

(19)



(10) **LT 3175 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3175**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 3/20,
A61K 35/14**

(21) Paraiškos numeris: **IP266**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 07 15**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 02 27**

(72) Išradėjas:

**Miryana Burnouf, FR
Thierry Burnouf, FR**

(73) Patent savininkas:

**Centre Regional de Transfusion Sanguine de Lille, 19-21 rue Camille Guerin, F-59000
Lille, FR**

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J.Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

**Standartizavoto žmogaus von Willebrand'o faktoriaus koncentrato gavimo būdas ir šiuo
būdu gautas koncentratas**

(57) Referatas:

Išradimas apima žmogaus von Willebrand'o faktoriaus, išskirto iš krioprecipituotos plazmos frakcijos, valymo būdą.

Būdas susideda iš trijų chromatografinių atskyrimo stadijų derinimo. Gautas koncentratas turi labai aukštą specifinį aktyvumą ir didelį procentinį kiekį didelės molekulinės masės multimerų.

Koncentratas skirtas, ypač, terapiniam naudojimui.

Išradimas liečia labai aukšto švarumo laipsnio standartizuoto žmogaus von Willebrand'o faktoriaus koncentrato, turinčio specifinį aktyvumą, didelį kiekį aukšto molekulinio svorio multimerų ir skirtą terapiniam naudojimui, pramoninį gavimo būdą.

Von Willebrand'o faktoriaus (vWF) yra didžiausia žinoma molekulė, cirkuliuojanti plazmoje. Ji sudaro multimerų eilės, sujungtos disulfidiniais ryšiais; bazinė subvieneto molekulinė masė yra apytiksliai 260 kilodaltonų (KDa). Mažiausia plazmoje egzistuojanti vWF forma yra apytiksliai 440-500 KDa dimeras; didžiausios formos - dimerų multimerai, kurių molekulinė masė siekia 20 milijonų daltonų. Sujungtu subvienetu lokalizavimosi vieta gali būti specifinės ląstelės, sintetinančios ir polimerinančios vWF megakariocituose ir endotelio ląstelėse.

Šis faktorius atlieka pagrindinį vaidmenį hemostazėje, vykdydamas skirtingas funkcijas; jis transportuoja ir stabilizuoja VIII faktorių kraujo srovėje ir, kaip rišas baltymas, jis užtikrina kraujo trombocitų išplitimą, pririšimą ir susikaupimą ant kraujagyslių subendotelijaus, taip prisidedant prie greito sužeistų kraujagyslių užgijimo.

Ilgintas vWF nepakankamumas arba šio faktoriaus struktūrinė anomalija sukelia von Willebrand'o ligą, kuri iš pradžių pasireiškia ypač odos ir gleivinės membranų kraujavimu. Šios ligos klinikinės formos yra labai įvairios ir sukelia daug problemų chirurginės intervencijos atveju. Von Willebrand'o ligos gydymas reikalauja pirminės hemostazės (kraujavimo laikas) ir koaguliacijos (aktyvuoto cefalino laikas ir VIII faktoriaus aktyvumas) anomalijų korekcijos.

Ši liga gydoma pakaitų terapija, naudojant žmogaus plazmos darinius, praturtintus vWF (pav., plazmos krioprecipituotą frakciją ar VIII faktoriaus koncentratą, turinčius pakankamą vWF kiekį). Vienok, 5 šie produktai nėra standartizuoti von Willebrand'o ligos gydymui. Be to, nepakankamai valytos kraujo plazmos frakcijos, ypač krioprecipitatas, turi virusinio užkrėtimo galimybę, kadangi dažnai jos nėra efektyviai inaktyvuotos virusų atžvilgiu. Dar daugiau, 10 jos turi užteršiančiųjų baltymų, kurie nereikalingi pacientams ir kurie po daugkartinių injekcijų sąlygoja imunines reakcijas.

Priešingai, valytas VIII faktorius gali būti efektyviai 15 apdorotas virusų atžvilgiu, vienok jo valymo procesas buvo optimizuotas hemofilijos A, o ne vWF nepakankamumo gydymui. Iš tikrųjų, neseniai surasti ir vis labiau efektyvūs būdai, kaip imunoafininiai ir jonų mainų valymo būdai, naudojami VIII faktoriaus gavimui, 20 leidžia gauti koncentratą, kuriuose pakanka vWF kiekio, kad efektyviai gydytų von Willebrand'o ligą.

