

(11) Patent numeris: **3333**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 35/16**

(21) Paraiškos numeris: **IP262**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 07 25**

(60) SU duomenys: **PCT/FR 89/00050, 1989 02 08**
SU 4743107, 1990 02 06

(31,32,33) Prioritetas: **88 07530, 1988 06 07, FR**

(72) Išradėjas:
Thierry Burnouf, FR
Miriana 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:
Plazmos baltymų chromatografinis atskyrimo būdas ir šiuo būdu gauti koncentratai

(57) Referatas:

Išradimas apima žmogaus ar gyvulių plazmos baltymų atskyrimo būdą.

Pagal šį būdą krioprecipituotos plazmos soliubilizuota frakcija yra vienastadiškai chromatografuojama ant silpnos joninės jėgos anijonų mainų dervos, užtikrinančios hidrofobines sąveikas, kuri neadsorbuoja vieno baltymų, bet fiksuoja kitus baltymus, kurie po to eliuuojami didėjančios joninės jėgos buferiu, pridėjus natrio chlorido.

Būdas leidžia gauti ypatingai aukšto valymo laipsnio VIII faktoriaus koncentratą, kuris gali būti naudojamas hemofilijos A gydymui. Būdas įgalina taip pat gauti fibrinogeno, von Willebrand'o faktoriaus ir fibronektino koncentratų.

Išradimas apima žmogaus ar gyvulių plazmos baltymų atskyrimą anijonų mainų chromatografijos pagalba, naudojant metodiką, įgalinančią per vieną valymo stadiją gauti aukšto valymo laipsnio VIII faktorių, fibrinogeną ir von Willebrand'o faktorių.

Plazmos baltymų naudojimas terapiniams tikslams reikalauja tokios valymo technikos, kuri leistų gauti aukšto valymo produktus, neturinčius jokių priemaišų, ypač kitų baltymų ar svetimės kilmės komponentų, pav., antikūnių.

Taip, pavyzdžiui, gydant hemofiliją A, svarbu turėti labai aukšto valymo VIII faktoriaus koncentratų; šiais atvejais pacientai gauna daugkartines pakartotines VIII faktoriaus koncentratų injekcijas ir tuo pačiu metu didelius fibrinogeno ir imunoglobulinų kiekius, kurie gali iššaukti nepageidaujamas imunines reakcijas. Ryšium su tuo nepakankamai išvalyto VIII faktoriaus pakartotinės injekcijos gali būti atliekamos tiksliai naudojant vienos kraujo grupės plazmos koncentratų, kad išvengti tipiško kraujo perpylimo komplikacijų, priklausančių nuo skirtingų kraujo grupių ir imunoglobulinų buvimo.

Dažniausiai VIII faktoriaus koncentratai yra gaunami iš krioprecipituotos žmogaus plazmos. Valymo laipsnis VIII faktoriaus koncentratų, paprastai gaunamų pramoniniuose žmogaus plazmos perdirbimo centruose, dažnai yra 1 tarptautinio vieneto/mg (TV/mg) lygyje ir paprastai neviršija 10-20 TV/mg. Įprastinė gavimo technologija naudoja nusodinimo stadijas, siekiančias eliminuoti, dažnai nepakankamai, tokias baltymų priemaišas, kaip fibrinogenas, fibronektinas ir imunoglobulinai. Ši technologija gali naudoti ar derinti nusodinimą prie žemos temperatūros (10°C) ir baltymus nusodinančių agentų naudojimą, pav., hidrofilinių polimerų, kaip PEG

(Newman et. al., Br.J. Haematol 21:1-20, 1971; Hao et al., in Methods of Plasma protein Fractionation, Academic Press 1980, PP. 57-74), polivinil-pirolidonas (Casillas and Simonetti, Br.J. Haemato, 50:665-672, 1982), dekstranas, Fikolis, Perkolis, hidroksietilintas krakmolas ar albuminas, kurie yra pasiūlyti kaip VIII Faktorių nusodinantys agentai (Farrugia et al., Thromb. Haemostas, 51:338-342, 1984). Tas pats liečia gliciną ir natrio chloridą, kurių naudojimą pasiūlė Thorell ir Blömbäck. Kai kurie autoriai (Ng et al., Thrombosis Res., 42: 825-834, 1986) pasiekė gerų rezultatų, derindami tris nusodinimo agentus, pav., PEG, gliciną ir natrio chloridą, gaudami VIII faktoriaus koncentratu su 10-16 TV/mg specifiniu aktyvumu.

