

(19)



(10) **LT 3417 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3417**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 37/02,
C07K 3/20**

(21) Paraiškos numeris: **IP265**

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

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

(45) Patento paskelbimo data: **1995 09 25**

(72) Išradėjas:
Miryana Burnouf, FR
Dominique Dernis, FR

(73) Patento savininkas:
**ASSOCIATION POUR L'ESSOR DE LA TRANSFUSION SANGUINE DANS LA REGION
DU NORD, 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:
Žmogaus kraujo krešėjimo XI faktoriaus koncentratas ir jo gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas liečia žmogaus XI faktoriaus koncentratą, turintį aukštą specifinį aktyvumą, gautą būdu, kurį sudaro filtracijos-absorbcijos stadija ir vienintelė chromatografijos ant katijonų mainų dervos stadija.

Gautas koncentratas yra puikiai tinkamas terapiniam naudojimui - XI faktoriaus nepakankamumo atvejais pakaitalų terapijai.

Išradimas apima žmogaus plazmos XI faktoriaus koncentrato, turinčio aukštą specifinį aktyvumą ir skirtą terapiniam naudojimui, gavimo būdą.

5 XI faktorius arba plazmos tromboplastino pirmtakas yra glikoproteinas, kuris sudaro kontaktinės fazės dalį hemostazės mechanizme dėl savo aktyvuojančio veikimo į IX faktorių ir, iš kitos pusės, sudaro fibrinolitinės sistemos dalį dėl savo aktyvuojančio veikimo į
10 plazminogeną.

XI faktoriaus nepakankamumas yra paveldimas ir yra perduodamas kaip recesyvinis autosominis požymis. Šis nepakankamumas yra retas, bet jis paplitęs tarp kai
15 kurių Viduriniųjų Rytų gyventojų.

Kaip ir kitiems faktoriams, kurių nepakankamumas yra retas (V, XIII, X faktoriai), valyti terapiniai preparatai, gauti iš žmogaus plazmos, yra reti ir
20 neesminiai, o vienintelė pakaitalų terapija naudoja visą plazmą arba krioprecipituotos plazmos frakciją, vienok, tai sąlygoja vienalaikį kitų plazmos baltymų nenaudingų kiekių įleidimą, taigi ir įvairių antrinių esminių reakcijų riziką po daugkartinių injekcijų.

25 XI faktoriaus valymas eksperimentiškai gali būti sunkiai įgyvendinamas ir tik su sąlyga - naudojant stiprius inhibitorius, kas rodo, jog faktoriaus molekulė yra labai labili. Valymas buvo atliekamas jonų mainų bei afininės chromatografijos 4 arba 5 stadijų pagalba, kaip pradinę medžiagą naudojant plazmą (Bouma ir Griffin, 1977, J. Biol. Chem., 252, 6432-6437) arba trombocitus (Schiffman ir Yeh, 1990, Thromb. Res., 60, 87-97). Taip pat buvo gautas labai išvalytas jaučio XI
30 faktoriaus preparatas iš 20 l plazmos, naudojant išsodinimo ir chromatografinius metodus; valymo trukmė - 9 dienos (Koide et al., 1975, Methods in Enzymology-

Blood clotting enzymes p. 65-73). Vienintelis preparatas, savo kokybe tinkantis terapiniam naudojimui, buvo aprašytas (Winkelman et. al., 1988, Internat. Congress ISBT-BBTS, London) ir buvo gautas adsorbcijos ant heparinosefarožės pagalba, pašalinus VIII ir IX faktorius, bet jo specifinis aktyvumas neviršijo 5 V/mg baltymo, ir jis buvo žymiai užterštas liekamuoju AT III. Pareiškėjai nežinojo kito XI faktoriaus paruošimo būdo, kuris leistų pramoniniu mastu gaminti ir aprūpinti dideliais XI faktoriaus kiekiais, savo kokybe tinkamais plačiam terapiniam naudojimui.