Būtent tam, kad efektyviai gydyti von Willebrand'o ligą, pareiškėjas sukūrė naują pramoninį vWF valymo 25 būdą, kuris ypač efektyvus, atskiriant įvairias plazmos molekules. Jo pagalba per vieną stadiją galima gauti VIII faktoriaus koncentratą (pagal būdą, aprašytą Europos patento paraiškoje Nr. 0 359 593) ir išskirti vWF frakciją iš tos pačios krioprecipitato partijos, 30 tai leidžia rentabiliai panaudoti žmogaus plazmą. Tokiu būdu gauta vWF frakcija yra valoma dviejų papildomų chromatografinių stadijų pagalba, tai leidžia gauti labai švarų vWF koncentratą.

35 vWF molekulės kompleksiskumas sąlygoja labai sunkų jo valymą. Metodai, apimantys nedideles apimtis, pav., 5-2000 ml, ir naudojami analitiniams tikslams, jau buvo

aprašyti (Thorell ir kt., Thromb. Res. 1984, 35: 431-450), bet jie negali būti pritaikomi pramoniniu būdu gaminant vWF. Be to, krioprecipitato maksimalaus rentabilumo idėja, gaunant vienu metu vWF ir FVIII, nebuvo svarstyta.

vWF buvo valomas, atsižvelgiant į skirtingus sulfatuotų junginių tirpumus, esant glicinui (Berntrop ir kt., Vox Sang. 1989, 56: 212), į sulfotuotus junginius (Winkelman ir kt., Vox Sang. 1989, 57: 97) bei naudojant įvairius chromatografinius atskyrimo metodus, kaip, pav., molekulinio sieto (Perret ir kt., Haemostas 1984, 14: 2890 ir jonų mainų metodus (Austen ir kt., Thromb. Haemostas, 1982, 48: 295). Tačiau šie metodai duoda arba nedideles vWF išeigas, arba turi žemą gelio imlumą, arba neužtikrina vienalaikio FVIII ir vWF atskyrimo, kas daro juos mažiau tinkamais pramoniniam naudojimui.

Be to, Berntorp ir kt. (Vox Sang. 1989, 56: 212) gauna nedidelio švarumo laipsnio vWF: 45 V Ag/mg baltymo (p.213), kai tuo tarpu pareiškėjas gauna 205 V Ag/mg baltymo. Panašiai, Winkelman ir kt. (Vox Sang. 1989, 57: 97) gauna 10 V Ag/ml baltymo (p.101).

Perret ir kt. (Haemostasis 1984, 14: 289) atlieka defibrinacijos stadiją, pašalinant fibrinogeną fibrino molekulių pavidale, naudojant kalci tokiu pat būdu, kaip gyvatės nuodų fermentus. Tai daro gavimą akivaizdžiai netinkamu terapiniams tikslams. Be to, gelfiltracijos sistemos, kaip jos naudojamos, yra sunkiai suderinamos su pramoniniais mastais, užtikrinančiais tik 10cm/val. ar mažesni tekėjimo greitį ir turinčiais didelę užsikimšimo riziką, ypač esant fibrinogenui ir fibronektinui. Be to, išvalymo laipsnis dažniausiai yra žemas, kas priklauso nuo menko frakcionavimo šioje chromatografinėje sistemoje.

Austen ir kt. (Thromb. Haemostas. 1982, 48: 46) taip pat gavo žemo švarumo laipsnio koncentratą (8 V Ag/mg baltymo) ir santykinai žemą išeią, tikriausiai sąlygojamą griežtų chromatografijos sąlygų (pH 5.5).

5

Harrisson ir kt. (Thromb. Res. 1988, 50:295) naudoja dekstrano sulfat-sefarozę kaip chromatografinę matricą; ši medžiaga turi nedidelį užlaikymo talpumą vWF atžvilgiu ir taip pat gaunamas vWF preparatas turi žemą specifinį aktyvumą: 2-4 V/mg baltymo (p.301).

