

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(12) TŁUMACZENIE PATENTU EUROPEJSKIEGO

(19) PL (11) **PL/EP 1457497**

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
03.03.2004 04380045.7

(13) T3

(51) Int. Cl.

C07K1/34 (2006.01)
A61K38/36 (2006.01)
C07K14/75 (2006.01)

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
08.10.2008 Europejski Biuletyn Patentowy 2008/41
EP 1457497 B1

(54) Tytuł wynalazku:

Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu

(30) Pierwszeństwo:

ES20030000538 06.03.2003

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.09.2004 Europejski Biuletyn Patentowy 2004/38

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:

30.06.2009 Wiadomości Urzędu Patentowego 06/2009

(73) Uprawniony z patentu:

Grifols, S.A., Barcelona, ES

(72) Twórca (y) wynalazku:

Ristol Debart Pere, Sabadell, ES
Fernandez Rodriguez Jesus, Gava, ES

(74) Pełnomocnik:

PolSERVICE Kancelaria Rzeczników Patentowych Sp. z o.o.
rzecz. pat. Pietruszyńska-Dajewska Elżbieta
00-950 Warszawa
skr. poczt. 335

PL/EP 1457497 T3

Uwaga:

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

Opis

Niniejszy wynalazek dotyczy sposobu usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu poprzez nanofiltrację i ponadto dotyczy uzyskanego wspomnianym sposobem fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego.

Stan techniki

Fibrynogen osoczowy, glikoproteina posiadająca masę cząsteczkową wynoszącą 340,000 daltonów, jest czynnikiem krzepnięcia, aktywowanym podczas hemostazy na końcu kaskady krzepnięcia. Fibrynogen ten zaangażowany jest w hemostazę pierwotną, w czasie agregacji płytek, i hemostazę wtórną, w czasie tworzenia skrzepu fibrynowego.

Fibrynogen jako produkt terapeutyczny, którym jest białko oczyszczone z ludzkiego osocza, oprócz innych zastosowań, stosowany jest do leczenia substytucyjnego w sytuacjach, w których występuje niedobór tego białka oraz jako składnik klejów tkankowych, w hemostazie i gojeniu ran, rekonstrukcji tkanek, kleju biologicznym i jako nośnik do uwalniania leków i hormonów.

Do zastosowania komercyjnego fibrynogen wytwarza się z ludzkiego osocza od licznych dawców (pula, ang. pool). Pomimo kontroli przeprowadzanych na dawcach i oddanej krwi w bankach krwi, jednostkach osocza, minipulach i pulach przemysłowych do frakcjonowania nie można wyeliminować możliwości zanieczyszczenia wirusami występującymi we krwi. Z tego powodu do sposobów oczyszczania białek osoczowych wprowadza się specyficzne etapy usuwania wirusów. Ma to ogromne znaczenie w przypadku tego białka, które może być

oczyszczane na skalę przemysłową z wykorzystaniem jako materiału wyjściowego krioprecypitatu lub FrI (pierwsza frakcja) przy użyciu metody Cohna [Cohn J. et al.; J Am Chem Soc (1946) 68, 459-475], ponieważ 5 potencjalnie zawierają one większą ilość wirusów, gdyż materiał wyjściowy zlokalizowany jest na początku frakcjonowania osocza i ponadto nie wywiera on wpływu redukującego w następnym etapie frakcjonowania z użyciem etanolu.

10 Ze względu na szerokie stosowanie i udowodnioną skuteczność spośród metod zmniejszania zawartości wirusów, stosowanych w procesach oczyszczania białek osoczowych należy podkreślić następujące:

- obróbki cieplne. Potencjalnie zmniejszają one 15 efektywną zawartość wirusów zarówno w odniesieniu do wirusów z osłonką, jak i wirusów bez osłonki. Ich skuteczność jest bezpośrednio związana ze stabilnością termiczną białka oraz z dodawanym stabilizatorem. Z tego względu wykazują one wadę polegającą na tym, że 20 cząsteczka białka podlega zróżnicowaniom, które prowadzą do powstawania neoantygenów. [CPMP/Note for guidance on plasma derived products (CPMP/BWP/269/95rev. 3) January 2001].

