15.

10

Tabell 15 Buffere anvendt for kationbytterkromatografi

Kationbytterkromatografi (SP Sepharose FF)	Ekvilibreringsbuffer	0,1 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg L-histidin, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5
	Vaskebuffer	0,15 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg L-histidin, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5
	Elueringsbuffer	0,34 mol/kg NaCl, 0,35 mol/kg CaCl ₂ , 0,045 mol/kg L-argininhydroklorid, 0,2 mol/kg Sorbitol, 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5

TRINN 4 DNA reduksjon trinn nr 2 (anionkromatografi)

- 5 Sekundær reduksjon av DNA gjennomføres med filtrering gjennom en Q-membran (Sartobind Q, Sartorius). Q-membranen ekvilibreres med buffer før filtrering (tabell 16).

Tabell 16 Buffer anvendt for Q-membran

Q-membran/DNA-reduksjon	Ekvilibreringsbuffer	0,34 mol/kg NaCl, 0,35 mol/kg CaCl ₂ , 0,045 mol/kg L-argininhydroklorid, 0,2 mol/kg Sorbitol, 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5
-------------------------	----------------------	--

10

SP-eluatet fra trinn 3 filtreres gjennom Q-membranen, den produktinnholdende gjennomstrømning samles for ytterligere prosessering. Membranen vaskes med ekvilibreringsbuffer for å utvinne eventuelt FVIII tilbake i membranen.

- 15 TRINN 5 Virusinaktivering (løsningsmiddel/detergent (S/D) behandling)

Filtratet fra trinn 4 virusinaktiveres gjennom S/D (løsningsmiddel/detergent) behandling med 1 % Triton X-100 og 0,3% Tri-(N-butyl)-fosfat (TNBP). Virusinaktivering gjennomføres under omrøring ved romtemperatur i omtrent 1 time.

20

TRINN 6 Rensing med en gjæravledet affinitetskromatografiharpiks

Den virusinaktiverede FVIII oppløsningen fra trinn 5 prosesseres gjennom en VIIISelect affinitetskolonne i henhold til beskrivelsen i eksempel 7. Omtrent 5-20 000 IU FVIII tilføres per ml harpiks.

5 TRINN 7 Nanofiltrering

VIIISelect eluatet fra trinn 6 nanofiltreres for å fjerne potensielle ytterligere midler slik som ikke-kappe virus, ved anvendelse av Planova 20N nanofilter (Asahi Kasei Medical). Den produktinnholdende gjennomstrømning samles.

10

TRINN 8 Anionbytterkromatografitrinn (Q-Sepharose FF)

Q Sepharose FF harpiksen ble oppnådd fra GE Healthcare (katalog nr 17-0510). Utgangsmaterialet som anvendes er et nanofiltrat oppnådd fra trinn 7, mens saltet og pH er blitt innstilt til å være sammenlignbare med ekvibreringsbufferen i tabell 17. Fortynnet proteinoppløsning påføres på Q Sepharose FF kolonnen med en tilførsel av 5000 til 25000 IU/ml gel, som deretter vaskes med ekvibreringsbuffer og deretter vaskes med vaskebuffer etterfulgt av eluering av FVIII, som beskrevet i tabell 17.

20 Tabell 17 Buffer anvendt for anionbyttertrinn (Q-Sepharose FF)

Anionbytter/ Q-Sepharose FF	Ekvibrerings- buffer	0,1 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 Polysorbate 80, pH 7,5
	Vaskebuffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 Polysorbate 80, pH 7,5
	Elueringbuffer	0,4 mol/kg NaCl, 0,02 mol/kg CaCl ₂ , 0,02 mol/kg L-histidin, 0,02 Polysorbate 80, pH 6,0

TRINN 9 Gelfiltreringskromatografitrinn

En gelfiltreringsharpiks (Superdex 200pg, GE Healthcare katalog nr 17-1043) ble pakket til en sjikthøyde på 60-75 cm. Utgangsmaterialet som anvendes er Q-eluatet oppnådd fra trinn 8. Kolonnen ekvibreres med en fysiologisk akseptbar sammensetning som beskytter produktet fra overflateadsorpsjon og stabiliserer det under frysing, lagring, frysetørking osv. Q-eluatet påføres gelfiltreringskolonnen med et volum av 2-8% av det totale kolonnevolumet. Det formulerte FVIII inneholdende eluatet, uten fragment og aggregater, samles etter kolonnen (GF-eluat).

30

Tabell 18 Oppsummering av resultater over rensetrinn beskrevet i trinn 1-4 av fire rensebatcher i pilotskala (som stammer fra omtrent 50L (BPP077-078) og 100L (BPP080-081) cellesuspensjonsmateriale (beskrevet i eksempel 1).

	BPP077	BPP078	BPP080	BPP081
Utgangsmateriale (beskrevet i eksempel 2)				
Vekt (kg)	81	72	162	160
Total FVIII (IU)	2327570	1699200	4032180	3870400
FVIII utbytte (%)	100	100	100	100
Spesifikk aktivitet *(IU/mg)	83	67	107	107
DNA innhold (pg/1000 IU)	$1,4 \cdot 10^8$	$5,93 \cdot 10^9$	$5,3 \cdot 10^9$	-
MMC-eluat (trinn 2)				
Vekt (kg)	3,5	4,4	10,9	9,6
Total FVIII (IU)	412654	1023103	3844487	3428212
FVIII utbytte (%)	24	70	104	96
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	846	512	578	646
DNA innhold (pg/1000 IU)	$1,8 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	-
SP-filtrat (trinn 4)				
Vekt (kg)	3,1	3,3	5,0	4,6
Total (IU)	1524582	1025994	3430796	3000515
FVIII (%)	112	116	119	108
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	1588	793	1362	1277
DNA innhold (pg/1000 IU)	<206	4463	1313	-

5 *Målt med Bradford

Oppfangings-høstebatcher BPP077 og BPP078 ble samlet til nedstrøms rensebatch BPP079, mens batch BPP080 ble betegnet BPP083 og BPP081 ble betegnet BPP084.