10

Pagaliau šie produktai turi pakankamai didelę dalį vWF denatūruotų ir inaktyvių formų, ką liudija ristocetino kofaktoriaus aktyvumo (RCo)/antigeno santykis, svyruojantis nuo 0.008 iki 0.8 (Lawrie ir kt., Br.J.Haemotol. 1989, 73: 100). Tai sumažina jų efektyvumą, naudojant Willebrand ligos terapijai. Priešingai, pareiškiamas būdas užtikrina vWF atstatymą su RCo/antigeno santykiu, aukštesniu už vieneta, tai prilygsta normalios kraujo plazmos natyvinio vWF rodikliui.

15

20

Šis išradimas liečia vWF koncentrato, skirto terapijai, gavimo pramoninį būdą, gaunant jį kaip pašalinį produktą gerai išvalyto FVIII gavimo metu; kai galima gaminti standartizuotas partijas, charakterizuojamas dideliu kiekiu aukšto molekulinio svorio multimerais, iš labai didelių plazmos kiekių (4000 ir daugiau ltr). Būdas leidžia optimaliai panaudoti krioprecipitata.

25

30

Konkrečiai šis išradimas liečia vWF koncentrato gavimo būdą, kuris susideda iš trijų sekančių viena paskui kitą chromatografinių stadijų, leidžiančių vWF praturtinti aukšto molekulinio svorio multimerais, kurie sąlygoja jo biogeninį aktyvumą. Pradinė medžiaga yra žmogaus plazmos krioprecipituota frakcija, prieš tai apdorota įprastinėje valymo stadijoje, apimančioje absorbciją ant aliuminio oksido. Po to ši medžiaga

35

prieš jos valymą inaktyvuojama virusų atžvilgiu, pav., naudojant tirpikli-detergentą.

Valymo būdas pagal šį išradimą susideda šių trijų sekančių viena paskui kitą chromatografinių stadijų kombinacijos, naudojamos gaunant vWF kaip pašalinį produktą FVIII. gavimo procese; pirmos dvi stadijos apima jonų mainų chromatografiją, o trečioji - afininę chromatografiją.

Atliekamos dvi jonų mainų chromatografijos, naudojant tą pačią vinil-polimerinę dervą, ant kurios fiksuotos dietilaminoetilo grupės (DEAE), ypač ant DEAE-Fractogel^R TSK 650 (Merck) kolonėlių, nulygsvarinant buferiu, turinčiu 0.01 M trinatricio citrato, 0.11 M natrio chlorido, 0.001 kalcio chlorido, 0.12 M glicino ir 0.016 M lizino, pH 7.

DEAE-Fractogel^R TSK 650 yra sintetinis hidrofilinis gelis. Nešėjas yra oligoetilenglikolio, glicidinmetakrilato ir pentaeritritoldimet-akrilato kopolimeras, prie kurio yra prijungtos dietilaminoetilo grupės, t.y. $-O-CH_2-CH_2N+(C_2H_5)_2HCl$, kas sąlygoja silpnai šarminį anijojimą. DEAE-Fractogel^R TSK 650 būna dviejų rūšių pagal dalelių dydžius (kada brinkinama vandenyje): tipo S (0.025-0.050 mm) ir tipo M (0.045-0.090 mm). Šiame išradime yra naudojami abu tipai.

Krioprecipituotos plazmos frakcija, prieš tai valyta ir inaktyvuota virusų atžvilgiu panaudojant įprastinius būdus, buvo panaudota pirmoje chromatografinėje kolonėlėje, kuri užlaiko didelę dalį vWF. Tada vWF buvo eliuojamas, didinant natrio chlorido koncentraciją buferyje iki 0.14-0.15 M.