- obróbki przy użyciu rozpuszczalników 25 organicznych (OSD). Ze względu na ich wysoką skuteczność w inaktywacji wirusów z osłonką lipidową jest to szeroko stosowana obróbka, którą można uważać za referencyjną dla wirusów innych typów. Z drugiej strony nie wywiera ona żadnego wpływu na wirusy bez 30 osłonki lipidowej, takie jak parwowirus i wirus zapalenia wątroby typu A [Burnouf T. Blood Reviews

(2000) 14, 94-110; Martinowitz U.Curr. Opin. Hematol (1996) 3, 395-402].

Z drugiej w obecnych czasach istnieje tendencja do włączania co najmniej dwóch uzupełniających się 5 etapów usuwania wirusów.

- filtracja roztworów przez filtry o wielkości porów zdolnej do zatrzymania cząstek wirusowych jest metoda, która w ostatnich latach była szeroko stosowana. Stanowi ona proces fizyczny, który, co do 10 zasady, nie jest w stanie wpływać na strukturę białek a jest w stanie skutecznie usuwać zawartość wirusów, w zależności od zastosowanej wielkości porów. Ta wielkość porów zależy w szczególności od rozmiarów przestrzennych cząsteczki białka, które ma być poddane 15 filtracji (które musi przejść przez filtr). Filtracja poprzez filtry 20 nm lub mniejsze może zagwarantować znaczącą redukcję ilości małych wirusów bez osłonki, takich jak wirus zapalenia wątroby typu A i parwowirus, które mają wielkość pomiędzy 20 a 30 nm. Z drugiej 20 strony, filtracja poprzez filtry o większej wielkości porów (35 nm lub większych) nie zagwarantuje wystarczającego poziomu bezpieczeństwa względem tych wirusów. Trudność tej metody w sposób oczywisty wydaje się być niemożliwa do przezwyciężenia w przypadku gdy 25 zanikają różnice wielkości pomiędzy wirusem i białkiem. [J. J. Morgenthaler, Vox Sang (2000) 78 (supl. 2), 217-221].

Przemysłowe zastosowanie nanofiltracji roztworu fibrynogenu poprzez filtry 35 nm zostało już opisane, 30 jednak nie w przypadku filtrów o mniejszych rozmiarach. Ze względu na swoją charakterystykę w zakresie

wielkości cząsteczkowej i stabilności fibrynogen jest białkiem, które stwarza problemy przy filtracji, nawet przy podjęciu próby sterylizacji przez filtrację poprzez filtry o wielkości porów 0,2 μm .

5 W publikacji patentowej nr WO 99/23111 opisywana jest i zastrzegana filtracja roztworu fibrynogenu poprzez filtr o wielkości porów 35 nm, z dodatkiem detergentu, który umożliwia tę filtrację pozwalając jednocześnie na uniknięcie zasadniczej utraty białka,
10 która sprawiłaby, że to przemysłowe zastosowanie byłoby nieprzydatne.

 W publikacji patentowej nr WO 98/37086 stwierdzono, że obecność białek o wysokiej masie cząsteczkowej (wyższej niż 150 kD), które obejmują
15 fibrynogen, utrudnia filtrację mniejszych białek poprzez nanofiltry 15 nm. W patencie tym opisywana jest metoda usuwania białek o wysokiej masie cząsteczkowej (w tym fibrynogenu) w celu umożliwienia przeprowadzenia nanofiltracji. Zatem nie jest to celem
20 niniejszego wynalazku, ale przedstawia problem związany z nanofiltracją cząsteczek o wysokiej masie cząsteczkowej.

 W zgłoszeniu patentowym nr EP 1 161 958 A1 opisano metodę inaktywacji wirusów w płynach
25 biologicznych. W opisanym procesie wielkość porów nanofiltera jest uzależniona od wielkości białka, które ma być poddane filtracji, a przykłady pokazują filtrację przez filtry 35 nm, przed którą przeprowadza się chromatografię roztworu, który ma być poddany
30 filtracji w celu ułatwienia nanofiltracji. Dowodzi to, że w przypadku gdy białko ma znaczącą wielkość

występują trudności w przeprowadzaniu nanofiltracji, nawet poprzez filtry 35 nm.