Tabell 19 Oppsummering av resultater over kromatografitrinnene beskrevet i trinn 5-9, i nedstrømsdelen av tre pilotskala rensebatcher.

	BPP079	BPP083	BPP084
Utgangsmaterial (trinn 4)			
Vekt (kg)	5476	4928	4220
Total FVIII, (IU)	1642680	2389094	2022646
FVIII utbytte (%)	100	100	100
Spesifikk aktivitet*** (IU/mg)	1107	1254	1210
DNA innhold (pg/1000 IU)	3733	-	-
VIIISelect-eluat (trinn 6)			
Vekt (g)	666	785	810
Total FVIII (IU)	1251414	2094380	1674270
FVIII utbytte (%)	76	88	83
Spesifikk aktivitet*** (IU/mg)	8064	-	-
DNA innhold (pg/1000 IU)	1554	-	-
Nanofiltrat (trinn 7)			
Vekt (g)	7680	8205	9555
Total FVIII, (IU)	1051392	1822331	1763853
FVIII utbytte (%)	94	88	97
Spesifikk aktivitet (IU/mg)	-	-	-
DNA innhold (pg/1000 IU)	<730	-	-
Q-eluat (trinn 8)			
Vekt (kg)	281	291	263
Total FVIII (IU)	1002327	1755603	1857832
FVIII utbytte* (%)	95	96	105
Spesifikk aktivitet**** (IU/mg)	10975	-	10312
DNA innhold (pg/1000 IU)	47	43	<14
GF-eluat (trinn 9)			
Vekt (kg)	562	740	860
Total FVIII (IU)	627754	1124800	926220
FVIII utbytte** (%)	79	116	101
Spesifikk aktivitet**** (IU/mg)	12275	10000	10663
DNA innhold (pg/1000 IU)	-	<66	-

* Utbytte beregnet over Q trinnet, **utbytte beregnet over GF trinnet, ***målt med

5 Bradford og ****målt med aminosyreanalyse

Figur 3 viser SDS-PAGE sølvfargingsmønster for sluttproduktet før (spor 3 – BPP083, spor 7 – BPP084) og etter (spor 6 – C810A139, spor 8 – C811A139) formulering, rensing i henhold til eksempel 9 (tabell 18-19). Spor 2 viser en molekylær markør, spor 3 viser en FVIII kontrollprøve og spor 4 viser et kommersielt tilgjengelig FVIII produkt (ReFacto® - Lot C66202).

Figur 4 viser Western blotting av FVIII ved anvendelse av polyklonale anti-humane FVIII antistoffer. Spor 1 og 10 er tomme, spor 2 viser en molekylvektstandard (Precision Plus Protein Western C fra Bio-rad), spor 3 viser et kommersielt tilgjengelig FVIII produkt ReFacto® lot C66202, spor 4-6 viser en FVIII kontrollprøve, spor 7-9 viser endelige formulerte produkter av batcher BPP079, BPP083 og BPP084 rensset i henhold til eksempel 9 (tabell 17-18). Prøver ble fortynnet til en FVIII konsentrasjon som tilsvarer 5 IU FVIII:C/ml før påføring på western blottet.

Figur 5 viser 2-D-PAGE etter sølvfarging og western blotting av endelig formulerte produkter av batcher BPP079 og BPP083, sluttprodukt (GF-eluat) av batcher BPP079 GF eluat og BPP083 GF eluat, rensset i henhold til eksempel 9 (tabell 17-18). Et kommersielt tilgjengelig FVIII produkt (ReFacto®, Lot 70591) ble anvendt som en referanse. Venstre side: Sølvfargede avbildninger av geler med BPP079 og BPP083 GF-eluator og ReFacto®. Høyre side: Western blot avbildninger med BPP083 GF-eluator og ReFacto®.

Konklusjon Eksempel 9

Den beskrevne renseprosess kan gjennomføres i industriell målestokk på en måte som er reproducerbar med hensyn til utvinning, renhet og produktkvalitet. I tillegg oppfyller den det høye kravet om renhet for å kunne anvende produktet for behandling av mennesker.

Eksempel 10: Industriell målestokk for rensesekvens uten spesifikk affinitetsligand (anion-multimodal harpiks; Capto Adhere i stedet)

For å studere reproducerbarhet av utvinning og renhet, ble rensetrinn 2-3 (Capto MMC og SP Sepharose FF) og trinn 5 (virusinaktivering), som beskrevet i eksempel 9 gjennomført for to batcher (BPP068-069) i pilotskala. Deretter ble de to batchene samlet til en nedstrøms batch (BPP071) og prosessert i henhold til trinn 6-9 i eksempel 9, med unntak av at trinn 6 (VIIISelect gelen) ble byttet med et anionbytter multimodalt kromatografitrinn, (Capto Adhere). Hele rensesekvensen kan studeres i

vedlegg 2. Hver batch (BPP068-069) stammer fra omtrent 50 l cellesuspensjon, som beskrevet i eksempel 1-2.