Po to eliuota frakcija, praturtinta vWF, yra naudojama antroje chromatografinėje kolonėlėje, esant tokioms pat

- sąlygoms, kaip pirma. Kadangi frakcija, užnešta ant antros kolonėlės, yra laisva nuo daugelio baltymų (ypač nuo FVIII, ir fibronektino), kurie konkuravo dėl absorbcinių centrų pirmos chromatografinės stadijos metu, tai antrojoje kolonėlėje absorbcinis imlumas vWF atžvilgiu yra žymiai didesnis. Po filtrato pašalinimo ir kolonėlės praplovimo nulygsvarinimo buferiu adsorbuotas vWF eliuojamas, padidinant buferio natrio chlorido koncentraciją iki 0.15-0.17 M. Dėl aukštos DEADE-Fractogel^R dervos adsorbcinio imlumo ir efektyvumo vWF atžvilgiu, vWF gali būti eliuojamas iš kolonėlės su aukštu aktyvumu (>150 μ RCo/ml), taip galima išvengti ultrafiltracijos mechaninio slėgio, koncentruojant produktą.
- Tokiu būdu eliuota frakcija yra naudojama afininės chromatografijos stadijoje (ant gelio su želatinos pagrindu) imant tą patį nulygsvarinimo buferį, kas leidžia išvengti dializės ar ultrafiltracijos stadijos, pašalinant druskas; ši kolonėlė sulaiko liekamojo fibronektino molekules, kurios dar teršia vWF. Gelio, asocijuoto su želatina, pasirinkimas nėra ribojamas: šiam tikslui tinkami yra Gelatin-Sepharose, Gelatin-Utrogel^R, Gelatin-Spherox^R bei Gelatin-Fractogel^R. Gelatin-Sepharose gali būti geriausias pasirinkimas, kadangi fiksuoja 5-10 mg fibronektino/ml gelio sąlygomis, taikomomis šiame išradime.
- Šiose sąlygose labai gerai valytas vWF nesusiriša su geliu ir pereina į filtratą; kadangi chromatografinė stadija, naudojant želatiną, nesąlygoja didelio vWF frakcijos praskiedimo, produktas gali būti tiesiogiai paskirstomas, nenaudojant koncentravimo stadijos, pav., ultrafiltracijos. Kadangi galutinis produktas neturi proteolitinių fermentų, jis labai stabilus filtruojant ir liofilinant bei nereikalauja stabilizuojančių agentų.

vWF koncentratas, gautas šio išradimo būdu, turi išskirtinai aukštą valymo laipsnį - >10,000 kartų, lyginant su pradine plazma; jo specifinis aktyvumas yra 345 V CBA/mg baltymo (kolageno surišimo aktyvumo vienetais) ir > 100 V RCo/mg baltymo, (ristocetino kofaktoriaus aktyvumo vienetais). Kiekvienos chromatografinės stadijos įnašas, valant vWF, parodytas 1 fig.

Produkto kokybės gerėjimas sekančiu viena paskui kitą stadijų metu žymiai priklauso nuo aukšto molekulinio svorio multimerų kiekio (vWF molekulinės formos, turinčios aukštą biologinį aktyvumą), tai buvo stebima elektroforetinių tyrimų metu.

Idomu, jog šie tyrimai parodo didėjanti praturtinimą multimerais ≥ 4 (2 fig.), kurie atstovauja 79% vWF polimerų, tuo tarpu krioprecipitacija pusę iš jų pašalina. Netikėtai pasirodė, jog būtent chromatografija ant DEAE-Fractogel TSK 650 padeda selektyviai užlaikyti labai didelius multimerus ir pašalina su filtratu nedidelias formas, anomalios struktūros (patyrusias dalinę proteolizę) ir žemo aktyvumo formas.

Standartizuotas vWF koncentratas, pasižymintis aukštu išvalymo laipsniu, aukštu specifiniu aktyvumu ir dideliu kieku aukšto molekulinio svorio multimerų, gautas šio išradimo būdu, yra ypač gerai tinkamas įvairių von Willebrand ligos formos terapijoje, tai patvirtino preliminariniai klinikiniai tyrimai.

Preliminariniai klinikiniai tyrimai parodė, jog šis koncentratas efektyviai sutrumpina kraujavimo laiką, esant kraujoplūdžiui.

Tyrimai in vitro patvirtino, jog biocheminės ir fiziologinės savybės yra identiškos natyvių molekulių savybėms, ypačingai savo sugebėjimo surišti kraujo trombocitus perfuzijos aparate ir savo sugebėjimu surišti in vivo endogeninį VIII faktorių.