Norint gauti didelio molekulinio svorio frakciją, turinčią Faktoriaus VIII:C-von Villebrand'o faktoriaus kompleksą (dalina neturinti fibrinogeno), buvo siūloma naudoti sferinę selektyvinę chromatografiją arba gefiltraciją. Šios metodikos įgalina gauti, nors ir nedidele išeiga, produktą, kurio specifinis aktyvumas neviršija 30 TV/mg ir kuriam reikalingas stabilizatorius - albuminas (dėl ko sumažėja specifinis aktyvumas iki apytiksliai 3-5 TV/mg). Ši technologija kelia eilę problemų, susijusių su metodikos adaptavimu stambiapartijinei gamybai, nes yra sunkumų, palaikant gamybinių gefiltracijos kolonėlių skiriamąją galią tam tikrą periodą.

VIII faktoriaus koncentratai taip pat gali būti gaunami, įvedant į technologinę schemą adsorbcijos ant poringo silicio dioksido mikrogranulių stadiją, siekiant juos išvalyti nuo žemo molekulinio svorio baltymų priemaišų (Margolis et al., Vox Sang. 46:341-348, 1984). Produkto specifinis aktyvumas palyginti mažas: 1 TV/mg.

Pastaruoju metu pasirodė nauji aukštai valytų VIII faktoriaus koncentratų gavimo metodai. Taip, pav., Hyland ir Travenol firmos koncentratų gavimui pasiūlė panaudoti imunoafininės chromatografijos metodus
5 (Zimmerman and Fulcher, Thrombosis Res., Suppl. VII, p. 58, 1987; Berntorp and Nilsson, Thrombosis Res., Suppl. VII, p. 60, 1987; Levine et al., Thrombosis Res, Suppl. VII, 1987). Sutinkamai su šiuo metodu VIII faktoriaus valymui naudojami anti-faktoriaus VIII:C arba anti-von
10 Villebrand'o faktoriaus antikūniai, imobilizuoti chromatografinėje terpėje. Šis metodas duoda gerus rezultatus, bet reikalauja stiprių tirpalų, desorbuojant VIII Faktorių nuo jo ar nuo Villebrando faktoriaus antikūnų. Ryšium su tuo reikalinga papildoma
15 ultrafiltracijos stadija, pašalinant nepageidaujamus cheminius agentus, kas gali neigiamai paveikti VIII faktoriaus biologinį aktyvumą.

Gamybos metu šio faktoriaus specifinis aktyvumas gali
20 siekti 1000 ar net 3000 TV/mg, bet jo nestabilumas reikalauja panaudoti stabilizatorių, pav., albuminą, prieš liofilinimo stadiją, kurios metu VIII faktoriaus specifinis aktyvumas sumažėja iki 3-5 TV/mg. Pagrindinis valymo imuninės chromatografijos metodu
25 trūkumas yra liekamųjų antikūnių buvimas preparate; kadangi antikūniai yra gaunami imunizuojant peles, pacientams jie gali iššaukti tokias imunines reakcijas, kaip kad įvedus svetimus organizmui baltymus.

30 Taip pat buvo naudojama jonų mainų chromatografija, vienok jos pritaikymo sfera apsiribojo laboratoriniais eksperimentais, nes tai susieta su metodikos techniniu sudėtingumu ir žemomis išėigomis.

