



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 148 411** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/37, C 07 K 14/755**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96110890/14, 30.09.1994
(24) Дата начала действия патента: 30.09.1994
(30) Приоритет: 04.11.1993 DE P 4337573.1
(46) Дата публикации: 10.05.2000
(56) Ссылки: EP A 0173242, 05.03.86. US A 4774323, 27.09.88. Филатов А.Н., Котовщикова М.А. Свертывающая система крови в клинической практике. - Л., 1963, с.42.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 04.06.1996
(86) Заявка PCT: EP 94/03258 (30.09.1994)
(87) Публикация PCT: WO 95/12609 (11.05.1995)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б.Спасская 25, стр.3, ООО "Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель: Октафарма АГ (CH)
(72) Изобретатель: Странчар Алеш (SI), Штадлер Моника Андреа (AT), Йозич Дьюро (DE)
(73) Патентообладатель: Октафарма АГ (CH)
(74) Патентный поверенный: Лебедева Наталья Георгиевна

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ВИРУСНО-ИНАКТИВИРОВАННОЙ ФРАКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ФАКТОР VIII

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине, в частности к гематологии. Сущность изобретения заключается в том, что описан способ получения вирусно-инактивированной фракции, содержащей фактор VIII с помощью методов хроматографии. В качестве сырья используют криосадок или плазму крови, при необходимости с последующей обработкой гидроксида алюминия, после растворения

криосадока происходит, по крайней мере, одна операция разделения. Другим аспектом изобретения является фракция, содержащая фактор VIII, подлежащая вирусной инактивации и предпочтительно дополнительной пастеризации. Изобретение расширяет арсенал средств для терапии нарушений свертывающей системы крови. 2 с. и 12 з.п. ф-лы.

RU 2 148 411 C1

RU 2 148 411 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 148 411** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/37, C 07 K 14/755**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96110890/14, 30.09.1994
(24) Effective date for property rights: 30.09.1994
(30) Priority: 04.11.1993 DE P 4337573.1
(46) Date of publication: 10.05.2000
(85) Commencement of national phase: 04.06.1996
(86) PCT application:
EP 94/03258 (30.09.1994)
(87) PCT publication:
WO 95/12609 (11.05.1995)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja 25, str.3,
OOO "Gorodisskij i Partnery"

(71) Applicant:
Oktafarma AG (CH)
(72) Inventor: Stranchar Alesh (SI),
Shtadler Monika Andrea (AT), Jozich D'juro (DE)
(73) Proprietor:
Oktafarma AG (CH)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **METHOD OF PREPARING VIRUS-INACTIVATED FACTOR VIII-CONTAINING FRACTION BY CHROMATOGRAPHY METHODS**

(57) **Abstract:**

FIELD: medicine, hematology. SUBSTANCE: method involves the use of cryoprecipitate or blood plasma as raw that can be treated subsequently if necessary with aluminium hydroxide. After cryoprecipitate dissolving at least a single stage of separation is

carried out. Alternative aspect of invention is factor VIII-containing fraction that is subjected for inactivation with virus and additional pasteurization procedure preferably. EFFECT: broadened arsenal of agents used for therapy of coagulating blood system damages. 14 cl

RU 2 148 411 C 1

RU 2 148 411 C 1

Изобретение касается способа получения с помощью хроматографических методов вирусно-инактивированной фракции, содержащей фактор VIII, а также содержащий фактор VIII фракции, которую можно получить по способу согласно изобретению.

Фактор VIII является необходимым для жизни веществом, которое играет важную роль при свертывании крови. Так, например, нарушения свертываемости крови могут лечиться с помощью введения фактора VIII. Поэтому существует большая потребность в применяемых препаратах фактора VIII. Было сделано достаточное количество попыток выделить фактор VIII в сильно насыщенной форме из естественных источников. Так, уже известны хроматографические методы очистки фактора VIII из криосадков, представляющих собой фракцию, которую можно получить с помощью обработки плазмы при пониженных температурах. Европейский патент - EP 367840 B1 - касается хроматографического способа выделения фактора VIII из плазмы крови без предварительного осаждения. При этом фракция, содержащая фактор VIII, отделяется посредством хроматографического разделения гидрофильного хроматографического материала, который модифицирован ионообменными группами. Европейский патент - EP 0238701 - касается способа получения сверхчистого инфекционного антигеофильного фактора, причем предварительно обработанные фракции представляют собой криосадки, которые высвобождаются из фибриногена, глобулина, альбуминов и других мешающих компонентов в процессе осаждения этанолом. В Европейской заявке на выдачу патента N 88108458.6 описывается разделение фракции криосадков с помощью ионообменной хроматографии после инактивации вируса. Европейский патент - EP 0173242 A - описывается способ получения препаратов фактора VIII хроматографическим методом на анионообменных материалах, которые базируются исключительно на углеводах. При этом углеводная матрица модифицирована группами DEAE. Используется, в частности, сефароза DEAE, а также целлюлоза DEAE. В GB-A-1,178,958 описывается очистка фактора VIII с помощью колонн целлюлозы ECTEOLA. Модифицированная целлюлоза содержит основные заменители, введенные посредством реакции эпихлоргидрина и триэтаноламина. Названный уровень техники использует или хроматографическое разделение периодическим способом, или колоночную хроматографию, с помощью этих способов получают довольно хорошие результаты, однако существует необходимость в повышении выхода биологически ценного фактора VIII, исходя как из экономических, так и из этических причин.