Dėl savo aukšto valymo laipsnio vWF, gautas šio išradimo būdu, taip pat gali būti naudojamas įvairiems laboratoriniams tikslams (smulki struktūrinė analizė, funkcionalumo tyrimai, diagnozė ir t.t.) ir specifinių antikūnų gamyboje.

Koncentratas pagal šį išradimą taip pat gali būti naudojamas kaip stabilizatorius, gaunant VIII faktorių ląstelių, transformuotų genuose inžinerijos metodų pagalba, ir stabilizuojant VIII faktorių valymo metu.

Sekantis pavyzdys iliustruoja vieną išradimo įgyvendinimo formą, neapribojant jo apimties.

PAVYZDYS:

Pradinė medžiaga

Krioprecipitatas yra paruoštas iš šviežios plazmos, surinktos esant natrio citratui (4%) ar antikoaguliantiniam tirpalui CPD (citratas, fosfatas, dekstroze) ir užšaldytos ne vėliau kaip praėjus 6 valandoms po jos surinkimo. Plazma užšaldoma prie -60°C , po to laikoma prie -35°C . Plazmos partijas sudaro 1800-2000 l, kurios yra sujungiamos į 4000 l partijas kiekvienam proceso taikymui. Atšildant, plazma apie 12 val. patalpinama į kamerą su reguliuojama temperatūra, kur užtikrinamas lėtas reguliarus atšildymas iki -7°C , tada atitirpinama termostatiškai reguliuojamame inde iki $0 - 2^{\circ}\text{C}$, pastoviai maišant. Po to krioprecipitatas

(kuris sudaro apytikriai 9 g/l plazmos) yra surenkamas centrifuguojant žemoje temperatūroje.

5 Nucentrifugavus, surinktas krioprecipitatas yra resoliubilizuojamas ir adsorbuojamas ant aliuminio hidroksido kai kurių teršalų pašalinimui, pav., protrombino kompleksų komponentų (ypač VIII faktoriaus) ir XII faktoriaus pašalinimui. Supernatantas po to yra atvėsintas iki 15° C (tas dalinai pašalina fibrinogeną
10 ir fibronektiną).

Šis apdorojimas leidžia gauti iš krioprecipitato 80-86% VIII faktoriaus/vWF mišinio; VIII faktoriaus specifinis aktyvumas yra 0.7 TV/mg, o vWF specifinis aktyvumas yra
15 0.6 RCo/mg (ristocetino kofaktoriaus aktyvumas) ir 1.2 V CBA/mg (kolageno surišimo aktyvumas).

Virusinė inaktyvacija

20 Tirpalas, turintis VIIIF/vWF mišinį, yra apdorojamas tirpikliu-detergentu, žinomu savo efektyvumu, ardant virusus su lipidų apvalkalėliais (Horowitz ir kt., Transfusion, 1985, 25; 516); apdorojama inkubuojant 8 val. esant 25° c ir 0.3% trin-n-butilfosfatui (TnBP)
25 bei 1% Tween 80.

Po šio apdorojimo randama, kad išlieka 95% VIII faktoriaus ir vWF aktyvumo, išmatuoto ankstesnėje stadijoje. Elektroforezė gali patvirtinti, jog vWF vis
30 dar yra multimerinėje formoje.

Chromatografinis aktyvumas

vWF valymas yra kilęs iš VIII faktoriaus valymo būdo, pareiškėjo aprašytoje paraiškoje Europos patentui Nr.EP
35 0 359 593.

Pirmoji chromatografijos stadija atliekama DEAE-Fractogel^R TSK 650 (Type S arba M) (Merck) užkrautoje kolonėlėje. Nulygsvarinimo buferį sudaro trinatrio citratas (0.01 M), kalcio chloridas (0.001 M), glicinas (0.12 M), L-lizinas (0.016 M) ir 0.11 M natrio chloridas. vWF, VIII faktorius ir fibronektinas yra užlaikomi kolonėlėje; užteršiantieji baltymai (pagrindiniai fibrinogenas ir šiek tiek IgG) silpnai surišami ar nesurیشami kolonėlėje, o virusus sterilizuojantys agentai yra pašalinami, keletą kartų nuosekliai tuo pačiu buferio tirpalu.