35 J.J.Morgenthaler (Thromb. Haemostas., Stuttgart, 47(2) 124-127 (1982)) darbe diskutuojama, pav., apie faktoriaus VIII: C valymą, naudojant glikolio

precipitata, leidžiant ją per modifikuotą sefarozę (Sepharose). Vienok, nepateikta duomenų apie produkto išėigą ar rezultatų patikimumą, naudojant skirtingus metodus.

5

Tokiu būdu, svarbu išdirbti naujus baltymų koncentratų gavimo metodus, ypač VIII faktoriaus, kuriuos būtų galima naudoti pramoninėje gamyboje ir gauti aukšto valymo laipsnio produktus, pilnai laisvus nuo svetimų baltymų, pav., nuo gyvulinės kilmės antikūnų.

10

Pareiškėjas siūlo valymą atlikti anijonų mainų chromatografijos pagalba, kuri leistų, tinkamai parinkus dervą, atskirti reikalingus baltymus, naudojant vieną chromatografinę kolonėlę sąlygomis, leidžiančiomis išvengti sekančios procedūros, pav., ultrafiltracijos, kas daro procesą sudėtingesniu ir mažina valyto baltymo aktyvumą.

15

20

Tokiu būdu, išradimas apima plazmos baltymų atskyrimo būdą, konkrečiai - VIII faktoriaus, fibrinogeno, fibronektino ir von Villebrand'o faktoriaus, pasižymintį tuo, kad žmogaus plazmos krioprecipitato soliubilizuota frakcija yra chromatografuojama ant santykinai silpnos joninės jėgos anijonų mainų dervos, užtikrinančios hidrofobines sąveikas, kurios įgalina neadsorbuoti vieno baltymų, o fiksuoti kitus ir kurie tada yra specifiškai eliuuojami didėjančios joninės jėgos buferiui.

25

30

Šitas būdas taip pat yra tinkamas ir gyvulinės kilmės plazmai, pav., kiaulių plazmai, kas aktualu kai kuriais atvejais hemofilija sergantiems ligoniams, kurių serumas turi inhibuojančių savybių ir kurių gydymui negalime naudoti žmogaus VIII faktorių.

35

Kaip pradinę frakciją galime naudoti krioprecipituotos plazmos frakciją, kuri prieš valymo procedūrą buvo iš anksto apdorota. Tokiu apdorojimu gali būti, pav., nusodinimas aliuminio geliu ir/ar nusodinimas prie žemų temperatūrų įprastais metodais, taikomais tokių frakcijų apdorojimui.

Išbandant įvairias dervas, naudojamas chromatografiniam atskyrimui, pastebėta, kad geriausi rezultatai gauti, naudojant DEAE grupes, fiksuotas ant vinil-polimerinio gelio, pav., ant Fractogel TSK. Rinkoje tokio tipo derva figūruoja pavadinimu Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck). Ši chromatografinė terpė duoda žymiai geresnius rezultatus, negu kiti tirti geliai, tokie kaip, pav., DEAE-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B Fast Flow (Pharmacia), DEAE -Sepharose 4B ar DEAE-Trisacril LS (IBF).

Gelio, panašaus į Fractogel-TSK-DEAE (M), panaudojimas yra aprašytas Y. Kato et al. (J. Chromato; 245, 1982, 193-211), kurie jį rekomenduoja naudoti pramoniniam didelio molekulinio svorio baltymų chromatografiniam atskyrimui su vidutiniu efektyvumu. Eliuuojamo produkto užsilaikymas ant šio gelio yra sąlygojamas jo žema jonų mainų galia ir dideliu poringumu.

Pareiškėjas parodė, kad tokio tipo gelis įgalina adsorbuoti pirmiausia labai didelio svorio kompleksus, kurie susidaro tarp VIII faktoriaus ir von Villebrand'o faktoriaus. Be to, per nulygsvarinančio ir eliuuojančio buferių parinkimą Pareiškėjas parodė galimybę panaudoti silpnus hidrofobinius ryšius, susidarančius ilgai užsilaikius stambiamolekuliniams kompleksams ant polivinilo gelio. Šis aprašomojo gelio privalumas anksčiau nebuvo pažymėtas.