W zgłoszeniu patentowym nr US 2001/0051154 A1 opisano stabilizację białek, w tym fibrynogenu, mającą na celu zabezpieczenie ich przed utratą aktywności lub denaturacją podczas obróbki mającej na celu redukcję zawartości wirusów zarówno poprzez pasteryzację, jak i nanofiltrację. Wymaga to dodania dużej ilości cukrów (= 0,5 g/ml) i jednego lub więcej aminokwasu (> 0,5 mol/l). Jednakże w tym zgłoszeniu nie opisano, ani nie przedstawiono przykładów nanofiltracji fibrynogenu, a zatem nie można wysnuć wniosku, że nanofiltracja fibrynogenu może być przeprowadzona poprzez filtry o wielkości porów mniejszej niż 35 nm.

Do preparowania fibrynogenu, jako składnika klejów tkankowych, które w obecnych czasach są komercyjnie dostępne [M. R. Jackson, The American Journal of Surgery (2001) 182, 1S-7S], wykorzystywane są metody redukcji zawartości wirusów, polegające głównie na obróbkach termicznych i obróbkach przy użyciu OSD. Nanofiltracja nie wydaje się być metodą z wyboru, prawdopodobnie z powodu faktu, że filtracja poprzez filtry 35 nm (lub o większej wielkości porów) nie jest skuteczna w przypadku małych wirusów, które nie zostały usunięte przy użyciu OSD lub obróbki cieplnej.

Podsumowanie wynalazku

Niniejszy wynalazek umożliwia filtrację roztworu fibrynogenu poprzez filtry o nominalnej wielkości porów mniejszej niż 35 nm w warunkach obejmujących czas

5 obróbki, obszar filtracji i odzysk białka, które pozwalają na jej przemysłowe zastosowanie w wytwarzaniu oczyszczonego fibrynogenu jako produktu terapeutycznego. Filtrację tę osiąga się poprzez wcześniejsze zamrażanie i rozmrażanie roztworu oczyszczonego fibrynogenu w kontrolowanych warunkach. Twórcy niniejszego wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, poprzez to kontrolowane zamrażanie i rozmrażanie, że nierozpuszczalny, zagregowany lub 10 częściowo zdenaturowany materiał ulega precypitacji, co w praktyce uniemożliwia filtrację roztworu poprzez pory o wielkości mniejszej niż 35 nm. Oddzielenie materiału, który uległ precypitacji pozwala na nanofiltrację poprzez pory o wielkości mniejszej niż 35 nm.

15 W szczególności niniejszy wynalazek obejmuje sposób określony w zastrzeżeniu 1.

Szczegółowy opis wynalazku

20 Jako materiał wyjściowy do oczyszczania fibrynogenu pochodzącego z ludzkiego osocza, z którego poprzez precypitację, korzystnie przy użyciu glicyny, uzyskuje się oczyszczony precypitat fibrynogenu, można zastosować krioprecypitat, pierwszą frakcję (FrI) według metody Cohna albo równoważną frakcję zawierającą 25 fibrynogen.

Frakcję wyjściową, przed rozpuszczeniem i klaryfikacją, można poddać obróbce z użyciem rozpuszczalnika organicznego i detergentu (OSD) w celu inaktywacji ewentualnie obecnych wirusów z osłonką 30 lipidową. OSD można usunąć przy użyciu dowolnej znanej

metody, takiej jak chromatografia, lub, korzystnie, w tym przypadku, poprzez precypitację z użyciem glicyny.

Oczyszczoną frakcję bogatą w fibrynogen można rozpuścić, klaryfikować poprzez filtrację lub wirowanie i dostosować przy użyciu środków stabilizujących, korzystnie aminokwasów (arginina, glicyna lub równoważnych) i węglowodanów (sacharoza), do pH korzystnie pomiędzy 6,0 a 8,0 i zawartości jonów korzystnie doprowadzonej przy użyciu chlorku sodu do fizjologicznie dopuszczalnych stężeń.