Техническая проблема, лежащая в основе изобретения, состоит, таким образом, в том, чтобы представить способ, который создаст возможности, исходя из уровня техники, обеспечить получение фактора VIII с большим выходом и биологической активностью.

Поставленная задача решается посредством способа, при котором, исходя из криосадков или плазмы крови, при необходимости посредством обработки

гидроокисью алюминия, после растворения криосадка осуществляется разделение с помощью мембранной хроматографии.

В способе изобретения возможно использование коммерчески доступного криосадка или плазмы крови. Предпочтительным образом для предварительной концентрации фактора VIII размороженный криосадок обрабатывается гидроокисью алюминия с целью предварительной очистки пробы.

Перед проведением хроматографической очистки материалов, которые размещены в мембранах или на мембранах, проводится вирусная инактивация. Вирусная инактивация осуществляется при этом в соответствии со способом, описанным в Европейском патенте - EP 131740 A1, путем обработки биосовместимыми органическими растворителями (детергентами), Triton X - 100/TNBP, предпочтительно Tween/TNBP (три-н-бутилфосфат). Хорошие результаты достигаются также с помощью холата натрия/TNBP. Предпочтительным образом используются количества детергента до 15 вес. %.

Хроматографическое разделение с целью очистки фактора VIII в пробе может производиться, во-первых, на основных материалах, модифицированных ионообменными группами, в частности анионообменными веществами, или материалах, модифицированных обладающими иммунным средством лигандами. Решающим при этом является тот факт, что названные материалы размещены в мембранах. Предпочтительным образом мембраны состоят из основного материала, как, например, модифицированная целлюлоза или искусственное волокно. В частности, пригодны мембраны, а также компактные диски из пористых полиглицидилметакрилатов и/или из других пористых гидрофильных полимеров с аналогичной структурой, как, например, из гидрофилизированного полистирола.

В первом случае мембрана для разделения состоит из тонких плотноуложенных пленок целлюлозы или искусственных волокон или во втором случае из компактных дисков силикагеля или носителей полимера. Основные материалы мембран или дисков снабжены соответствующими анионообменными группами или обладающими иммунным средством лигандами. В качестве ионообменных групп в расчет принимаются, в частности, анионообменные группы, такие как четвертичные амины или диэтиламиноэтиламиновые группы. В качестве катионообменных веществ в расчет принимаются, в основном, слабо и сильно кислые катионообменные вещества, такие как материалы, которые модифицированы группами сульфоновой кислоты или фосфорной кислоты.

Ионообменные группы могут быть связана с волокном основного материала без так называемого спейсера или с его помощью. Материалы, снабженные спейсером, обозначаются так же, как материалы с чувствительными волокнами. В патенте ФРГ - DE 4204694 - называются соответствующие спейсеры и лиганды. В качестве спейсера может служить, например, также остаток

глюкозамина. Также и с мембранами из пористого полиглицидилметакрилата или из других названных материалов могут быть связаны анионообменные группы, такие как - DEAE или четвертичные амины. Присоединение анионообменных групп осуществляется при этом либо непосредственно к материалу, образующему мембрану, или же через спейсер, например через остаток глюкозамина.

В другой форме выполнения способа по изобретению применяется афинная мембранная хроматография с иммобилизованными веществами, обнаруживающими высокую степень сродства для фактора VIII. В частности, в расчет принимаются моноклональные и/или поликлональные антитела или связывающие фактор VIII фрагменты антител (иммунная афинная мембранная хроматография). Антитела имеют предпочтительным образом человеческое или мышинное происхождение.

Вещества, имеющие сродство в части фактора VIII, иммобилизуются на носителе посредством химически активных групп. Предпочтительным образом активная группа будет воздействовать не непосредственно на материал-носитель, а на конец спейсера. Иммобилизация вещества для фактора VIII осуществляется через связь с активными группами, такими как тозил, трезил, гидразид и другие. Соответствующие способы известны из Т.М. Phillips "Affinity chromatography" в "Chromatography" (E. Heftmann, ed.), 5th ed. Elsevier, Amsterdam 1992.