Capto Adhere trinnet

- 5 Den multimodale anionbytterkolonnen (Capto Adhere, GE Healthcare, katalog nr 17-5444) fikk tilført i området 5000 – 10000 IU FVIII/ml harpiks. Gelen er før produkttilførsel ekvilibrert med ekvibreringsbuffer. Den virusinaktiverende oppløsning (som beskrevet i eksempel 9, trinn 5) påføres på Capto Adhere kolonnen som deretter renses med ekvibreringsbuffer og vaskes påfølgende med vaskebuffer 1-3 etterfulgt
- 10 av eluering av FVIII som beskrevet i tabell 20.

Tabell 20

Multimodal kromatografi/ Capto Adhere	Ekvibreringsbuffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 7
	Vaskebuffer 1	2 mol/kg NaCl, 0,05 mol/kg CaCl ₂ , 0,05 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5
	Vaskebuffer 2	0,1 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,02 % (vekt/vekt) Polysorbate 80, pH 6,5
	Vaskebuffer 3	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,3 mol/kg L-argininhydroklorid, 20 % (vekt/vekt) etylenglykol, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5
	Elueringsbuffer	0,3 mol/kg NaCl, 0,01 mol/kg CaCl ₂ , 0,01 mol/kg L-histidin, 0,8 mol/kg L-argininhydroklorid, 0,02 % Polysorbate 80, (vekt/vekt), pH 6,5

Tabell 21 Oppsummering av resultater over de to første kromatografitrinn (i henhold til eksempel 9, trinn 2-3) av to pilotskala rensebatcher.

	BPP068	BPP069
	Utgangsmaterial (som beskrevet i eksempel 1-2)	
Vekt (kg)	98,6	110,5
Total FVIII (IU)	734 570	596 700
FVIII utbytte (%)	100	100
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	43	52
DNA innhold (pg/1000 IU)	$2,1 \cdot 10^9$	$7,1 \cdot 10^8$
	Capto MMC eluat (trinn 2 eksempel 9)	
Vekt (kg)	3,8	4,0
Total FVIII (IU)	500 813	389 814
FVIII utbytte (%)	68	65
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	449	596
DNA innhold (pg/1000 IU)	$3,4 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$
	SP eluat (trinn 3 eksempel 9)	
Vekt (kg)	2,2	3,1
Total FVIII (IU)	368 903	315 000
FVIII utbytte ¹⁾ (%)	88	79
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	1490	2071
DNA innhold (pg/1000 IU)	$1,6 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^6$

1) Utbytte beregnet over SP trinnet

5 *Målt med Bradford

Tabell 22 Oppsummering av resultater over kromatografitrinnene (trinn 5 – eksempel 9, Capto Adhere, trinn 8-9 – eksempel 9) i nedstrømsdelen av en pilotskala rensebatch

	BPP071
Utgangsmaterial (trinn 5 eksempel 9)	
Vekt (kg)	5,2
Total FVIII (IU)	568 326
FVIII utbytte (%)	100
Spesifikk aktivitet (IU/mg)	-
DNA innhold (pg/1000 IU)	-
Capto Adhere eluat	
Vekt (g)	296
Total FVIII (IU)	543 752
FVIII utbytte ²⁾ (%)	96
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	5117
DNA innhold (pg/1000 IU)	$2,5 \cdot 10^5$
Q eluat (trinn 8, eksempel 9)	
Vekt (g)	244
Total FVIII (IU)	266212
FVIII utbytte ³⁾ (%)	52
Spesifikk aktivitet (IU/mg)	-
DNA innhold (pg/1000 IU)	1121
GF eluat (trinn 9, eksempel 9)	
Vekt (g)	12
Total FVIII (IU)	5610
FVIII utbytte ⁴⁾ (%)	84
Spesifikk aktivitet* (IU/mg)	8061
DNA innhold (pg/1000 IU)	836

2) Utbytte beregnet over Capto Adhere trinnet

3) Utbytte beregnet over Q Sepharose trinnet

4) Utbytte beregnet over gelfiltreringstrinnet

*Målt med Bradford

5

Figur 6 viser en SDS-PAGE sølvfargingsgel av prøver fra pilot batch BPP071 renset i henhold til eksempel 10. Spor 1 viser et kommersielt tilgjengelig FVIII produkt (ReFacto®). Spor 2 viser utgangsmaterialet (SP-filtrat) før Capto Adhere trinnet. Spor 3 viser renhetsprofilen for Capto Adhere eluatet. Spor 4 viser renheten etter rensesekvensen SP filtrat – Capto Adhere – Q Seph. Spor 5 viser renhet etter rensesekvensen SP filtrat – Capto Adhere – Q Seph – gelfiltrering.

Figur 7 viser en Western Blot gel av prøver fra pilot batch BPP071 renset i henhold til eksempel 10. Spor 1 viser et kommersielt tilgjengelig FVIII produkt (ReFacto®). Spor 2 viser Capto Adhere eluatet. Spor 3 viser resultatet av rensesekvensen SP filtrat – Capto Adhere – Q Seph. Spor 4 viser resultatene etter rensesekvensen SP filtrat – Capto Adhere – Q Seph – gelfiltrering.

Konklusjon Eksempel 10

20 Renseprosessen i pilotskala, som inkluderer et multimodalt kromatografitrinn (Capto Adhere) i stedet for VIIISelect affinitetsliganden, fremviser den samme utvinning, renhet og produktkvalitet i det endelige GF-eluatet.