Liniijinis srovės greitis kolonėlėje yra 100 cm/val. Esant šioms sąlygoms, vWF užlaikymo imlumas kolonėlėje apytiksliai 75% nuo užnešto kiekio (matuojant kaip Ag, antigeną), o likutis pereina į filtratą. Šis surišimo imlumas atitinka 45 V vWF Ag/ml gelio.

Nuo kolonėlės vWF desorbuojamas, padidinus NaCl koncentraciją, buferio tirpale iki 0.15 M. Surinkta vWF frakcija turi 30-35% pradinio vWF kiekio, tuo tarp jo 40% pasilieka adsorbuotų kartu su VIII faktoriumi; jie gali būti kartu eliuoti, padidinus NaCl koncentraciją buferio tirpale iki 0.25 M, o po to kartu išvalyti.

Frakcija, turinti šios pirmos kolonėlės eliuotą vWF, yra užnešama ant antros identiшkos kolonėlės, nežymiai praskiedus nulygsvarinimo buferiu, turint tikslą nustatyti vWF frakcijos joninę jėgą, ekvivalentiška 0.11 M natrio chlorido joninei jėgai.

Kadangi teršalai ir VIII faktorius, kurie kartu su vWF varžosi dėl adsorbcijos centrų pirmoje kolonėlėje, yra beveik pašalinti pirmoje chromatografijos stadijoje, antroje kolonėlėje surišimo imlumas yra žymiai didesnis: 320 V vWF Ag/mg gelio.

vWF yra desorbuojamas, padidinus buferio tirpalo NaCl koncentraciją iki 0.17 M.

5 Ši antroji chromatografijos stadija leidžia sukonzentruoti vWF 8-10 kartų, lyginant su pirma stadija, tai atmeta būtinumą papildomai koncentruoti, pav., ultrafiltracijos pagalba. Naudojant standartinius metodus, eliuate randami sekantys vWF kiekiai bei aktyvumai:

10

- Antigenas (Ag)	88 ± 9 TV/ml
- Ristocetino kofaktorius (RCo)	97 ± 19 TV/ml
- Kolageno surišimo aktyvumas (CBA)	149 ± 13 TV/ml
- Didelės molekulinės masės multimerai (≥ 4 multimerai)	79%

15 CBA vienetai (kolageno surišimo aktyvumas) yra nustatomi ELISA metodu, kaip aprašyta Brown ir Bosak (Throm. Res. 1986, 43: 303). Standartinė plazma, kalibruota pagal 2-ą Britų Standartą (86/717), buvo naudojama kaip pagrindas išreiškiant reikšmes tarptautiniais vienetais.

20 Santykis CBA/Ag, lygus 1.69, rodo, jod vWF aktyvumas yra gerai išsilaikęs. Tai suderinama su aukštu procentiniu kiekiu didelės molekulinės masės multimeru (79%) ir palyginama su natyvinio vWF iš plazmos tokiu pat rodikliu (70%).

25 Šio vWF eliuato elektroforetiniai tyrimai rodo nežymų užteršimą fibronektinu ir inter-alfa tripsino inhibitoriumi, serin-proteazės inhibitoriumi.

30 Fibronektinui pašalinti antras vWF eliuatas yra pateikiamas trečiai valymo stadijai, atliekamai kolonėlėje su želatin-sefaroze CL4B (Pharmacia), nulygsvarintoje tuo pačiu buferiu ankstesnėje kolonėlėje.

Afininės chromatografijos gelio užlaikymo imlumas fibronektino atžvilgiu yra > 5 mg/ml, tai leidžia šio teršalo kiekį sumažinti iki nedetektuojamų kiekių (< 4 mg/ltr) vWF frakcijoje.

5

Pagal šį išradimą valytas vWF randasi šios paskutinės stadijos filtrate ir gali būti tuoju pat išskirstomas ir liofilinamas.