Антитела могут также предварительно адсорбироваться на мембранах лигандами протеина А или лигандами протеина G. Посредством последующего ковалентного "сшивания" можно предотвратить элюцию антител (выщелачивание колонки). Для "сшивания" антител на мембранах протеина А или протеина G может использоваться способ, аналогичный тому, что используется у несвязанных носителей. Преимущество иммобилизации на протеине А или на протеине G состоит в том, что антитела иммобилизуются исключительно на постоянном сегменте молекулы (Fc). Так, часть (Fab), связывающая антиген, остается свободной и в своем взаимодействии с фактором VIII ничем не ограничена.

В своей другой предпочтительной форме выполнения используются материалы для разделения фактора VIII, которые могут обеспечить гидрофобное взаимодействие. В качестве гидрофобных материалов используются ациклические и/или циклические алкильные цепи, например алкильные цепи C1-C18, а также ароматические вещества. В качестве материалов, обеспечивающих гидрофобное взаимодействие, в расчет принимаются предпочтительным образом также такие материалы, которые обладают фракционированной гидрофобностью. Гидрофобность может быть фракционирована за счет введения полярных, как то полярно-протонных или полярно-апротонных групп, таких как гидроксильные группы, аминогруппы, цианогруппы. Предпочтительным образом это производится с учетом соответствующих условий разделения.

Вирусной инактивации можно достигнуть также при тепловой обработке. При этом

предпочтительным образом после первой мембранной хроматографии элюированная проба, содержащая фактор VIII, подвергается операции пастеризации. Соответствующий способ предлагается в Р 4318435.9. При этом фракции, которые обогащены фактором VIII, в присутствии стабилизаторов приводятся в контакт с ди- или триалкилфосфатами и при необходимости со смачивающими агентами и обрабатываются одновременно или последовательно при повышенной температуре в диапазоне от 55°C до 67°C в течение от 5 часов до 30 часов. Предпочтительным образом можно комбинировать оба метода вирусной инактивации - обработку детергентами и нагревом.

Для удаления использованных в процессе технологической операции пастеризации химикатов можно также провести вторую мембранную хроматографию. Предпочтительным образом отделение добавленных стабилизаторов осуществляется с помощью мембраны, модифицированной DEAE или четвертичными соединениями аммония, которые через спейсер размещаются на поверхности хроматографического материала-носителя. Имеется также возможность размещать соответствующие лиганды на поверхности метариала-носителя без спейсера. Стабилизаторы этим аминокобменным материалом при выбранных условиях не задерживаются, в то время как фактор VIII адсорбируется на материале, используемом при хроматографии.

После этого фактор VIII элюируется системой водных растворителей при увеличивающейся ступенчатообразно концентрации соли.

Полученная таким образом фракция, содержащая фактор VIII, при использовании условных методов в концентрированном виде расфасовывается и при необходимости лиофилизуется.

Предпочтительным образом фактор VIII выводится из раствора с незначительной ионной силой в процессе первого мембранного хроматографического разделения. Предпочтительным образом водная система имеет ионную силу, которая соответствует от 0 до 150 mM раствора хлорида натрия. При этих ионных силах фактор VIII еще адсорбируется на хроматографическом материале, между тем как плохо связывающиеся примеси могут вымываться водными системами той же ионной силы.

Эта очистка адсорбированного материала в другой форме выполнения способа по изобретению может происходить с помощью водной системы, имеющей ионную силу, соответствующую 200 - 400 mM раствора хлорида натрия. Десорбция фактора VIII и элюция этой фракции происходит затем с помощью водной системы, имеющей ионную силу, соответствующую 500 - 1500 mM раствора хлорида натрия. Значение pH удерживается при этом в диапазоне от 4 до 9. Если проводится катионообменная хроматография, то она происходит предпочтительным образом при значении pH < 6, между тем как хроматография с помощью анионообменных веществ проводится скорее при более

высоких значениях pH - более 6.

Если проводится очистка фактора VIII с помощью иммуноафинной мембранной хроматографии, то в отличие от названного выше метода, проводимого с помощью анионообменных материалов, элюция проводится с помощью хаотропных реактивов или высококонцентрированных солевых растворов. Элюция проводится предпочтительным образом с помощью таких концентраций хаотропных реактивов или солей, которые являются достаточными для того, чтобы разорвать связь между веществом, имеющим высокую степень сродства для фактора VIII, и самим фактором VIII. Концентрация названных веществ в соответствующих элюционных системах зависит при этом от силы сродства фактора VIII и соответствующего связывающего компонента. Предпочтительным образом в качестве иммуноафинных лигандов используются антитела с не слишком высоким сродством. В результате может происходить элюция водными растворами с незначительной денатурирующей способностью. Для элюции фактора VIII с иммуноафинной мембраны предпочтительным образом используются водные растворы с концентрацией от 1 до 6 М мочевины, в частности от 2 до 4 М мочевины, или соответствующим образом высококонцентрированные солевые растворы.