Beskrivelse av analyse

25

FVIII: C, screeningmetode basert på Coatest

Metoden er basert på tottrinns prinsippet, og ble gjennomført ved å anvende mikropelateteknikk. I trinn en, dannes aktivert faktor X (Xa) via det intrinsiske spor hvor FVIII: C virker som en ko-faktor. I trinn to, blir faktor Xa deretter bestemt ved å anvende et syntetisk kromogent substrat, S-2222 i nærvær av en trombininhibitor I-2581 for å forhindre hydrolyse av substratet ved trombin. Reaksjonen stanses med syre, og VIII: C aktiviteten, som er proporsjonal med frigivelsen av pNA (para-nitroanilin), bestemmes fotometrisk ved 405 nm mot en reagensblindprøve.

35

Metoden er i samsvar med kravene i the European Pharmacopoeia. Enheten av FVIII: C uttrykkes i internasjonale enheter (IU) som definert i den for tiden internasjonale

konsentratstandard (IS) etablert av verdens helseorganisasjon (WHO). Rutinen med å anvende buffer som inneholder 1 % BSA i stedet for vanskelig hemofiliplasma for fortyndinger er blitt validert. Se også litteraturreferanser (European Pharmacopoeia Supplement 2000, general Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosén S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. J. Haematol, Suppl 40, vol 33, 139-145, 1984; Carlebjörk G, Oswaldsson U, Rosén S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. Thrombosis Research 47; 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A and Thorpe R. Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. Biological, 24, 351-362 (1996)).

Bestemmelse av totalt protein i henhold til Bradford

Proteinbestemmelse i henhold til Bradford er basert på den observasjon at absorpsjonsmaksimum for en sur oppløsning av Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter fra 465 nm til 595 nm når binding til protein forekommer. Både hydrofobe og ioniske interaksjoner stabiliserer den anioniske formen av fargen, og fører til en synlig fargeforandring. Analysen er anvendbar da ekstinksjonskoeffisienten for en farge-albumin kompleks oppløsning er konstant over et 10-ganger konsentrasjonsområde. Se også referanse Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976, for ytterligere informasjon.

Bestemmelse av totalt protein i henhold til aminosyreanalyse (AAA)

Før AAA hydrolyseres alle proteinene med 6 M HCl i 24 timer ved 110°C. Aminosyrene separeres ved kationbytterkromatografi på sulfonerte polystyrenharpikser og detekteres kontinuerlig i eluenten. Deteksjonen er basert på post-kolonne ninhydrin-derivatisering ved anvendelse av et dobbelt fotometer for samtidig måling ved 440 nm for prolin og hydroksyprolin og ved 570 nm for alle andre aminosyrer. Aminosyrene asparagin og glutamin er begge deamidert under AAA og bestemmes som henholdsvis asparagin og glutaminsyre. Således representerer resultatene summen av henholdsvis asparaginsyre/asparagin (Asx) og glutaminsyre/glutamin (Glx) i den opprinnelige prøven. Tryptofan danner ikke en distinkt respons ved anvendelse av denne metoden, og derfor kvantifiseres den ikke ved AAA. Cystein ødelegges under hydrolysen og kvantifiseres ikke. AAA er videre beskrevet i referansen: Total protein AAA analytical

method. Spackman, D. H., Stein, W. H., and Moore, S. (1958) Anal. Biochem. 30: 1190-1206.

Renhet eller spesifikk aktivitet (FVIII: C/totalt protein)

5

Renheten (eller også betegnet spesifikk aktivitet) for en prøve beregnes ved å ta verdien oppnådd fra FVIII:C analysen og dividere den med verdien oppnådd fra analysen av totalt protein.

10 SDS-PAGE (molekylvektfordeling)

SDS polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) involverer separasjon av proteiner basert på deres størrelse. Denne metoden beskriver SDS-PAGE av proteinene, som kjøres under reduserte betingelser. Ved oppvarming av prøven under denaturerende betingelser og reduserende betingelser, foldes proteinene opp og belegges med anionisk detergent natriumdodecylsulfat (SDS), som krever en høy netto negativ ladning som er proporsjonal med lengden av polypeptidkjeden. Når påført på en polyakrylamidgelmatriks og plassert i et elektrisk felt, migrerer de negativt ladede proteinmolekyler mot den positivt ladede elektroden og separeres ved en molekyl-sil effekt, dvs. ved deres molekylvekt. Polyakrylamidgeler holder tilbake større molekyler fra å migrere så hurtig som mindre molekyler. Fordi ladning-til-masse forholdet er nærmest det samme blant SDS-denaturerte polypeptider, er den endelige separasjonen av proteiner avhengig nesten fullstendig av forskjellene i den relative molekylmassen av polypeptider. I en gel med homogen densitet er den relative migreringsavstand for et protein (R_f) negativt proporsjonalt med log av dets masse. Dersom proteiner med kjent masse kjøres samtidig med de ukjente, kan sammenhengen mellom R_f og massen plottes, og massene av ukjente proteiner kan estimeres. Proteinbånd separert ved elektroforese visualiseres ved sølvfarging. Evaluering gjennomføres visuelt ved å bedømme tilsynekomsten av standardene, referanse (kontrollprøve) og analyserte prøver.

30

DNA analysemetode (kvantitativ polymerasekjedereaksjon, qPCR)

Analysen er en sanntid kvantitativ PCR (qPCR) analyse basert på SYBR Green 1 kjemi. Den er basert på en publikasjon av Umetani et al. med noen tilførte forbedringer (Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ and Hoon DSB. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or

35

Periapillary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. Clin Chem 2006;52:1062-1069). Under hver PCR syklus amplifiseres 115 baseparfragment fra ALU sekvensfamiliene ved primerne, ALU115-F og ALU115-R. Den svært tallrike ALU sekvensfamilien begrenses til genom av familien *Hominidae* (sjimpanse, gorilla, menneske og orangutang), men analysen amplifiserer kun DNA fra human opprinnelse. Prosedyren tillater høy gjennomløpsanalyse av rest HEK293F DNA i cellefrie vevskulturmedier og dens nedstrøms renseprosesser.