10

Galutinio produkto elektroforetiniai tyrimai neparodo jokių teršalų. vWF kiekis yra 205 V Ag/ml baltymo; jo specifinis aktyvumas yra 345 V CBA/mg baltymo ir 186-220 V RCo/mg baltymo.

15

Bendras išvalymo laipsnis lyginant su pradine plazma yra $> 10,000$ kartų.

20

Elektroforetiniai tyrimai (SDS-agarozė ir juostų išskleidimas) rodo, jog šiuo būdu išvalytas vWF susideda iš 65-80% didelės molekulinės masės multimerų, t.y., kiekio, palyginamo su natyviu vWF atitinkančiu šių multimerų kiekiu, lygiu 70%.

25

Koncentrato stabilumas buvo tiriamas skystame būvyje, jį laikant 24 valandas kambario temperatūroje: neužfiksuotas nei proteolitinis aktyvumas, nei specifinio aktyvumo pakeitimas.

30

Trombogeninio aktyvumo nebuvimas koncentrate buvo patvirtintas, naudojant įprastinius testus, kaip, pav., neaktyvuoto dalinio tromboplastino laikas (NAPTT). Trombinas, PKA ir kalikreinas nerasti.

35

Todėl nebūtina pridėti stabilizuojančių agentų į galutinį vWF produktą.

Valymo būdo, specialiai skirto vWF išskyrimui, kaip pašalinio produkto gaminant VIII faktorių, sukūrimas pirmą kartą įgalina gauti labai švarų ir labai efektyvų terapinį koncentratą, standartizuotą von Willebrand'o ligos gydymui.

FIGŪRŲ PAAIŠKINIMAI

Fig.1. SDS-PAGE vWF valymo frakcijos. 1 juosta: krioprecipitatas; 2 juosta: SD paveiktas krioprecipitatas; 3 juosta: nesurišta DEAE-fractogel frakcija; 4 juosta: 1-as vWF eliuatas; 5 juosta: 2-as vWF eliuatas; 6 juosta: nesurišta želatinos frakcija; 7 juosta: standartai. Fbn. = fibronektinas; IgG + Imunoglobulinas; Alb = albuminas.

Fig.2. Multimerų pasiskirstymas vWF valymo frakcijose. 1 juosta: normali plazma; 2 juosta: krioprecipitatas; 3 juosta: SD paveiktas krioprecipitatas; 4 juosta: nesurišta DEAE-Fractogel frakcija; 5 juosta: 1-as vWF eliuatas; 6 juosta: 2-as vWF eliuatas; 7 juosta: nesurišta želatinos frakcija.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas gauti standartizuotą, labai gerai išvalytą žmogaus von Willebrand'o faktoriaus koncentratą, praturtintą didelio molekulinio svorio multimerais, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad koncentratą gamina iš krioprecipituotos plazmos frakcijos, taikant trijų, viena paskui kitą sekančių chromatografijos stadijų serijas, kurių pirmos dvi stadijos yra jonų mainų chromatografija, naudojant stambiai porėtas polimerines dervas su prijungtomis dietilamino etilo grupėmis, o trečioji stadija yra afininė chromatografija ant želatin-sefarozės.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pradinė medžiaga yra krioprecipituota plazmos frakcija, prieš tai išvalyta ant aliuminio hidroksido.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmoji ir antroji jonų mainų derva yra DEAE-Fractogel^R TSK 650, nulygsvarinta buferio tirpalu, turinčiu 0,01 M trinatricitrato, 0,11 M natrio chlorido, 0,001 M kalcio chlorido, 0,12 M glicino ir 0,016 M L-lizino.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prieš tai išvalytą krioprecipituotą plazmos frakciją užneša ant pirmos jonų mainų chromatografijos kolonėlės, ir pirmąją von Willebrand'o faktorių turinčią frakciją eliuoja, padidinus buferio natrio chlorido koncentraciją iki 0.14-0.15 M.

5. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad po pirmos chromatografijos gautą von Willebrand'o faktorių turintį eliuatą užneša ant antros jonų mainų chromatografijos kolonėlės, ir von

Willebrand'o faktorių eliuoja, padidinus buferio natrio chlorido koncentraciją iki 0.15-0.17 M.