В случае гидрофобной взаимодействующей хроматографии проба вносится в водный раствор очень высокой ионной силы, как, например, высококонцентрированный сульфат аммония (имеющий концентрацию до 4 М) или хлорида натрия (имеющий концентрацию до 5 М). Элюция осуществляется, в частности, этапами или непрерывно с помощью солевых растворов, имеющих малую ионную силу. В качестве растворов с низкой ионной силой для элюции проб в случае гидрофобной взаимодействующей мембранной хроматографии может использоваться также водный раствор с органическими растворителями, в частности разбавленный спиртовой раствор.

Способ по изобретению обеспечивает быструю и несложную очистку фактора VIII, который выпадает в осадок, имея одновременно высокую степень чистоты и высокую степень выхода. Кроме того, удельная активность полученного таким образом фактора VIII достаточно высока, что объясняется незначительной денатурализацией активного фактора посредством способа по изобретению. Таким образом, предметом изобретения является также получаемая в результате способа по изобретению фракция фактора VIII.

Формула изобретения:

1. Способ получения вирусно-инактивированной фракции, содержащей фактор VIII, в котором плазму крови или криоосадок после его растворения посредством обработки ди- или триалкилфосфатом, при необходимости очищенные гидроокисью алюминия, подвергают воздействию неионного поверхностно-активного вещества для вирусной инактивации, после чего проводят по крайней мере одну операцию разделения с

помощью мембранной хроматографии, исключая афинные мембранные системы, состоящие из полых волокон.

2. Способ по п.1, в котором названная операция разделения происходит на размещенном в мембране или на ней ионообменном материале, в частности на анионообменном материале.

3. Способ по п.1 и/или 2, в котором вирусная инактивация осуществляется через технологическую операцию пастеризации, при необходимости за ней следует дополнительная операция разделения с помощью мембранной хроматографии.

4. Способ по любому из пп.1 - 3, в котором мембранная хроматография осуществляется на материале, который обладает высокой степенью сродства к фактору VIII.

5. Способ по любому из пп.1 - 4, в котором материал, обладающий высокой степенью сродства к фактору VIII, модифицирован лигандами с высокими и/или низкими молекулярными весами.

6. Способ по п.5, в котором названный материал модифицирован антителами, ориентированными против фактора VIII.

7. Способ по любому из пп.4 - 6, в котором названный модифицированный материал, имеющий высокую степень сродства к фактору VIII, имеет иммобилизованные лиганды с высоким сродством к фактору VIII.

8. Способ по любому из пп.1 - 7, в котором хроматографический материал позволяет осуществлять гидрофобное взаимодействие с отделяемым фактором VIII или же имеет соответствующие лиганды, которые передают гидрофобное взаимодействие.

9. Способ по пп.1 - 5 и/или 7, в котором очищаемую пробу в водной системе наносят на ионообменный материал и проводят элюцию в градиенте возрастающей ионной силы с помощью раствора хлористого натрия в концентрации от 0 до 1500 мм, затем в водной среде с повышенной ионной силой с помощью раствора хлористого натрия от 200 до 400 мм, затем в водной среде еще более высокой ионной силы с помощью раствора хлористого натрия в концентрации от 500 до 1500 мм, при pH 4 - 9.

10. Способ по любому из пп.1, 3 - 8, в котором очищаемую пробу наносят из раствора, позволяющего связывать фактор VIII за счет антител к фактору VIII, на афинную мембрану с адсорбированным на ней фактором VIII, затем промывают тропными реагентами в соответствующей концентрации, например мочевиной, в концентрации 1 - 6 М или элюируют солевым раствором повышенной концентрации.

11. Способ по любому из пп.1, 3 - 8, в котором очищаемую пробу наносят из раствора очень высокой ионной силы на мембрану, которая имеет на своей поверхности гидрофобные лиганды и элюируется системами растворителей малой ионной силы.

12. Способ по любому из пп.1 - 11, в котором элюированная фракция, содержащая фактор VIII, концентрируется, расфасовывается и/или лиофилизуется.

13. Способ по любому из пп.1 - 12, в котором вирусная инактивация

осуществляется путем обработки детергентом в количестве до 15 вес.%

14. Фракция, содержащая фактор VIII,

получаемая путем применения способа, по любому из пп.1 - 13.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-6-

RU 2148411 C1

RU 2148411 C1