- Taikant tokią dervą darbe su plazmos frakcija, turinčia VIII faktorių, pav., su iš anksto valytu krioprecipitatu tirpalu, naudojant atitinkamus buferius, gaunama VIII faktoriaus labai aukšto valymo laipsnio koncentratas su charakteristikomis, būdingomis vienos kraujo grupės plazmos koncentratui. VIII faktoriaus koncentracija tokiuose preparatuose yra 50 TV/ml (specifinis aktyvumas didesnis negu 100 TV/mg), jiems nereiklainga ultrafiltracijos stadija, jie pasižymi aukštu stabilumu, dėl ko jiems nereikalingi baltymų grupės stabilizatoriai. Tos pačios chromatografijos pagalba taip pat galima gauti fibrinogeną, fibronektiną ar von Willebrand'o faktorių praturtintas frakcijas su fiziko-cheminėmis savybėmis, kurios patenkintų klinikinius tikslus arba jas naudojant kaip cheminius reagentus. Be to, fibrinogenas gali būti toliau koncentruojamas ir panaudojamas kaip biologiniai klijai, sutinkamai su Europos patento paraiška Nr. 88 401961.3.
- Būdas sutinkamai su išradimu įgyvendinamas sekančiai. Iš anksto valytą frakciją, turinčią pagrindinius krioprecipitatu baltymus, t. y. fibrinogeną, VIII faktorių, fibronektiną ir von Willebrand'o faktorių, leidžia per anksčiau aprašytą anijonų mainų dervą. VIII faktorius, von Willebrand'o faktorius (pilnai ar didesnioji jų dalis, priklausomai nuo pradinio produkto kiekio) ir fibronektinas yra adsorbuojami ant dervos, tuo tarpu fibrogenas yra randamas neadsorbuotų proteinų filtrate.
- Buferio joninę fėgą padidinus pirmą kartą, yra eliuuojami fibronektinas ir didesnioji von Willebrand'o faktoriaus dalis.
- Papildomai padidinus buferio joninę jėgą, yra eliuuojamas VIII faktorius kartu su mažais von Willebrand'o faktoriaus kiekiais, kuris gali būti iš

karto liofilinamas, nepridedant į jį stabilizatorių ir nenaudojant ultrafiltracijos stadijos.

5 Geriausiai rezultatus galima gauti, naudojant buferį, turintį 2-4 g/ltr lizino ir 8-11 g/ltr glicino. Kitų amino rūgščių ar tik vienos iš šių dviejų paminėtų amino rūgščių panaudojimas duoda žymiai prastesnius rezultatus.

10 Buferio joninė jėga yra didinama, pridedant natrio chlorido. Panaudojimas anksčiau minėtos dervos, pasižyminčios vidutine jonine jėga ir silpnu hidrofo-
biškumu, leidžia naudoti šią druską, desorbuojant von
15 Willebrand'o faktorių anksčiau negu VIII faktorių, kas
įgalina atsisakyti kalcio chlorido panaudojimo, kuri po
to reikia šalinti ultrafiltracijos būdu, disocijuojant
VIII faktoriui ir von Willebrand'o faktoriui.

20 Virusų inaktyvacija, žinoma, gali būti atliekama
įprastu metodu bet kokioje proceso stadijoje. Naudojant
virusus inaktyvuojantį cheminį agentą, inaktyvaciją
geriau atlikti iki plazmos frakcijų užnešimo ant
dervos. Šiuo atveju chromatografinis procesas įgalina
efektyviai eliminuoti inaktyvuojančius agentus.

25 Geri rezultatai gaunami inaktyvacijos metodams naudo-
jant tirpiklius - detergentus, kaip aprašyta Europos
patento paraiškoje Nr. 0 131 740.