Western Blot, FVIII molekulmassefordeling

Proteiner og peptider i FVIII preparater separeres i henhold til molekulmasse ved natriumdodecylsulfat (SDS) polyakrylamidgel-elektroforese (PAGE) under reduserende betingelser. Deretter overføres proteinene elektroforetisk fra gelmatriksen til en nitrocellulosemembran som deretter inkuberes med et blokkeringsmiddel. Polyklonale saueantistoffer rettet mot hele FVIII molekylet tilsettes deretter etterfulgt av et sekundært antistoff som er spesifikt for Fc delen av geite-/saueantistoffer. Som et tredje trinn blir oppløselige komplekser av geiteantistoff mot pepperrot-peroksidase (HRP) og HRP tilsettes. FVIII polypeptider detekteres deretter ved forekomst av blå bånd etter inkubering med substratet 4-klor-1-naftol.

Todimensjon polyakrylamidgelelektroforese (2-D-PAGE)

2-D-PAGE ble gjennomført for å studere elektroforesebånd mønsteret til proteinkjeden av human-cl rhFVIII. Isoelektrisk fokusering ble gjennomført som den første dimensjonskjøring ved anvendelse av en lineær pH gradient fra pH 3 til 10. Den sekundære dimensjon SDS-PAGE ble kjørt ved å anvende polyakrylamidgradient (3-8 %) geler. Gelene ble enten farget med sølvfarge etter den andre dimensjonskjøring eller ble underkastet western blotting (O' Farell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021).

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å rense eller anrike koagulasjon-FVIII ved å anvende
5 kromatografi på en multimodal harpiks med enheter bundet til en matriks og hvor enhetene er i stand til å interagere med FVIII i en blanding ved ioniske interaksjoner og andre typer av interaksjoner, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med
 - tilveiebringelse av en fraksjon som inneholder FVIII i en vandig oppløsning med en høy ionestyrke;
 - 10 - bringe fraksjonen inneholdende FVIII i kontakt med den multimodale harpiksen;
 - eventuelt vaske den multimodale harpiksen med FVIII adsorbert med en vandig vaskebuffer;
 - eluering av FVIII inneholdende fraksjoner ved en vandig elueringsbuffer som
15 omfatter minst en aminosyre som er positivt ladet ved pH 6 til 8 valgt fra gruppen som består av lysin, arginin, histidin og kombinasjoner derav; og
 - eventuelt samling av FVIII inneholdende fraksjoner i rensset eller anriket form.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor den multimodale harpiksen omfatter en-
20 heter bundet til en matriks, og hvor enhetene er i stand til å interagere med FVIII i et vandig miljø ved ioniske interaksjoner og andre typer av interaksjoner slik som hydrogenbinding og hydrofob interaksjon.
3. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 eller 2,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at FVIII er rekombinant FVIII, særlig B-domene deletert FVIII.
4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en vandig oppløsning omfatter FVIII i en oppløsning
30 med høyt saltinnhold som svarer til en ledningsevne fra omtrent 25 til omtrent 200 mS/cm ved 25°C.
5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at lysin, arginin eller histidin er til stede i konsentrasjoner
35 på > 0,4 M, særlig > 0,5 M.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,

k a r a k t e r i s e r t v e d at elueringsbufferen i tillegg omfatter en hydroksylgruppe inneholdende organiske forbindelser slik som en alkohol, minst en aminogruppe inneholdende organiske forbindelser slik som en aminosyre, minst en kilde som tilveiebringer Ca^{2+} ioner, minst en forbindelse for å regulere ionestyrken av bufferen slik
 5 som uorganiske salter, minst en ikke-ionisk detergent og minst en buffersubstans for å regulere pH fra omtrent 6 til omtrent 8, særlig til omtrent en nøytral verdi.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 6,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at alkoholen er valgt fra gruppen som består av metanol,
 10 propanol, etylenglykol og propylenglykol; kilden som tilveiebringer Ca^{2+} er CaCl_2 ; de uorganiske salter er valgt fra gruppen som består av KCl og NaCl, den ikke-ioniske detergent er valgt fra gruppen som består av Tween 20, Tween 80 og Pluronic F68; buffersubstansen er valgt fra gruppen som består av natriumcitrat, histidin, HEPES, MES og natriumacetat ved en pH mellom 6-8.

15 8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 6 til 7,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at vaskebufferen påføres på den multimodale harpiksen for å vaske bort kontaminanter og bibeholde FVIII, før FVIII frigis.

20 9. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den "multimodale" kromatografiharpiksen inneholder minst en av de etterfølgende enheter:
 a. en positivt ladet N-benzyl-N-metyletanolamin-ligand,
 b. en negativt ladet 2-(benzoylamino)butansyre-ligand,
 25 c. en fenylpropyl-ligand,
 d. en N-heksyl-ligand,
 e. en 4-merkapto-etyl-pyridin-ligand,
 f. en 3-((3-metyl-5-((tetrahydrofuran-2-ylmetyl)-amino)-fenyl)-amino)-benzosyre-ligand eller kombinasjoner derav.