Wychodząc ze wspomnianego powyżej dostosowanego i oczyszczonego roztworu fibrynogenu o czystości korzystnie większej lub równej 80 %, twórcy niniejszego wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że poprzez zamrażanie i rozmrażanie roztworu w kontrolowanej temperaturze pomiędzy 5 a 20 °C, a korzystnie pomiędzy 8 a 13 °C, uległe już agregacji lub denaturowane niestabilne składniki związane z fibrynogenem stają się nierozpuszczalne. Te materiały można łatwo oddzielić przez klaryfikację poprzez nylonowe, metalowe sito lub korzystnie poprzez dekantację, wirowanie lub bezpośrednią filtrację, korzystnie przy użyciu gradientu filtrów, albo poprzez kombinację dowolnej ze wspomnianych powyżej metod. Powstały tak materiał można nieoczekiwanie poddać nanofiltracji nawet poprzez pory mniejsze niż 35 nm, przy bardzo akceptowalnej wydajności produkcji i odzysku.

Korzystny sposób realizacji niniejszego wynalazku zostanie opisany tu poniżej. Materiał powstały w wyniku tej klaryfikacji, rozcieńczony do stężenia niższego od lub równego 1,5 mg/ml w obecności

co najmniej jednego aminokwasu (korzystnie argininy) w stężeniu pomiędzy 0,1 a 8% (wag./obj.) i temperaturze pomiędzy 18 a 37°C, korzystnej w obydwu przypadkach, uprzednio poddany klaryfikacji poprzez filtry o 5 większej wielkości porów, poddaje się filtracji poprzez nanofiltr o wielkości porów mniejszej niż 35 nm (korzystnie około 20 nm), przy czym odzysk białka jest 10 większy niż 80%. Powierzchnia filtra wymagana do przeprowadzenia tej nanofiltracji wynosi pomiędzy 10 a 1,000 cm² na litr roztworu, który ma być poddany 15 filtracji, w zależności od stężenia białka w roztworze i wielkości porów stosowanego nanofiltru. Czas tej obróbki jest zazwyczaj krótszy niż 12 godzin.

Dane uzyskane dla odzysku białka, niezbędnej 15 powierzchni filtra i wymaganego czasu obróbki, wraz z charakterystyką uzyskanego produktu, wykazują, że wynalazek może być wykorzystywany w procesach przemysłowych.

20 Przykłady realizacji wynalazku

Przykład 1

Jako materiał wyjściowy stosowano frakcję I poddaną precypitacji przy użyciu 8% zimnego etanolu zgodnie z metodą Cohna. 10 kg wspomnianej frakcji I 25 zawieszono w stosunku 1:9 w roztworze buforu zawierającym cytrynian/chlorek sodu, jak również antykoagulant i środek antyfibrynolityczny. Zawiesinę klaryfikowano w 30°C poprzez filtry głębokościowe wykonane z estrów polipropylenu i celulozy (obydwa z 30 Millipore) do wielkości porów wynoszącej w przybliżeniu 0,5 mikrona.

Roztwór ten poddano następnie obróbce przy
użyciu rozpuszczalnika/detergentu, mającej na celu
inaktywację wirusów, stosując 0,3% fosforanu tri-n-
butylu i 1% polisorbatu 80, i inkubowano w 27 °C nie
5 krócej niż 6 godzin. Inaktywowany roztwór schłodzono do
9 °C i poddano precypitacji poprzez dodanie glicyny do
stężenia wynoszącego 1,7 M. Utworzony precypitat
oddzielono poprzez wirowanie przy w przybliżeniu 15,000
rpm, stosując wirówkę Sharples o ładowności 5 kg, a
10 następnie zawieszono w roztworzenie chlorku/cytrynianu
sodu, i poddano ponownie precypitacji z użyciem glicyny
w stężeniu do 1,5 M. Tak utworzony precypitat
oddzielono następnie ponownie poprzez wirowanie i
następnie ponownie poddano precypitacji w taki sam
15 sposób jak w poprzednim etapie.

Powstały tak precypitat (trzeci precypitat
glicyną) stanowi 60-80% masy wyjściowej frakcji I i
składa się w przybliżeniu z 15 % suchego białka, z
czego w przybliżeniu 90 % stanowi fibrynogen. Materiał
20 ten rozpuszczono w 30 °C w stosunku 1:3 w 3,4 %
roztworze sacharozy przy izotonicznym stężeniu soli
chlorku/cytrynianu sodu, a następnie filtrowano poprzez
filtr głębokościowy i klaryfikujący (obydwa z
Millipore) do wielkości porów wynoszącej w przybliżeniu
25 1 µm. Uzyskano w przybliżeniu 30 litrów roztworu.