30 Norint gauti VIII faktorių, galima chromatografuoti bet
kokią jį turinčią baltymų frakciją, pav., iš anksto
valytą plazmos krioprecipitata, jį užnešant ant
aliuminio gelio, po to nusodinant prie žemos
temperatūros, sutinkamai su VIII faktoriaus koncentratų
35 gavimo įprastiniais metodais, kaip aprašyta Europos
patento paraiškoje Nr. 86 1042 97 6.

Pradinėje frakcijoje faktoriaus VIII:C specifinis aktyvumas gali būti labai žemas (1.0 TV/mg). Vienastadijinė anijonų mainų chromatografija pagal šią išradimą užtikrina 400-700 kartų išvalymą. Išeiga šioje
5 stadijoje 75-90 %.

VIII faktoriaus koncentratas, gautas šiuo būdu, pasižymi aukštu išvalymo laipsniu, jo specifinis aktyvumas yra daugiau negu 100 TV/mg baltymo.
10 Preparatas neturi fibrinogeno ir imunoglobulinų G, jis žymia dalimi laisvas nuo fibronektino. Jame nėra žmogaus kraujo grupės antikūnių arba yra labai nežymūs jų kiekiai. Ryšium su tuo jį galima klasifikuoti pagal Europos Farmakopėjos rekomendacijas kaip vienos kraujo
15 grupės plazmos koncentratą netgi tuo atveju, kai pradinė plazma nebuvo atrinkta pagal kraujo grupes. Todėl jį galima sėkmingai naudoti klinikoje, ypač gydant hemofiliją A, kada reikalingos daugkartinės injekcijos. Jį taip pat galima naudoti kaip reagentą
20 įvairiuose testuose ar analizėse, kur reikalingas aukšto valymo laipsnio VIII faktorius.

Kitos šia chromatografine kolonėle gaunamos frakcijos taip pat kelia susidomėjimą dėl savo baltyminės sudėties: iš vienos pusės - fibrinogenas, kuris
25 randamas pirmame filtrate, o iš kitos pusės - fibronektinas ir von Willebrand'o faktorius, kurie yra eliujuojami, pirmą kartą padidinus joninę jėgą.

30 Sekantys pavyzdžiai iliustruoja išradimą, neribodami jo apimtį.

1 Pavyzdys:

35 **A) Išankstinis valymas ir virusų inaktyvacija**

Kaip pradinė medžiaga buvo naudojamas žmogaus plazmos krioprecipitatas, resuspenduotas vandeniniame natrio heparino (2 V/ml) tirpale, turintis 0.6-1.1 TV/mg specifinio aktyvumo VIII faktorių.

5

0.1 M acto rūgštimi suspensijos pH yra nureguliuojamas iki 7-7.1.

10

Tokia krioprecipitato suspensija yra valoma, naudojant aliuminio gelį ir nusodinimą žemoje temperatūroje. Aliuminio hidroksidas yra sudedamas į suspensiją (108 g 2 % $\text{Al}(\text{OH})_3$, 1 kg krioprecipitato) maišant kambario temperatūroje per 5 min. 0.1 M acto rūgštimi pH yra nureguliuojamas iki 6.5-6.6 ir suspensija maišant yra atšaldoma iki 14-16°C. Pasiekus nurodytą temperatūrą, centrifuguojama 14-16°C temperatūroje, supernatantas yra surenkamas ir sterilizuojamas filtracijos būdu.

15

Toks iš anksto valytas tirpalas yra inaktyvuojamas virusų atžvilgiu, naudojant tirpiklį - detergentą, esant Tween - TNBP, pagal metodą, aprašytą Europos patento paraiškoje Nr. 0 131 740.

20

B) Chromatografinis atskyrimas ant Fractogel TSK-DEAE

25

Paruošiama chromatografinė kolonėlė su Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck) derva, imant 0.5 ltr. Fractogel 1 kg krioprecipitato. Kolonėlė yra plaunama 5 tūriais 0,1 M NaCl tirpalu ir tada nulygsvarinama buferiu, susidedančiu iš:

30

trinatrio citrato (2.94 g/ltr), kalcio chlorido (1 mM), natrio chlorido (0.11 M), glicino (9 g/ltr) ir lizino (3 g/ltr).

35

Ant kolonėlės yra užnešamas iš anksto valytas, kaip aprašyta A) pavyzdyje, krioprecipitato tirpalas.

Gaunami filtratas ir eliuatai yra surenkami ir juose matuojami baltymų kiekiai pagal absorbciją prie 280 nm (toliau žymima O.T. - optinis tankis).

5

Pirmas filtratas rodo piką baltymų, neadsorbuotų ant kolonėlės, ir kuris atitinka pagrindinai fibrinogeną (žiūr. 3-pavyzdį).

10

Išėjus šiam pikui ir O.T. nusileidus iki bazinio lygio, kolonėlė buvo eliuojama tuo pačiu buferiu, padidinus joninę jėgą NaCl pagalba iki galutinės 0.15 M koncentracijos. Šis buferis desorbuoja baltymų piką, kurį sudaro pagrindinis Villebrando faktoriaus kiekis

15

ir fibronektinas (žiūr. 4 pavyzdį).

Išėjus šiam pikui ir O.T. nusileidus iki bazinio lygio, buferio joninė jėga padidinama antrą kartą, pridedant NaCl iki galutinės 0.25 M koncentracijos.

20

Esant šioms sąlygoms, VIII faktorius eliuojamas 30-40 TV/ml lygyje.

2 Pavyzdys: VIII faktoriaus koncentrato paruošimas

25

VIII faktoriaus tirpalas, gautas chromatografijos procese, aprašytame 1 pavyzdyje, yra pakankamai švarus ir koncentruotas, kas leidžia jį iš karto pilstyti į flakonus ir liofilizuoti, nenaudojant papildomos

30

ultrafiltracijos stadijos.

Esant reikalui, galima gauti įvairių koncentracijų tirpalus, skiedimui naudojant tą patį buferį, kuris buvo naudojamas eliucijai. Tokiu būdu galima gauti

35

preparato fasuotes su specifiniu aktyvumu, atitinkančiu veikiančius standartus.

Gaunamų tirpalų sudėties vidurkis yra sekantis:

Baltymai (g/ltr)	0.16-0.25
Faktorius VIII: C (TV/ml)	30-45
Faktoriaus VIII: C specifinis aktyvumas (TV/mg)	120-250
Fibrinogenas (g/ltr)	<0.1
von Willebrand'o faktorius: Ag (V/ml)	11-23
von Willebrand'o faktorius: RCD (V/ml)	10-20
VIII faktorius: Ag (V/ml)	35-60
Ig G (mg/ml) (nefelometrija)	<0.011
Gamtiniai ir imuniniai anti-A-antikūnai	0-2
Fibronektinas (mg/l)	15-40

5 Po liofilizacijos gaunamas švarus, gerai tirpstantis produktas. Faktoriaus VIII:C kiekis yra stabilus 24 valandas, laikant kambario temperatūroje.

10 Injekcijos žmonėms rodo faktoriaus VIII:C kompensaciją, palyginamą su tokia, kuri gaunama naudojant mažiau švarius produktus. Taip pat jo gyvenimo pusperiodis yra ekvivalentiškas kitų preparatų pusperiodžiui.

15 Parodytas koncentrato didelis terapinis efektyvumas, ypač pakartotinių injekcijų atvejais gydant hemofiliją A.

3 Pavyzdys: Fibrinogeno koncentrato valymas

20 Pirmas filtratas, gautas chromatografijos ant DEAE-Fractogel pagalba, aprašytas 1 pavyzdyje, turi fibrinogeną, taip pat albuminą, imunoglobulinius ir antivirusinius agentus (Tween ir TNBP).

Fibrinogenas, esantis šiame tirpale, buvo valomas, naudojant papildomą chromatografijos ant heparino-sefarozės dervos stadiją.

- 5 Chromatografija buvo atliekama tame pačiame buferyje, kuris buvo naudojamas ankstesnėje stadijoje, pridėjus NaCl iki 0.06 M koncentracijos, kas padėjo išvengti dializės tarp dviejų chromatografijos stadijų.
- 10 Filtratas, gautas pirmoje chromatografijos stadijoje, yra praskiedžiamas iki 280 mOsm osmosinio slėgio prie pH 6.5. Po to jis užnešamas ant antros kolonėlės ir gaunamas naujas filtratas, turintis albuminą, imunoglobulinus, tviną ir TNBP. Fibrinogenas yra
- 15 adsorbuotas ant kolonėlės.

Kada filtrato O.T. sumažėja iki bazinio lygio, kolonėlė yra eliuuojama tuo pačiu buferiu, padidinus joninę jėgą NaCl iki galutinės 0.16 M koncentracijos.

- 20 Surinkta fibrinogeno frakcija yra koncentruojama ir dializuojama kasetinėje sistemoje. Koncentruotas produktas yra išpilstomas į flakonus ir liofilinamas.
- 25 Tokiu būdu gautas fibrinogeno koncentratas patenkina kokybės standartų reikalavimus, nustatytus Europos Farmakopėjos.

- 30 Be to, ji galima naudoti kaip substratą, ruošiant klijus, sutinkamai su Europos patento paraiška Nr. 88 401961.3.

4 Pavyzdys: von Willebrand'o faktoriaus koncentrato paruošimas

- 35 Eliuatas, gautas chromatografijos ant DEAE-Fractogel pagalba, naudojant 0.15 M NaCl, kaip aprašyta 1

pavyzdyje, turi didelius von Willebrand'o faktoriaus ir fibronektino kiekius, jame taip pat yra Tween ir TNBP.

5 Ši frakcija praskiedžiama iki 385-390 mOsm osmosinio slėgio, naudojant chromatografinį bazinį buferį (trinatrio citratas, kalcio chloridas, lizinas, glicinas, pH 7, 18 mOsm osmosinis slėgis).

10 Po to ji užnešama ant antros kolonėlės, užkrautos DEAE-Fractogel, nulygsvarintos tuo pačiu buferiu kaip anksčiau ir turinčiu 0.11 M galutinę NaCl koncentraciją, pH 7, 387 mOsm osmosinį slėgį.

15 Esant šioms sąlygoms, labai efektyviai pašalinama tvinas ir TNBP.

20 Kadangi jau pradinis tirpalas turi labai aukštą von Willebrand'o faktoriaus kiekį, jis užsilaiko ant kolonėlės žymiai didesniu laipsniu, negu pirmos kolonėlės atveju. Kolonėlės adsorbcinis talpumas yra mažiausiai 160 V Ag/ml (von Willebrand'o faktoriaus antigeno vienetas) ar 100 RCO/ml (ristocetino kofaktoriaus vienetai).

25 Frakcija, turinti von Willebrand'o faktorių, yra eliuuojama buferiu, į jį pridėjus NaCl iki 0.15 M galutinės koncentracijos.

30 Gautas von Willebrand'o faktoriaus eliuatas yra pakankamai koncentruotas, todėl jį galima išpilstyti į flakonus ir liofilizuoti, papildomai neatliekant ultrafiltracijos.

35 Gautas koncentratas yra labai aukšto valymo laipsnio, jo specifinis aktyvumas viršija 100 RCO vienetų/mg. Jis turi nedidelį fibronektino kiekį, bet tai nedaro įtakos jo aktyvumui.