30 10. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 9,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den "multimodale" kromatografiharpiksen er valgt fra de etterfølgende kommersielt tilgjengelige harpikser HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

35 11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det multimodale kromatografitrinn kombineres med et FVIII affinitetskromatografitrinn hvor affiniteten tilveiebringes ved en ligand som er basert på et protein uttrykt i gjær.

- 5 12. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at rensesekvensen ytterligere omfatter patogenfjerning-/inaktiveringstrinn som omfatter et kjemisk basert inaktiveringstrinn, et størrelses-basert fjerningstrinn, kromatografitrinn eller kombinasjoner derav, hvilke trinn er basert på forskjellige fysiologiske egenskaper rettet mot patogenet som skal fjernes.

10

13. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at rensesekvensen videre omfatter de etterfølgende trinn:
- i. en anionisk membran slik som Sartobind Q særlig for DNA reduksjon;
 - ii. en kation-multimodal harpiks slik som Capto MMC;
 - 15 iii. en kationbytterharpiks slik som SP Sepharose FF;
 - iv. en anionisk membran slik som Sartobind Q, særlig for ytterligere DNA reduksjon;
 - v. et kjemisk basert inaktiveringstrinn for viruser med lipidkappe ved særlig løsningsmiddel-/detergent-inaktivering ved å anvende tri-n-butylfosfat og
 - 20 Triton X-100;
 - vi. en affinitetsharpiks basert på en proteinligand slik som VIIISelect, idet VIIISelect liganden består av et antistoff fragment uttrykt i gjær eller en anion-multimodal kromatografiharpiks slik som Capto Adhere;
 - vii. et patogen filtreringsfjernettrinn med en gjennomsnittlig porestørrelse på
 - 25 omtrent 20 nm slik som Planova 20N;
 - viii. en ionbytterharpiks slik som Q Sepharose FF;
 - ix. en størrelseseskluderingskromatografiharpiks slik som Superdex 200pg.

30

14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at elueringsbetingelsene for FVIII i kationbyttertrinnet er basert på Ca, idet konsentrasjonen strekker seg fra 0,15-0,25 M og den totale ledningsevnen til elueringsbufferen overskrider ikke 25 mS/cm ved 25°C.

35

15. Fremgangsmåte ifølge krav 13 og/eller 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at renheten etter siste rensetrinn er > 4000 IU/mg, foretrukket > 9000 IU/mg og mere foretrukket >10000 IU/mg protein, og at DNA innholdet er < 1000 pg/1000 IU FVIII, foretrukket < 100 pg/1000 IU FVIII.

-1/11-

Vedlegg 1

Cellesuspensjon (2-3e7 celler/ml)



Salting



Celleseparasjon



DNA reduksjon (Q-membr.)



**Oppfangingsstrinn
(Capto MMC)**



Sp Seph FF



DNA reduksjon (Q-membr.)



S/D behandling



VIIISelect affinitetsligand



Q-Seph FF



GF-eluat

-2/11-

Vedlegg 2

Cellesuspensjon (2-3e7 celler/ml)



Salting



Celleseparasjon



DNA reduksjon (Q-membr.)



**Oppfangstrinn
(Capto MMC)**



DNA reduksjon (Q-membr.)



SP-Seph FF



S/D behandling



Capto Adhere



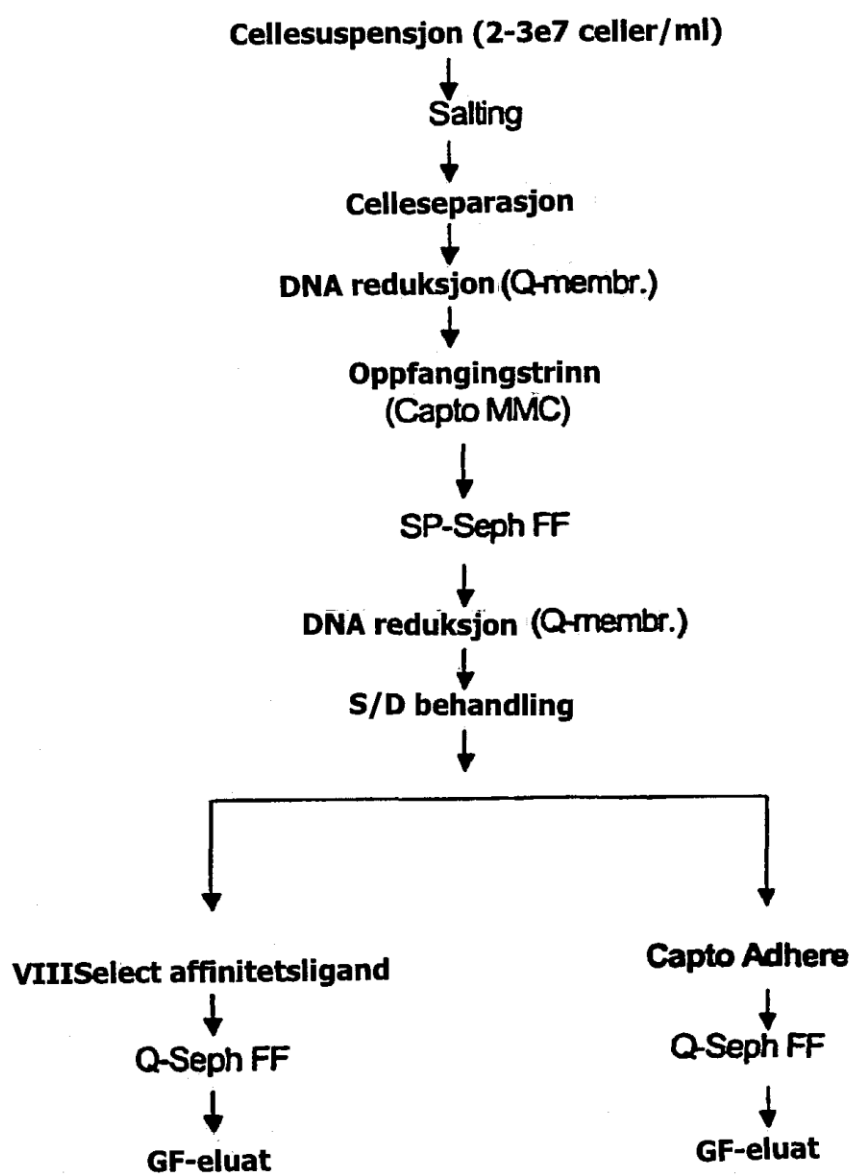
Q-Seph FF



GF-eluat

-3/11-

Vedlegg 3



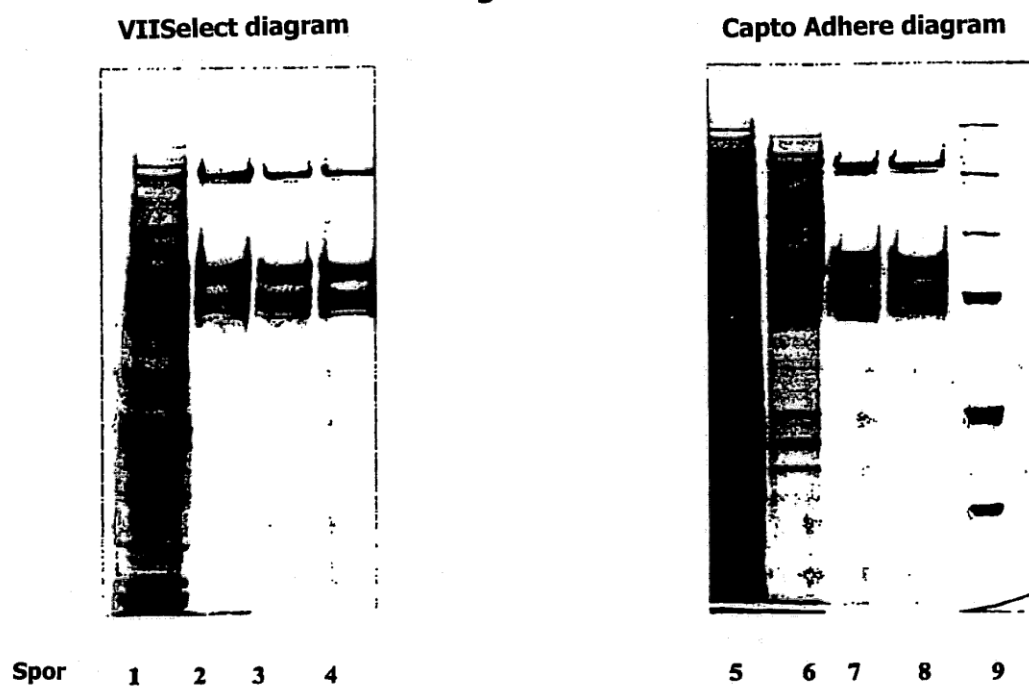
-4/11-

Figur 1

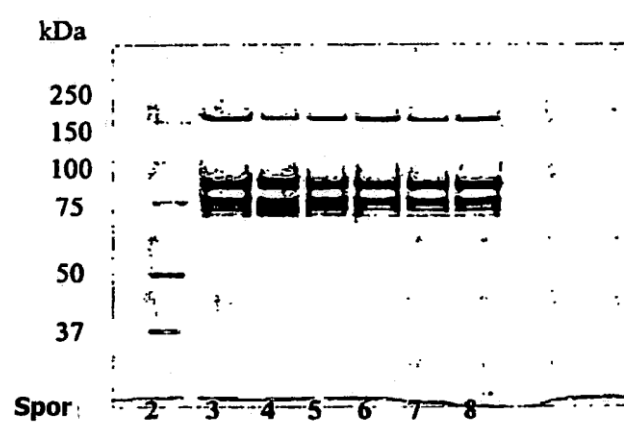


-5/11-

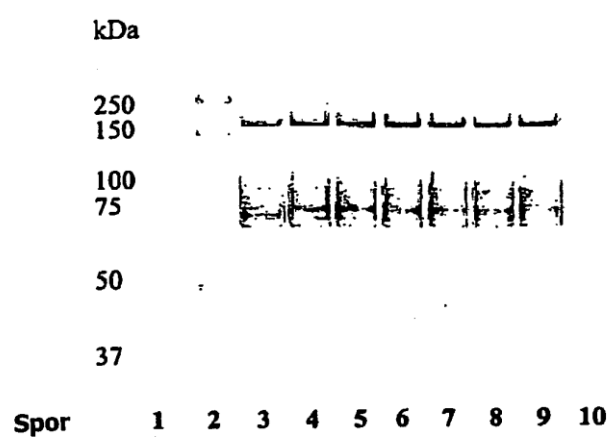
Figur 2



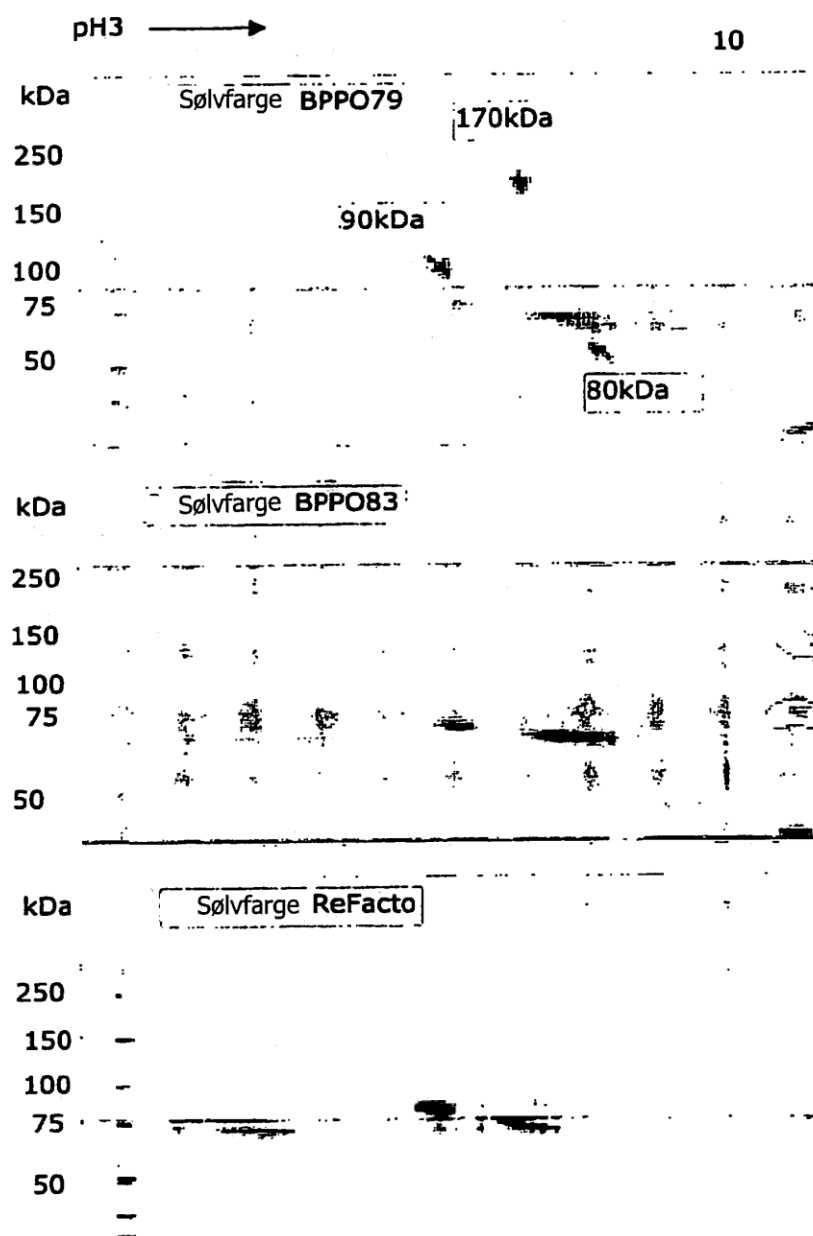
-6/11-

Figur 3

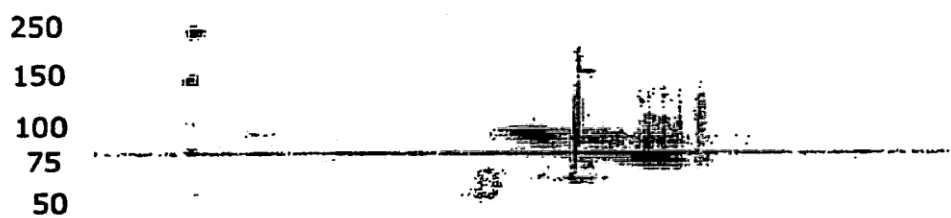
-7/11-

Figur 4

-8/11-

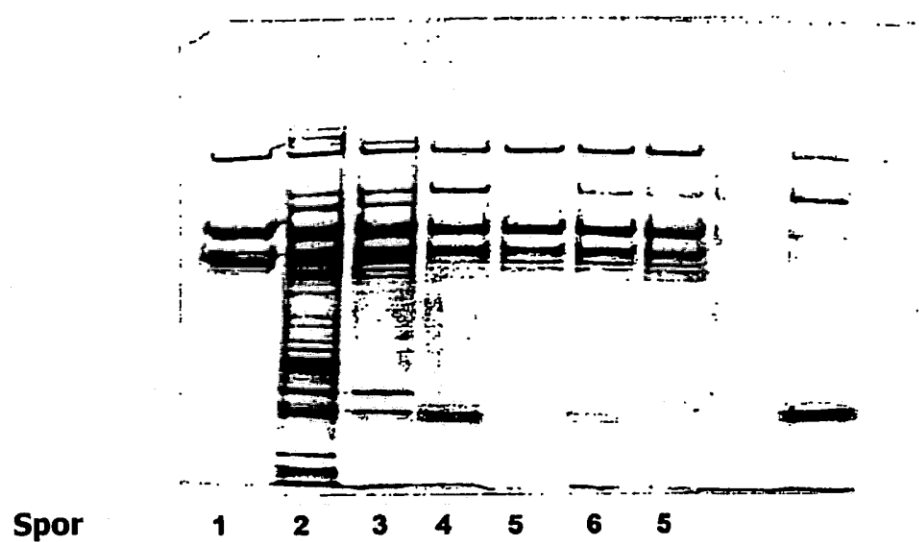
Figur 5a

-9/11-

Figur 5b**kDa Western BPO83****kDa Western ReFacto**

-10/11-

Figur 6



-11/11-

Figur 7