Materiał ten poddano następnie diafiltracji
poprzez membrany 100 kDa (z Pall-Filtron) wobec 1 %
argininy, w celu usunięcia nadmiaru soli, sacharozy i
glicyny, a gdy uzyskał on 1,5 % zawartość fibrynogenu
30 preparowano go z 0,5 % albuminy, klaryfikowano poprzez

filtry 0,5 mikrona i w celu sterylizacji filtrowano przez filtry 0,2 mikrona.

Wychodząc ze wspomnianego powyżej sterylnego roztworu podjęto próbę filtracji poprzez filtry 0,1
5 mikrona, przez dyski o średnicy 47 mm (Pall DVD i DJL) jednakże prawie natychmiast filtr został zablokowany (w przybliżeniu 5 do 10 minut) i przefiltrowano mniej niż około 5 ml roztworu, przy czym w filtracji zaobserwowano redukcję OD wynoszącą 2,1 AU (z 27,2 AU
10 do 25,1 AU). Wyniki te były niesatysfakcjonujące i wykazały istnienie problemów z filtracją fibrynogenu, nawet poprzez filtry o wielkości porów 0,1 mikrona.

Roztwór przefiltrowany poprzez filtry 0,2 mikrona zamrożono w -70°C w celu przeprowadzenia
15 kolejnych testów filtracji.

Przykład 2

Roztwór przefiltrowany poprzez filtry 0,2 mikrona z przykładu 1 rozmrożono całkowicie w 30°C w
20 celu przeprowadzenia testów nanofiltracji przy różnych stężeniach fibrynogenu, przy czym ewentualny pozytywny efekt badano poprzez zastosowanie ekstremalnego rozcieńczenia, jako proces do dyspersji cząsteczek fibrynogenu w obecności roztworu aminokwasu (arginina).

Podwielokrotność porcji roztworu filtrowanego poprzez filtry 0,2 mikrona rozcieńczano przy użyciu 0,66 % roztworu argininy, 2,7 mM cytrynianu sodu i 62,6 mM chlorku sodu w pH 7,0 i 30°C w taki sposób, że
25 końcowe stężenia fibrynogenu wynosiły w przybliżeniu 5;
30 3; 1; 0,7 i 0,5 mg/ml.

Każdy rozcieńczony roztwór filtrowano poprzez filtry 0,1 mikrona, bezpośrednio przed przeprowadzeniem nanofiltracji poprzez wkład o wielkości porów 35 nm (BMM-Planova 35N z Asahi-Kasei) i powierzchni 10 cm².

5 Warunki ciśnieniowe były takie jak zalecał wytwórca: 0,2 do 1,0 bara; a temperatura podczas wszystkich procesów filtracji wynosiła 25 do 30 °C.

Uzyskane wyniki dotyczące zdolności filtracyjnej i odzysku pokazano w Tabeli 1.

10

Fibrynogen (mg/ml)	Przefiltrowane białko (g/m ²)	Odzysk (%)
5	19	20
3	30	35
1	46/50	61/56
0,7	50	62
0,5	65	69

Na podstawie przedstawionych powyżej wartości można wnioskować, że nanofiltrację poprzez filtry 35 nm można przeprowadzić jedynie w przypadku gdy stężenie fibrynogenu jest bardzo rozcieńczone, korzystnie do 15 pomiędzy 1 a 0,5 mg/ml lub niższego, przy czym w tym zakresie osiąga się akceptowalne wartości zdolności filtracyjnej (g fibrynogenu/m²) i odzysku (> 50% fibrynogenu).

20 Oczywiście jedna z głównych wad nanofiltracji w bardzo rozcieńczonych warunkach polega na nadmiernej objętości do filtracji oraz na końcowym stężeniu produktu przed dawkowaniem, przez co optymalna byłaby wartość w pobliżu górnej wartości ustalonego zakresu.

Nawet w najlepszych warunkach obróbki oczywistym jest, że trudno jest poddać produkt nanofiltracji poprzez filtry 35 nm przez postępowanie w opisany powyżej sposób, który wymaga rozmrażania produktu i całkowitego rozpuszczenia fibrynogenu w 30 °C.