5 6. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad po antros chromatografijos eliuatą užneša ant želatin-sefarožės chromatografijos kolonėlės, nulygsvarintos eliuacijos buferiu iš ankstesnės chromatografinės stadijos, siekiant selektyviai adsorbuoti kolonėlėje liekamąjį fibronektiną.

10

7. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad esantį želatin-sefarožės kolonėlės filtrate von Willebrand'o faktorių surenka, išskirsto ir liofilina.

15

8. Labai gerai išvalytas ir aukšto specifinio aktyvumo (RCo ir CBa vienetais) bei daug didelio molekulinio svorio multimerų turintis von Willebrand'o faktoriaus koncentratas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis gautas pagal vieną iš 1-7 punktų.

20

9. Von Willebrand'o faktoriaus koncentratas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aktyvumo (matuoto CBa vienetais) santykis su antigeno kiekiu yra mažiausiai 1.5.

25

10. Von Willebrand'o faktoriaus koncentratas pagal 8 arba 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad didelio molekulinio svorio multimerų kiekis yra mažiausiai 65-80%.

30

LT 3175 B

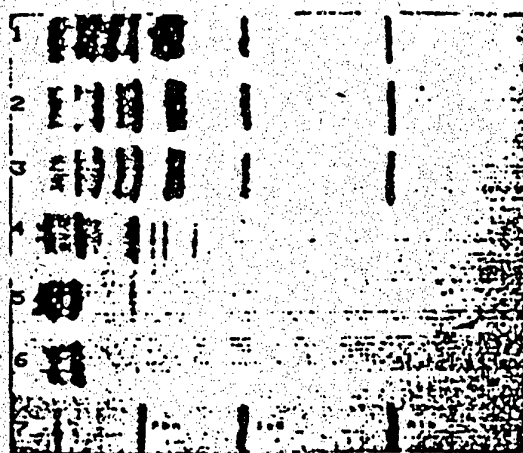


FIG. I

LT 3175 B

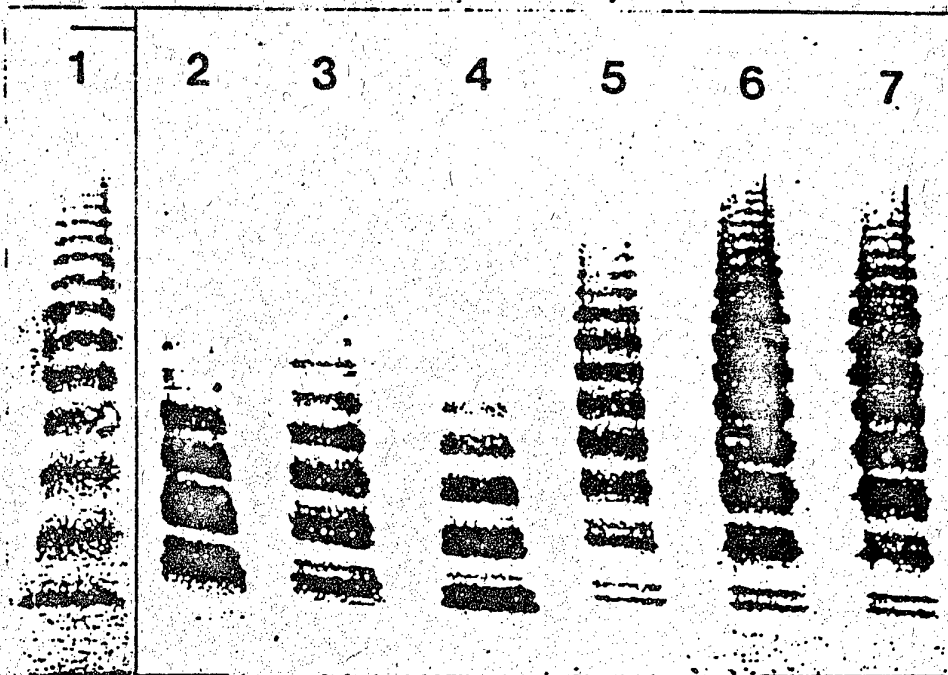


FIG. 2