5 Pavyzdys: Fibronektino koncentrato paruošimas

5 Fibronektino koncentratas gali būti taip pat
paruošiamas iš to paties pradinio eliuato, kaip 4
pavyzdyje.

10 Von Willebrand'o faktorius ir fibronektinas gali būti
atskiriami, remiantis jų molekulinį svorių skirtumu.
Naudojant gelfiltraciją ant Sephacryl S-400 (R)
(Pharmacia) kolonėlės, pav., galima atskirti pirmą
aukšto molekulinio svorio frakciją, turinčią von
Willebrand'o faktorių. Sekanti frakcija turi
15 fibronektiną, kurį galima iš karto pilstyti į flakonus
ir liofilinti.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas žmogaus ar gyvulių plazmos baltymams atskirti,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad plazmos
5 krioprecipitato soliubilizuotą frakciją vienstadi-
jiškai chromatografuoja ant silpnos joninės jėgos
anijonų mainų dervos, sulaikančios labai stambias
molekules ir užtikrinančios hidrofobines sąveikas, ir
po to kiekvieną baltymą selektyviai atskiria, didinant
10 eliucijos buferio joninę jėgą.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad pradinė frakcija yra plazmos krioprecipitatas,
turintis VIII faktorių, von Willebrand'o faktorių,
15 fibrinogeną ir fibronektiną.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad pradinėje frakcijoje faktoriaus VIII: C
specifinis aktyvumas yra didesnis arba lygus 0.1 TV/mg.
20

4. Būdas pagal vieną iš 1-3 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad pradinę frakciją iš anksto
valo, naudojant:

- 25 - apdorojimą aliuminio hidroksidu,
- atšaldymą iki 14-16°C,
- centrifugavimą ir supernatanto surinkimą.

5. Būdas pagal vieną iš 1-4 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš sekančių
30 stadijų:

a) soliubilizuotos krioprecipitato frakcijos chromato-
grafija ant dervos, turinčios DEAE grupes, fiksuotas
ant vinilo polimero gelio, kuri adsorbuoja VIII
35 faktorių, didelę dalį von Willebrand'o faktoriaus ir

fibronektino bei užtikrina fibrinogeno perėjimą į eliuatą,

5 b) buferio joninės jėgos didinimas pirmą kartą, norint eliuuoti fibronektiną ir didesniąją dalį von Willebrand'o faktoriaus, ir

10 c) tolimesnis joninės jėgos didinimas, norint eliuoti VIII faktorių.

6. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad buferis turi liziną ir gliciną.

15 7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad buferis turi 2-4 g/l lizino ir 8-11 g/l glicino.

8. Būdas pagal vieną iš 5-7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad buferio joninę jėgą didina, pridedant NaCl.

20 9. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad natrio chlorido koncentracija a) stadijos atveju yra 0.11 M, b) stadijos atveju - 0.15 M ir c) stadijos atveju - 0.25 M.

25 10. Būdas pagal vieną iš 1-9 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad plazmos virusų inaktyvaciją atlieka cheminiais inaktyvuojančiais agentais prieš chromatografinio atskyrimo stadiją.

30 11. VIII faktoriaus koncentratas, charakterizuojamas kokybe, kuri sulyginama su vienos kraujo grupės plazmos koncentrato kokybe ir kurios specifinis aktyvumas yra didesnis negu 100 TV/mg, b e s i s k i r i a n t i s
35 tuo, kad jį gauna būdu pagal vieną iš 2-10 punktų.

12. Fibrinogeno koncentratas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jį sudaro a) stadijos eliuatas pagal 5
punkto būdą, išvalytas papildomos chromatografijos ant
heparino-sefarozės dervos pagalba.

5

13. Von Willebrand'o koncentratas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jį sudaro b) stadijos eliuatas
pagal 5 punkto būdą, išvalytas papildomos chromato-
grafijos ant tos pačios dervos kaip ir a) stadijoje
10 pagalba ir eliuuotas tuo pačiu buferiu, pridėjus NaCl
iki 0.15 M koncentracijos.

14. Fibronektino koncentratas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jį sudaro b) stadijos eliuatas pagal 5
15 punkto būdą, išvalytas papildomos gelfiltracijos
pagalba.