Przykład 3

Kolejną partię poddawano obróbce jak w przykładzie 1 aż do uzyskania solubilizowanego i klaryfikowanego z użyciem glicyny precypitatu III, którego część zamrożono w -70 °C w celu jego konserwacji. Pozostała część roztworu poddano obróbce jak w przykładzie 1 z uzyskaniem produktu końcowego filtrowanego poprzez filtr 0,2 mikrona.

Porównawczy test nanofiltracji przeprowadzono poprzez 20 nm dysk (Pall's Ultipor-DV20) o średnicy 47 mm, stosując świeży materiał (końcowy produkt filtrowany poprzez filtr 0,2 mikrona bez mrożenia) i odpowiadający mu materiał mrożony, zawierające fibrynogen w stężeniu wynoszącym 0,73 do 0,74 mg/ml, a zastosowane ciśnienie było takie jak zalecał wytwórca filtra (Pall) i wynosiło 2,2 do 2,8 bara.

W przypadku materiału mrożonego najpierw przeprowadzono całkowite rozmrażanie w temperaturze pokojowej (temperatura roztworu < 20 °C) a materiał klaryfikowano poprzez filtr 0,5 mikrona. Zarówno materiał świeży, jak i materiał mrożony dogodnie rozcieńczano przy użyciu roztworu 2 % argininy (wag./obj.), 62,6 mM chlorku sodu i 2,7 mM cytrynianu sodu, pH 7,0 w 30 °C, i filtrowano poprzez filtr 0,1 mikrona bezpośrednio przed etapową nanofiltracją

poprzez filtry 50 nm (DV50) i 20 nm (DV20) w temperaturze wynoszącej w przybliżeniu 30 °C.

Wyniki obu procesów podsumowano w Tabeli 2.

	Filtrowana objętość (1) poprzez DV20	Filtrowane białko (mg/m ²)	Odzysk (%)	Czas filtracji (godz.)
Materiał świeży	29,0 (*)	23,7	99,4	5,00
Materiał mrożony	37,0	30,1	99,7	1,42
(*)Filtr uległ zablokowaniu przy wskazanej powyżej objętości, więc nie można było dokończyć nanofiltracji				

5

W teście z użyciem materiału świeżego (bez mrożenia) odzysk białka wynosił 99,4%, jednakże maksymalna ilość, którą można było poddać filtracji przed zablokowaniem filtra DV20 wynosiła jedynie 23,7 g fibrynogenu/m², a średnia szybkość przepływu fibrynogenu wynosiła 4,74 g/m²/godzinę (23,7 podzielone przez 5,00).

Z drugiej strony z użyciem materiału świeżego odzysk wynosił 99,7 % białka a filtr DV20 nie ulegał zablokowaniu przy zastosowaniu ładunku fibrynogenu wynoszącego 30,1 g/m², przy czym średnia szybkość przepływu fibrynogenu wynosiła 21,20 g/m²/godzinę. Łatwo można zauważyć, że nanofiltracja ponad 30,1 g białka jest możliwa przy zastosowaniu kontrolowanego etapu mrożenia i rozmrażania, ponieważ w tym teście nie

20

zaobserwowano żadnej nieprawidłowej redukcji szybkości przepływu filtratu, co wskazuje na brak blokady filtra.

Wpływ mrożenia/rozmrzania znalazł odzwierciedlenie w końcowej nanofiltracji poprzez filtr 5 20 nm, zarówno pod względem maksymalnej ilości filtrowanego fibrynogenu, która mogła być dużo większa niż 30,1 w przeciwieństwie do 23,7 g/m², jak i pod względem szybkości przepływu filtracji wynoszącej 21,20 w przeciwieństwie do 4,74 g fibrynogenu/m²/godzinę, 10 która jest 4,5 krotnie wyższa. Powierzchnię nanofiltracji poprzez 20 nm można oczywiście zmniejszyć o tę samą proporcję, a to pozwala na optymalizację wysokich kosztów nanofiltracji, które w praktyce uniemożliwiałyby wprowadzenie jej do zastosowania 15 przemysłowego w przypadku tego typu białka o wysokiej masie cząsteczkowej.