Tokiu būdu, išradimo tikslas - sukurti naują valymo būdą, tinkamą labai dideliems plazmos tūriams, kuris per nedidelį lengvai įgyvendinamų pramoniniu mastu stadijų skaičių leistų gauti XI faktoriaus koncentratą, tinkamą naudojimui.

Taigi, šis išradimas apima žmogaus XI faktoriaus koncentratą, kurio paruošimas susideda iš dviejų stadijų: pirmoji - filtracijos - adsorbcijos stadija, kuri pakankamai selektyviai užlaiko XI faktorių, po to jis desorbuojamas ir apdorojamas antroje stadijoje, chromatografuojant ant katijonų mainų dervos.

XI faktoriaus preparatas gali būti papildomai apdorojamas tirpikliu-detergentu, norint inaktyvuoti virusus; inaktyvavimas atliekamas prieš chromatografijos stadiją, kuri leidžia pilnai pašalinti likusius po šio nukenksminimo produktus.

Šis metodas įgalina gauti tinkamą terapijai XI faktorių, jį išskiriant iš apytiksliai 100 l žmogaus plazmos per, palyginti, trumpą laiką (apie 28 val.), kurio 8 val. skiriamos virusų inaktyvacijai.

Pagal šį išradimą valymo būdas taikomas krioprecipituotos plazmos supernatantui, gaunamam įprastais, gerai žinomais būdais, ir gali būti taikomas 1000-1200 l tūriams.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
- Pirma valymo stadija susideda iš krioprecipituotos plazmos supernatanto filtravimo baterijoje su 3 filtruojančiais elementais, kurių porų dydis 0,5-2 μ ir kurie pagrindinai užkrauti neigiamai (Zeta plus™ CF filtrai, tiekiami Cuno, Process Filtration Products, filialas Commercial Intertech Corp., Meriden, Conn., 06450, žemiau vadinami "Kuno filtrai"), aprašyti JAV patentuose 4,783,262 ir 4,859,340. Šiuos filtrus sudaro perlitai ir valyta celiuliozė, turinti nedidelius teigiamai užkrautos dervos kiekius, kad sulaikyti konkrečias medžiagas; filtrai yra pilnai laisvi nuo asbesto ir stiklo mikrofibrilių. Taip pat gali būti naudojamos kitos filtrų sistemos, esančios pardavime.
- Filtrai, adsorbuojantys XI faktorių, plaunami citrat-fosfatiniu buferiniu tirpalu, susidedančiu iš natrio citrato, dinatrio fosfato, kalio fosfato, natrio chlorido ir dinatrio EDTA; pH nustatomas tarp 5.5 ir 6.5, tinkamiausia pH = 6. Ši filtracijos stadija pašalina didelę dalį plazmos baltymų.

- 30
- XI faktorius, adsorbuotas ant filtro sluoksnių dėl jų neigiamų krūvių, desorbuojamas nuo jų, padidinant buferio tirpalo joninę jėgą, reguliuojant galutinę natrio chlorido koncentraciją. Į šį paskutinį buferio tirpalą taip pat dedama nedidelis III antitrombino kiekis (AT III) - 0.1-0.2 V/ml, kad apsaugoti XI faktorių nuo proteazių veikimo.

- 35
- Po to desorbuota, dializuota ir koncentruota frakcija užnešama ant katijonų derva užkrautos kolonėlės (dažniausiai, sefarozės sulfato geliu), nulygsvarintos

buferio tirpalu, susidedančiu iš natrio citrato, natrio chlorido, lizino ir arginino, turinčio pH 5.5-6.5, tinkamiausia pH = 6.

- 5 Ši kolonėlė praleidžia likusius užteršiančiuosius baltymus ir virusus inaktyvuojančius agentus.

Šiame išradime buvo atrasta, kad sefarozės sulfato gelis, nelauktai, turi labai didelį XI faktoriaus užlaikymo talpumą (nuo 300 iki 450 v/ml gelio), kas leidžia išvengti sekančios ultrafiltracijos stadijos, mažinančios išeigą. dar daugiau, adsorbcija ant sefarozės sulfato leidžia atlikti eliuciją praktiškai fiziologiniu tirpalu, kai tuo tarpu kitos dervos (aprašytos aukščiau), kurių pagrindą sudaro sulfopropilo grupės, reikalauja griežtesnių eliucijos sąlygų.

Po to, kai kolonėlė yra praplauta citrat-fosfatiniu buferiu, turinčiu natrio citratą, dinatrio fosfatą, kalio fosfatą, natrio chloridą, liziną ir arginimą, kurio pH yra 6.1-6.9, tinkamiausia pH = 6.5, XI faktorius yra desorbuojamas, padidinus buferio pH iki 7-8, tinkamiausia pH = 7.5, ir padidinus natrio chlorido koncentraciją iki 0.15-0.20 M, tinkamiausia iki 0.17 M.

Nuo XI faktoriaus eliuavimo momento, jis stabilizuojamas, pridedant 0.5-3 v/ml gerai valyto AT III ir 0.5-4 v/ml heparino. Po to tirpalas sterilizuojamas filtracijos būdu, išpilstomas į flakonus ir liofilinamas įprastu būdu.

Gautas šiuo būdu XI faktorius yra išvalytas daugiau kaip 10,000 kartų pradinės plazmos atžvilgiu.

Pagal šį būdą gauto XI faktoriaus specifinis aktyvumas yra mažiausiai lygus 100 v/mg baltymų.

5 Gauto XI faktoriaus aukštas išvalymo laipsnis yra patvirtinamas elektroforeze SDS - poliakrilamido gelyje, biocheminiais tyrimais, o jo nekenksmingumas - biologiniais testais su gyvuliais.

10 Taigi, XI faktoriaus koncentratas, gautas šiuo būdu, yra ypač tinkamas terapiniam naudojimui, ypatingai, pakaitalų terapijoje - įgimto ir įgyto XI faktoriaus nepakankamumo atvejais.

15 Sekantis pavyzdys iliustruoja šio išradimo įgyvendinimo variantą, neapribojant, vienok, išradimo apimtį.

Pavyzdys

Pradinė medžiaga

20 Kiekviena XI faktoriaus partija yra paruošiama iš apytiksliai 1000 l standartiniu būdu paruošto žmogaus plazmos krioprecipituoto supernatanto. Krioprecipituotas supernatantas yra paruošiamas iš užšaldytos -
25 60 C temperatūroje šviežios plazmos, ją atsargiai atšildant prie 4 C ir centrifuguojant, kad atsiskirtų krioprecipitatas ir supernatantas.

Pirma valymo stadija

30 Krioprecipituotas supernatantas yra praleidžiamas per "Kuno filtrų" elementus, baterijose išdėstytus po tris. Naudojami arba 0.5-1 μ (50 S tipas), arba 1-2 μ (30 S tipas) filtrai.

35 Filtruojantys elementai, pašalinus filtratą, turintį daugumą krioprecipituoto supernatanto baltymų, buvo

plaunami citratfosfatiniu buferiu, turinčiu 5 mM natrio citrato, 5 mM dinatrio fosfato, 5 mM kalio fosfato, 0.065 M natrio chlorido ir 0.5 mM dinatrio EDTA; citrinų rūgštimi nustatomas pH = 6.

5

Ant filtro sluoksnių buvo stebima, palyginti, selektyvinė XI faktoriaus adsorbcija.

10

XI faktorius nuo filtrų buvo desorbuojamas, padidinus plaunančio buferio joninę jėgą iki 1 M NaCl koncentracijos. Kad apsaugoti XI faktorių nuo liekamųjų plazmos proteazių veikimo, į jį buvo taip pat pridedama 0.2 v/ml AT III; buferio EDTA taip pat dalyvauja šiame apsauginiame veikime.

15

Tokiu būdu surinktas XI faktoriaus tirpalas yra 30 kartų koncentruojamas ir dializuojamas, norint pašalinti EDTA, naudojant Millipore™ ultrafiltracijos sistemą, sudarytą iš 10 kasečių su 10 K membranomis.

20

Dializės buferio sudėtis: 5 mM natrio citrato, 0.14 M natrio chlorido, 5.5 mM L-lizino ir 20 mM L-arginino; pH = 6.

25

Dializuotas tirpalas yra leidžiamas per DSLK2NLP (PALL™) 0.45 μ filtra, norint jį nuskaidrinti ir pašalinti bet kokius bakterinius teršalus.

Virusų inaktyvacija

30

Tirpalas, turintis XI faktorių, yra apdorojamas tirpikliu-detergentu, žinomu savo efektyvumu prieš virusus su lipidų apvalkalėliais (Horowitz et al., 1985, Transfusion 25, 516-522); inkubacija vykdoma 8 val. 25 C temperatūroje, esant 0,3 % tri-n-butilfosfato (TnBP) ir 1 % Tween'o 80.

35

Antra valymo stadija

5 Naudojama chromatografinė kolonėlė su katijonų mainų derva, dažniausiai, su "sefarozės sulfato greitos srovės"™ geliu (tiekiama Pharmacia firmos, Uppsala, Sweden).

10 Kolonėlė yra nulygsvarinama aukščiau aprašytu dializės buferiu.

15 Baltymų tirpalu užkrovus kolonėlę, ją praplaunama praplovimo buferio 10-15 tūriais, kad pašalinti silpnai adsorbuotus baltymus ir virusus inaktyvuojančius agentus. Šis praplovimo buferis susideda iš 10 mM natrio citrato, 5 mM dinatrio fosfato, 5 mM kalio fosfato, 0.12 M natrio chlorido, 27 mM lizino ir 11.5 mM arginino; pH = 6.5.

20 Nulygsvarinančio, praplaunančio ir eliucijos buferių srovės linijinis greitis yra 50 cm/val.

XI faktorius iš kolonėlės yra eliuuojamas, padidinus buferio pH iki 7.5 ir NaCl koncentraciją iki 0.17 M.

25 Nuo XI faktoriaus eliucijos pradžios, į ją pridedama 2 v/ml AT III (t.y., apytiksliai 1.5-2.5 % nuo f XI kiekio) ir 5 v/ml heparino (t.y., 1.5-2.5 % nuo f XI kiekio), kad jį stabilizuoti (abu produktai yra labai švarūs ir kokybe tinkami žmonių injekcijoms).

30 Taip paruoštas XI faktoriaus tirpalas yra sterilizuojamas filtruojant per DSLK1NFZP(PALL™) 0.22 µ filtra, fasuojamas (10 ml/flakonui) ir liofilinamas.

XI faktoriaus koncentrato biocheminiai ir biologiniai tyrimai

Buvo tiriama paeiliui 6 partijos.

5

IX faktoriaus specifinis aktyvumas yra 130-150 v/mg baltymų (t.y., f XI + AT III). Prieš pridedant AT III, specifinis aktyvumas yra 210 v/mg.

10 XI faktorius, kuris prieš liofilinimą buvo nureguliuotas iki apytiksliai 100-120 v/ml, turėjo 90-110 v/ml koaguliavimo aktyvumą.

15 Sekančios 1 ir 2 Lentelės pateikia valyto produkto charakteristikas.

1 LENTELĖ

20 XI faktoriaus išskyrimas ir valymo frakcijų švarumas (6 partijų vidurkis)

Frakcijos	Išeiga (%)	Specifinis aktyvumas (v/mg)	Išvalymo laipsnis (kartai)
Eliuatas po "Kuno filtrų"	37	12	≈800
Po tirpiklio-detergento apdorojimo	98	12	
Eliuatas po S-Sefarozės chromatografijos	62	210	≈14000

2 LENTELĖ

Liofilizuoto XI faktoriaus charakteristikos (6 partijų vidurkis)

5

Baltymų kiekis	0.7-1.1
XI faktorius (v/ml)	90-110
Specifinis aktyvumas (v/mg) (po AT III pridėjimo)	130-150
Cl-inhibitorius*	0.34
Fibronektinas*	0.46
Alfa 2-makroglobulinas*	0.13
Ig G*	0.18
Albuminas	<0.0006
Fibrinogenas	<0.002
NAPPT (skiedimas 1/10)	>600"
NAPPT (skiedimas 1/100)	221"
NAPPT (1/10)**	166"
NAPPT (1/100)**	216"
FCT (20 C)	>24h
FCT (37 C)	>6h

* Išreikšta mg/1000 vf XI

** Skiedimai, nustatyti po heparino neutralizavimo

10

Kaip parodyta 1 Lentelėje, adsorbcija ant filtro sluoksnių įgalino atskirti XI faktorių nuo daugumos plazmos baltymų, gaunant 12 v XI faktoriaus / mg baltymo. Šis specifinis aktyvumas atitinka maždaug 800 kartų išvalymo laipsnį, lyginant su pradine plazma. Dalinai valyto XI faktoriaus chromatografavimas ant S-Sefarozės padidino specifinį aktyvumą iki > 200 v/mg,

15

kas atitinka > 14000 kartų išvalymo laipsnį, lyginant su plazma. Plovimo stadija prieš XI faktoriaus eliuaciją, atliekama padidinus buferio pH, padeda padidinti išvalymą, pašalinant dalį užteršiančiųjų baltymų, daugiausia fibronektiną. Šiomis sąlygomis gelio imlumas XI faktoriaus atžvilgiu buvo apie 300 v/ml, o baltymų atžvilgiu - apie 36 mg/ml.

Šie rezultatai yra palyginami su terapiniais Winkelman ir kt. preparatais (Internat. Congr. ISBT-BBTS-London 1988, Abstract No. P. M. 4.15), kurių specifinis aktyvumas yra apie 5 v/mg baltymo ir turi ekvivalentines AT III dozes.

Mažas užteršiančių baltymų kiekis (išskyrus specialiai pridėtą AT III) yra patvirtintas imunonefelometriškai.

Elektroforezė SDS-poliakrilamido gelyje rodo vieną didelę juostą prie 160 KDa ir vieną mažą juostą prie 62 KDa, kuri atitinka AT III. Po baltymų redukcijos β -merkaptetanoliu nedetektuojama jokia juosta 50-30 KDa srityje, kas rodo, kad XI faktoriaus molekulės nebuvo aktyvuojamos valymo proceso eigoje (Bouma ir Griffin, 1986, Blood Coagulation, Ed. Hemker - pp 103-128).

Liekamajam užterštumui, sąlygojamam koaguliacijos faktorių ir kinino sistemos komponentų, kruopščiai kontroliuoti buvo naudojami klasikiniai metodai.

Sukūrus liofilintą preparatą, buvo atlikti klasikiniai testai su gyvuliais, nustatant leistinas organizmui dozes:

- trombogeniškumo testas su triušiais,
- hipotenzijos testas su žiurkėmis,

- toksiškumo testas su pelėmis.

5 Testas su triušiais rodo, kad preparatas nėra
trombogeniškas, kadangi efektyvi dozė 50 (ED 50) yra
didesnė negu 1000 v f XI/kg, tuo tarpu tas pats
parametras yra 40-60 v/kg eilės PPSB koncentrato
atveju, kuris dėl to yra žymiai daugiau trombogeniškas
ir gali efektyviai iššaukti trombozes ir kraujagyslėse
10 paskleisti koaguliaciją, kada žmonės injekuojami
didelėmis dozėmis.

Koncentratas neiššaukia hipotenzijos reiškinių, kada
žiurkėms intraveniškai įvedama 50 V f XI/kg dozėmis.
15 Šis gyvulių modelis yra labai jautrus plazmos
komponentų su vazoaktyviomis savybėmis buvimui, kas
įrodo šių komponentų nebuvimą XI faktoriaus
koncentrate, gautame pagal aprašytą būdą.

20 Jo didelių dozių (2500 v f XI/kg) intraveninis įvedimas
pelėms neiššaukia jokio letališkumo ar nukrypimo
elgesyje 7 dienų laikotarpyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Žmogaus XI faktoriaus koncentratas terapiniam naudojimui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi
5 mažiausiai 100 v/mg baltymo specifinį aktyvumą.
2. Būdas XI faktoriaus koncentratui, turinčiam mažiausiai 100 v/mg baltymo specifinį aktyvumą, gauti, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro:
10
 - a) krioprecipituoto supernatanto kontaktavimas su filtru, galinčiu adsorbuoti XI faktorių, gaunant filtru adsorbuotą XI faktorių;
 - 15 b) minėto XI faktoriaus desorbciija nuo minėto filtro, gaunant XI faktoriaus desorbuotą tirpalą;
 - c) minėto XI faktoriaus praleidimas per vienos stadijos katijonų mainų dervos chromatografinę kolonėlę, užkraunant minėtą kolonėlę XI faktoriumi; ir
20 d) minėto XI faktoriaus eliucija, gaunant minėtą XI faktoriaus koncentratą.
- 25 3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą filtrą sudaro filtro serijos iš celiuliozės ir perlitų elementų, kurių porų dydis 0.5-2 μ ir kurie pagrindinai užkrauti neigiamai.
- 30 4. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad a) stadiją vykdo kontaktuojant minėtam krioprecipituotam supernatantui su minėto filtro elementais.
- 35 5. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad toliau po a) stadijos XI faktorių adsorbavusį filtrą plauna buferiu, turinčiu natrio citratą,

dinatrio fosfatą, kalio fosfatą, natrio chloridą, etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druską, sukoreguotu iki pH 5.5-6.5.

- 5 6. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad b) stadijoje faktorių XI desorbuoja nuo filtro, didinant buferio, kurį sudaro natrio citratas, dinatrio fosfatas, kalio fosfatas, natrio chloridas, etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska ir
10 antitrombinas III, joninę jėgą.
7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad joninę jėgą padidina, didinant natrio chlorido koncentraciją iki 0.5-2 M.
15
8. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad papildomai prideda 0.1-0.2 v/ml antitrombino III į desorbcijos buferį.
- 20 9. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad toliau atlieka XI faktoriaus desorbuoto tirpalo dializę, XI faktoriaus desorbuoto tirpalo koncentravimą ir XI faktoriaus desorbuoto tirpalo antivirusinį apdorojimą.
25
10. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad c) stadijoje katijonų mainų derva yra sefarozės sulfatas.
- 30 11. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad po to chromatografinė kolonėlė nulygsvarinama buferiu, susidedančiu iš natrio citrato, natrio chlorido, lizino ir arginino iki pH 5.5-6.5.
- 35 12. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad po c) stadijos užkrautą kolonėlę praplauna buferiu, susidedančiu iš natrio citrato, dinatrio

fosfato, kalio fosfato, natrio chlorido, lizino ir arginino, sukoreguotu iki pH 6.1-6.9.

5 13. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadija apima XI faktoriaus eliuciją, padidinus buferio pH iki 7-8 ir padidinus natrio chlorido koncentraciją iki 0.15-0.20 M.

10 14. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad po d) stadijos eliuotą XI faktorių stabilizuoja, pridedant 0.5-3 v/ml antitrombino III ir 0.5-4 v/ml heparino 100-ui v XI faktoriaus ir XI faktoriaus koncentratą liofilina.