Przykład 4

W wyniku przedstawionego powyżej Przykładu 3 20 poszukiwano optymalnych warunków do przeprowadzania rozmrażania produktu, w celu usunięcia większości nierozpuszczonego i nierozpuszczalnego materiału utworzonego głównie przez agregaty, oraz zminimalizowanie strat jednofazowego fibrynogenu.

Różne partie, poddane obróbce jak w Przykładzie 25 1 aż do roztworu zamrożonego w -70 °C, rozmrożono w kontrolowanych warunkach (temperatura i czas topnienia). Po rozmrożeniu materiału oddzielono nierozpuszczalny materiał. Wspomniany materiał 30 oddzielano przez nylonowe sito o wielkości porów 20 mikronów i w temperaturze, w której zamrożony materiał

ulegał rozmrażaniu. Po oddzieleniu nierozpuszczalnego materiału roztwór ogrzano do 30 °C i filtrowano poprzez filtr 0,45 mikrona (filtr CHVL Millipore).

Określano masę oddzielonego nierozpuszczalnego materiału, jak również stężenie białka (w przybliżeniu, przez pomiar gęstości optycznej przy 280 nm).

Uzyskane wartości przedstawiono w Tabeli 3.

Proces	Temperatur rozmrażania (°C)	Masa nierozpuszczalnego materiału (kg)	OD (280) przed zamrażaniem (AU)	OD (280) po zamrażaniu (AU)	Różnica w OD (AU)	% odzysku białka
1	5-10	2,0	ND	ND	NA	NA
2	30,5	0,1	47,8	46,5	1,3	97,5
3	9 ± 1	1,0	45,2	37,5	7,7	83,0
4	19 ± 1	0,5	39,5	34,3	5,2	86,8
5	7 ± 1	1,9	35,0	24,5	10,5	70,0
6	11 ± 2	0,9	36,0	31,5	4,5	87,5

10 Wyniki przedstawione powyżej wyraźnie wykazują, że ilość utworzonej nierozpuszczalnej pozostałości jest uzależniona od temperatury rozmrażania i odpowiada spadkowi stężenia białka (gęstość optyczna) w filtracji w odniesieniu do wstępnego roztworu przed zamrażaniem.

15 Podobnie, temperatura topnienia wynosząca około 10 °C jest odpowiednia do odzyskania wystarczającej ilości białka i usunięcia nierozpuszczalnego materiału. 0,5 do 1,0 kg nierozpuszczalnego materiału ulega oddzieleniu pomiędzy 9 a 19 °C, przy czym odzyskuje się 83 % do 87

20 % białka. Znaczące jest, że prawie żadnego precypitatu

nie uzyskuje się w 30,5 °C (0,1 kg) i nie wykrywa się odpowiedniej redukcji zawartości białka.

Przykład 5

5 Wpływ różnych warunków rozmrażania z Przykładu 4 na zdolność filtracyjną produktu podczas nanofiltracji pokazano w Tabeli 4.

10 Poddane obróbce partie rozmrożone i przefiltrowane jak wspomniano w Przykładzie 4, rozcieńczono do gęstości optycznej (280 nm) wynoszącej 1,2 do 1,3 AU (w przybliżeniu 0,8 mg fibrynogenu/ml) przy użyciu 2% (wag./obj.) roztworu argininy zawierającego chlorek/cytrynian sodu, w pH 7,0 i temperaturze 30 °C. Nanofiltrację przeprowadzono w 15 dwóch etapach przez filtr 0,1 mikrona (30" CVVL) i 50 nm (2 x 30" DV50) a następnie poprzez filtr 20 nm (3 x 30" DV20), przy ciśnieniu wynoszącym 2,2 do 2,8 bara w każdym etapie.

20 W każdym procesie określano zdolność filtracyjną (g fibrynogenu/m², filtrowany), objętość filtrowaną, odzysk fibrynogenu (przez gęstość optyczną przy 280 nm) i czas filtracji. Wyniki przedstawiono w Tabeli 4.

25

30

Proces	Czas rozmrażania (°C)	Wydajność produkcji (kg roztworu/m ²)	Czas filtracji (godz.)	Szybkość przepływu filtracji (kg roztworu/m ² /godz.)
1	5-10	> 43,8	3,0	14,6
3	9 ± 1	> 56,3	6,5	8,7
4	19 ± 1	> 51,7	8,5	6,1
5	7 ± 1	> 27,1	3,0	9,0
6	11 ± 2	> 32,8	3,8	8,6

Z uzyskanych wartości wynika, że możliwe jest przeprowadzenie nanofiltracji fibrynogenu przez filtr 20 nm na skalę przemysłową. Podobnie, czasy filtracji (lub raczej szybkości przepływu można skorelować z 5 temperaturą rozmrażania materiału wyjściowego z Przykładu 4, co wykazuje, że w praktyce temperatury poniżej 20 °C, korzystnie pomiędzy 7 a 19 °C, będą najbardziej odpowiednie do nanofiltracji poprzez filtr 10 20 nm przy rozsądnej wydajności produkcji i czasie obróbki oraz bez nadmiernych redukcji w ilości produktu z powodu strat podczas rozmrażania.

Stwierdzono zatem, że poprzez wykorzystanie niniejszego wynalazku możliwe jest oczyszczanie 15 roztworów fibrynogenu osoczowego poprzez nanofiltrację z użyciem filtrów o nominalnej wielkości porów mniejszej niż 35 nm w warunkach, które pozwalają na jej przemysłowe zastosowanie do wytwarzania oczyszczonego fibrynogenu jako produktu terapeutycznego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego, wychodzący z roztworu fibrynogenu pochodzącego z uprzednio oczyszczonego ludzkiego osocza, o czystości fibrynogenu wyższej lub równej 80% względem wszystkich białek, znamieny tym, że roztwór stabilizuje się i mrozi a następnie rozmraża się go w temperaturze wynoszącej pomiędzy 5 a 20°C, oddziela się nierozpuszczony materiał i rozcieńcza się roztwór białka oraz przeprowadza się nanofiltrację powstałego roztworu przy użyciu filtrów o wielkości porów mniejszej niż 35 nm.

2. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamieny tym, że mrożenie, rozmrażanie i nanofiltrację przeprowadza się w obecności co najmniej jednego aminokwasu.

3. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 2, znamieny tym, że jako aminokwas stosuje się argininę lub glicynę lub kombinację tych dwóch aminokwasów.

4. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamieny tym, że nierozpuszczony materiał oddziela się po zamrożeniu i rozmrożeniu przez sito.

5. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamieny tym, że nierozpuszczony materiał

oddziela się po zamrożeniu i rozmrożeniu przez dekantację.

5 6. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że nierozpuszczony materiał oddziela się po zamrożeniu i rozmrożeniu przez wirowanie.

10 7. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, nierozpuszczony materiał oddziela się po zamrożeniu i rozmrożeniu przez bezpośrednią filtrację lub z użyciem gradientu filtrów.

15 8. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według jednego z zastrz. 1 do 7, znamienny tym, że nierozpuszczony materiał oddziela się po zamrożeniu i rozmrożeniu poprzez połączenie sposobów określonych w zastrz. 4 do 7.

20 9. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że roztwór powstały po oddzieleniu nierozpuszczonego materiału rozcieńcza się do stężenia fibrynogenu niższego lub równego 1,5 mg/ml.

25 10. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że przed nanofiltracją roztwór doprowadza się do temperatury pomiędzy 18 a 37°C.

30 11. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że przed nanofiltracją

przez filtr o wielkości porów mniejszej niż 35 nm roztwór fibrynogenu poddaje się wstępnej filtracji poprzez filtry o wielkości porów większej lub równej 35 nm.

5 12. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że obszar filtra wymagany do nanofiltracji poprzez filtry o wielkości porów mniejszej niż 35 nm wynosi pomiędzy 10 a 1,000
10 cm² na litr roztworu do filtracji.

13. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 1, znamienny tym, że temperatura rozmrażania wynosi pomiędzy 8 a 13°C.

15 14. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 3, znamienny tym, że stężenie aminokwasu jest wyższe niż 0,1%.

20 15. Sposób usuwania wirusów obecnych w roztworach fibrynogenu do zastosowania terapeutycznego według zastrz. 14, znamienny tym, że stężenie aminokwasu wynosi pomiędzy 0,1 a 8%.

25

Grifols, S.A.

Pełnomocnik: