

Галузь, якої стосується винахід

Цей винахід стосується способу очищення лютеїнізуючого гормону (LH), зокрема, очищення рекомбінантного LH (r-LH) зі зразка неочищеного рекомбінантного LH, який включає комбіноване використання іонообмінної хроматографії та рідинної хроматографії високої ефективності (PXBE) з оберненою фазою.

Лютеїнізуючий гормон (LH) є гонадотропіном, який виділяється передньою часткою гіпофізу разом з іншим гонадотропіном, гормоном стимуляції яєчників (FSH). Ці гормони являють собою гетеродимери, що складаються з α - і β -субодиниць, зв'язаних нековалентно.

Ці гонадотропіни стимулюють нормальне функціонування гонад та секрецію статевих гормонів як у чоловіків, так і в жінок. У жінок гормон стимуляції яєчників стимулює розвиток та визрівання фолікулів та яйцеклітин. В процесі розвитку фолікул виділяє у зростаючій кількості естроген, який в середній фазі циклу стимулює вивільнення LH. Це викликає перфорацію фолікула з овуляцією і перетворення фолікула в жовте тіло, яке виділяє прогестерон. У чоловіків лютеїнізуючий гормон стимулює інтерстиціальні клітини яєчок, що виділяють тестостерон, який, у свою чергу, безпосередньо впливає на сім'яносні каналці. Гонадотропні речовини, що мають здатність стимулювати яєчники або лютеїнізуючу здатність, або обидві ці здатності, використовуються при лікуванні безплідності, головним чином, у жінок, але також і в чоловіків. До таких речовин належать хоріонічний гонадотропін, який має активність LH, та менопаузні гонадотропіни людини, які мають одночасно активність LH та FSH. Рекомбінантний лютеїнізуючий гормон людини (rechLH), одержаний із ДНК, досліджується як альтернатива хоріонічному гонадотропіну або як засіб, придатний для вживання в комбінації із FSH.

Для виділення та очищення LH використовувалися різноманітні способи, такі як іонообмінна, гель-фільтраційна та імуноафінна хроматографія (дивись роботу Джека, Блазека, Джеймса та інших (G.W. Jack, R. Blazek, K. James, I.E. Boyd and L.R. Micklem) "Автоматизоване виробництво глікопротеїнових гормонів гіпофізу людини - тиротропіну, фолітропіну та лютропіну - з використанням імуноафінної хроматографії" (Journal of Chemical Technology and Biotechnology 39, 45-58 (1987))).

Для виділення цих гормонів використовується іонообмінна хроматографія, проте цей спосіб, як виявилось, є пов'язаний з деякими проблемами, спричиненими значною гетерогенністю зарядів LH у тканині гіпофізу. По-перше, оскільки значення заряду згаданих глікопротеїнів та FSH взаємно перекриваються, їх повне розділення утруднене та трудомістке. По-друге, очищення цих гормонів у формі окремих фракцій може бути утрудненим (Стокел-Хартрі, Томас, Фурніваль та інші (A. Stockel Hartree, M. Thomas, B.E. Furnival, T.W. Burns and P. Langley), "Тироїд-стимуляційна та ліполітична активність очищених препаратів тироїд-стимулювального гормону людини", Journal of Endocrinology 53, 95-100, 1972). Як наслідок, в процесі очищення можуть бути відібрані деякі заряджені форми гормону, як це пропонується у випадку LH (Сторрінг, Заїці, Містрі та інші (P.L. Storrington, A.A. Zaidi, Y.G. Mistry, M. Lindberg, B.E. Stenning and E. Diczfalusi), "Зіставлення високочистих препаратів лютеїнізуючого гормону гіпофізу людини: відмінності в ефективності лютеїнізуючого гормону, визначені шляхом біопроб in vitro, in vivo та імунологічних проб", Acta Endocrinologica 101, 339-347, 1982). Селективне очищення додатково ускладнює визначення характеристик цих гетерогенних форм, в тому числі структурний аналіз їхніх вуглеводних компонентів. Основною причиною гетерогенності зарядів LH, можливо, є непостійність вмісту аніонних олігосахаридів, що містять сіалільні та сульфатні групи.

Описано використання звичайних способів фракціонування для виготовлення сечового лютеїнізуючого гормону людини (LH) з ефективністю 982 міжнародні одиниці (МО) на міліграм за результатами біопроб та 1166 МО/мг за результатами радіоімуннологічного аналізу (С. Доніні, П. Доніні (S. Bonini and P. Donini, Acta endocrin., Copenhagen, 63, Suppl. 142, 257-277, 1969)). Імуноабсорбент сироваткового антитіла кролика до очищеного хоріонічного гонадотропіну людини (HCG) був використаний для очищення LH з основної та побічної фракцій, одержаних у процесі приготування гормону стимуляції яєчників (FSH) з менопаузної сечі (ван-Гелл, Шуурс, Голландер (H. van Hell, A.H.W.M. Schuurs and F.C. Hollander, in: Symposium on gonadotropins, New York, 17 June 1971, Eds. B.B. Saxena, C.G. Beling and H.M. Gandy, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1972). Одержаний препарат мав вищу ефективність LH, але водночас і вищі значення відношення FSH:LH, ніж препарати, виготовлені Доніні та Доніні (1969).

Перевага рекомбінантного LH полягає в відсутності в ньому інших гонадотропних гормонів, таких як FSH та TSH. Неочищений препарат рекомбінантного LH містить, однак, усі інші протеїни та домішки клітин, використаних при одержанні рекомбінантного гормону, отже, дуже бажаним є створення способу досягнення абсолютної чистоти рекомбінантного лютеїнізуючого гормону.

Короткий опис винаходу

Автори цього винаходу з'ясували, що неочищений препарат LH, одержаний з культурального середовища після рекомбінаційного процесу або з неочищеного концентрату постменопаузної сечі, можна очистити до такого ступеня, що одержаний LH буде практично вільний від протеїнів та/або інших домішок, які містилися в неочищеному препараті LH. Залежно від вихідного матеріалу, протеїни та інші домішки походять або з людського організму (якщо вихідним матеріалом є менопаузні гонадотропіни людини), або з організму-носія (наприклад, СНО, якщо носієм є клітини СНО).

Спосіб очищення базується на використанні іонообмінної хроматографії та рідинної хроматографії високої ефективності з оберненою фазою. Факультативне подальше використання гель-проникної колонки дозволяє видалити з чистого препарату LH будь-які залишкові кількості домішок. Оптимальні результати досягаються при використанні двох стадій іонообмінного хроматографування та двох стадій рідинного хроматографування високої ефективності з оберненою фазою.

Спосіб за цим винаходом можна використати для очищення рекомбінантного LH, при цьому вихідним матеріалом є препарат культурального середовища, одержаний після рекомбінаційного процесу, таким чином, що одержаний LH високої чистоти буде практично вільним, наприклад, від протеїнів сироватки зародка великої рогатої худоби (FBS), які часто містяться в культуральному середовищі, нуклеїнових кислот або інших домішок, присутніх у клітинах носія, які використовуються в рекомбінаційному процесі.

Спосіб за цим винаходом можна використати також для очищення сечового LH, при цьому вихідним матеріалом є неочищений концентрат постменопаузної сечі, та для очищення LH, одержаного з інших

джерел, зокрема, з організмів ссавців, в тому числі, наприклад, великої рогатої худоби, коней, свиней, овець, пацюків, мишей та мавп.

Таким чином, метою цього винаходу є запропонувати спосіб очищення ЛН із вихідного матеріалу з використанням іонообмінної хроматографії в комбінації з рідинною хроматографією високої ефективності (PXBE) з оберненою фазою. Спосіб включає стадії піддавання вихідного матеріалу (в разі необхідності концентрованого) іонообмінному хроматографуванню та піддавання елюату рідинному хроматографуванню високої ефективності з оберненою фазою. Може бути використана додаткова подальша стадія пропускання елюату через гель-проникну колонку.

Залежно від чистоти вихідного препарату, перевага віддається двократному використанню іонообмінної хроматографії та PXBE з оберненою фазою з метою досягнення оптимальних результатів процесу очищення. Такий спосіб може включати стадії:

(a) елюювання вихідного матеріалу через колонку для іонообмінної хроматографії зі стаціонарною фазою ДЕАЕ-Сефароза (DEAE-Sepharose);

(b) елюювання через колонку для іонообмінної хроматографії зі стаціонарною фазою Q-Сефароза (Q-Sepharose);

(c) елюювання через колонку для PXBE з оберненою фазою на силікагелі C18 Silica C18;

(d) повторне елюювання через колонку для PXBE з оберненою фазою на силікагелі C18 Silica C18 [факультативно з використанням іншого елюенту, ніж на стадії (c)]; і

(e) елюювання через гель-проникну колонку.

У варіанті здійснення винаходу, якому віддається перевага, елюювання через колонку для іонообмінної хроматографії з ДЕАЕ-Сефарозою здійснюють у натрій-фосфатному буферному розчині при рН 8.

При елююванні через колонку для іонообмінної хроматографії з Q-Сефарозою перевага віддається використанню буферного розчину ацетату амонію при рН 7,5.

При виконанні елюювання через колонку для PXBE з оберненою фазою на стадії (c) перевага віддається використанню 2-пропанолу з ацетатом амонію як рухомої фази.

При виконанні елюювання через колонку для PXBE з оберненою фазою на стадії (d) перевага віддається використанню 2-пропанолу із Трис-НСІ як рухомої фази.

ЛН за цим винаходом у варіанті, якому віддається перевага, є ЛН людини, а найбільша перевага віддається рекомбінантному ЛН людини, одержаному з культурального середовища клітин ссавців (перевага віддається клітинам СНЮ), які використовуються в рекомбінаційному процесі.

Іншою метою цього винаходу є запропонувати фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість рекомбінантного ЛН, одержаного з рекомбінаційного процесу, як описано вище, разом із придатними для цього наповнювачами, такими як сахароза, необхідними для стабілізації ліофілізованого продукту. Фармацевтична композиція рекомбінантного ЛН особливо придатна для підшкірного введення.

Детальний опис винаходу

Цей винахід пропонує спосіб очищення ЛН, зокрема, спосіб очищення рекомбінантного ЛН із неочищеного препарату культурального середовища рекомбінаційного процесу. Спосіб забезпечує одержання рекомбінантного ЛН людини з високим ступенем чистоти та високою питомою активністю, практично вільного від протеїнів сироватки зародка великої рогатої худоби в разі їх присутності в згаданому культуральному середовищі та від нуклеїнових кислот та інших домішок, що містяться в клітинах носія, використовуваних у рекомбінаційному процесі.

Винахід розрахований для застосування до біологічних матеріалів, зокрема, до неочищених сумішей, які містять ЛН та інші протеїнові забруднювачі. Такі суміші в цьому описі позначено терміном "вихідні матеріали". У прикладах, детально описаних нижче, використовуються зразки вихідного матеріалу, що містять г-ЛН, одержані з супернатантного середовища культури в біореакторі. Альтернативним різновидом вихідного матеріалу є менопаузний гонадотропін людини (hMG), що являє собою неочищений концентрат постменопаузної сечі.

Як вихідний матеріал використовують свіжозібране супернатантне середовище культури клітин, що пройшло через біореактор. Його у варіанті, якому віддається перевага, освітлюють фільтруванням. Потім неочищений розчин можна в разі необхідності концентрувати, після чого піддати ультрафільтруванню для видалення матеріалу, що має молекулярну масу меншу ніж 10 кДа. При застосуванні ультрафільтрування можна також замінити буферну сполуку на фосфат натрію, рН 8.

Після попередніх стадій вихідний матеріал піддають іонообмінному хроматографуванню та PXBE з оберненою фазою, причому перевага віддається двократному виконанню кожної з цих стадій. При виконанні першої стадії іонообмінного хроматографування перевага віддається використанню ДЕАЕ-Сефарози. На цій стадії ЛН практично повністю проходить через колонку, при цьому видаляється значна частка протеїнів, інших ніж ЛН. На другій стадії іонообмінного хроматографування перевага віддається використанню колонки з Q-Сефарозою. На цій стадії ЛН також проходить через колонку; стадія призначена для видалення потенціальних домішок ДНК та клітин носія або протеїнів із середовища. У варіанті, якому віддається перевага, цю стадію виконують при температурі приблизно 5°C з елююванням буферним розчином ацетату амонію при рН 7,5.

Хроматографування з оберненою фазою на силікагелі C18 також краще виконувати двічі; воно забезпечує ефективне видалення залишкових кількостей сироватки зародка великої рогатої худоби, домішок клітинних протеїнів та ендотоксинів. На першій стадії PXBE перевага віддається використанню суміші 2-пропанолу/ацетату амонію як рухомої фази. На другій стадії PXBE з оберненою фазою перевага віддається використанню як рухомої фази 2-пропанолу/Трис-НСІ. Потім розчин затриманої фракції концентрують, і продукт можна виділити з нього бікарбонатом амонію, рН 8. Концентрований продукт у варіанті, якому віддається перевага, піддають гель-проникній хроматографії на сорбенті "Сефакрил" (Sephacryl S 100 HR). На цій стадії досягається розділення за розміром молекул з елююванням бікарбонатом амонію (рН 8); потім елюат у варіанті, якому віддається перевага, піддають фільтруванню з метою видалення вірусних забруднювачів, а потім ультрафільтруванню через мембрани з верхньою межею пропускання молекулярної маси 10 кДа в натрій-фосфатному буферному розчині, рН 8. Після фільтрування очищений нерозфасований розчин ЛН доцільно зберігати в стерильних пляшках при низькій температурі.

ПРИКЛАД 1

Реагенти

Оцтова кислота льодяна для аналізу (за Європейською Фармакопеею) (далі ЄФ)

Ацетат амонію для аналізу

Бікарбонат амонію для аналізу (за Британською Фармакопеею) (далі БФ)

Вторинний кислий фосфат натрію для аналізу

Хлористоводнева кислота для аналізу (ЄФ)

Фосфорна кислота для аналізу (ЄФ)

2-Пропанол для аналізу (ЄФ)

Хлорид натрію для аналізу (ЄФ)

Первинний кислий фосфат натрію для аналізу

Гідроксид натрію гранульований для аналізу (ЄФ)

Трифтороцтова кислота (ТФК) для РХВЕ

Трис-(гідроксиметил)амінометан для аналізу

Вода для ін'єкцій (ВДІ) (ЄФ)

Схема послідовності технологічних операцій процесу очищення у короткому викладі

Таблиця 1 являє собою схему послідовності технологічних операцій, що коротко представляє процес очищення r-hLN і характеризує принципи виконання кожної із проміжних стадій.

**Таблиця 1: Схема послідовності технологічних операцій процесу очищення
r-hLN у короткому викладі**

	КУЛЬТУРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ З БІОРЕАКТОРА
СТАДІЯ I	↓ Ультрафільтрування (10 кДа) ↓ КОНЦЕНТРОВАННИЙ НЕОЧИЩЕНИЙ ПРЕПАРАТ r-hLN
СТАДІЯ II	↓ Нагромаджений концентрований неочищений препарат r-hLN ↓ ДЕАЕ-СЕФАРОЗА CL-6B ↓ Незв'язана фракція містить r-hLN ↓ Ультрафільтрування (100 кДа) ↓ Ультрафільтрування (10 кДа) ↓
СТАДІЯ III	Q-СЕФАРОЗА FF ↓ Незв'язана фракція містить r-hLN
СТАДІЯ IV	↓ ПЕРША СТАДІЯ РХВЕ З ОБЕРНЕНОЮ ФАЗОЮ ↓ Елюат містить r-hLN
СТАДІЯ V	↓ ДРУГА СТАДІЯ РХВЕ З ОБЕРНЕНОЮ ФАЗОЮ ↓ Елюат містить r-hLN ↓ Ультрафільтрування (10 кДа) ↓
СТАДІЯ VI	СЕФАКРИЛ S100 HR ↓ Незв'язана фракція містить r-hLN ↓ Ультрафільтрування (10 кДа) ↓ Затримана фракція містить r-hLN ↓ НЕФАСОВАНИЙ РОЗЧИН r-hLN

Просвітлення, концентрування, діаліз та фільтрування первинного матеріалу (Стадія I)

На цій стадії (Стадія I) замінюють буферну сполуку для регулювання складу та досягають попереднього концентрування. Цю стадію виконують при температурі приблизно $+5^{\circ}\text{C}$ і повторюють окремо для кожної партії первинного матеріалу, зібраної на протязі виробничого циклу біореактора. Перевага віддається робочій температурі в діапазоні $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

(i) Просвітлення первинного матеріалу

Перероблення свіжовідібраних партій культурального середовища з біореактора доцільно починати із просвітлення супернатантного розчину шляхом фільтрування.

(ii) Концентрування/діаліз первинного матеріалу

Мембрани, які в проміжках між операціями зберігають в 0,05 М розчині гідроксиду натрію, промивають водою для ін'єкцій до зниження рН приблизно до 8.

Воду замінюють зрівноважувальним буферним розчином - 0,025 М розчином фосфату натрію, рН 8. Після кондиціонування неочищений розчин г-hLN із біореактора концентрують і діалізують для видалення речовин із молекулярними масами меншими ніж 10 кДа (верхня межа пропускання мембрани 10 кДа).

Одержаний концентрат зберігають при температурі приблизно -15°C .

Іонообмінне хроматографування на ДЕАЕ-Сефарозі CL-6В (Стадія II)

На цій стадії хроматографування г-hLN проходить через колонку, де з розчину видаляється значна частка протеїнів, інших ніж г-hLN, а розчин піддають подальшому концентруванню та діалізу. Хроматографічні стадії, де продукт проходить через колонку, виконують в холодному приміщенні.

(i) Іонообмінне хроматографування на ДЕАЕ-Сефарозі CL-6В

Колонку заповнюють слабко зарядженою аніонообмінною смолою - діетиламіноетан-(ДЕАЕ)-Сефарозою, зрівноваженою на початок процесу 0,15 М розчином фосфату натрію, рН 8. Діапазон рН, якому віддається перевага, становить $8\pm 0,3$.

Потім колонку кондиціонують пропусканням буферного розчину - 0,025 М розчину фосфату натрію, рН 8. Діапазон рН, якому віддається перевага, становить $8\pm 0,3$.

Розчин г-hLN завантажують у верхню частину колонки через фільтрувальний засіб, який змонтовано на колонці як запобіжний засіб.

В колонку подають 0,025 М розчин фосфату натрію, рН 8. Діапазон рН, якому віддається перевага, становить $8\pm 0,3$. Хроматографічний процес контролюють способом УФ спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм. Головну фракцію елюату відкидають, доки поглинання на базовій лінії не перейде відмітку 5%. Незатриману (незв'язану) фракцію, що містить г-hLN, збирають, доки поглинання на базовій лінії не знизиться до 10%.

(ii) Ультрафільтрування

Пристрій для ультрафільтрування, обладнаний мембраною з верхньою межею пропускання молекулярної маси 100 кДа, яку зберігали в 0,05 М розчині гідроксиду натрію, промивають водою для ін'єкцій, доки рН промивної води (що пройшла через мембрану) не досягне приблизно 8.

Замінюють воду зрівноважувальним 0,08 М буферним розчином ацетату амонію з рН 7,5. Діапазон рН, якому віддається перевага, становить $7,5\pm 0,3$.

Розчин г-hLN, одержаний зі стадії іонообмінного хроматографування, піддають ультрафільтруванню через мембрану з верхньою межею пропускання 100 кДа і збирають фракцію, яка пройшла через мембрану.

Ультрафільтр промивають аліквотними об'ємами 0,08 М розчину ацетату амонію з рН 7,5, і всі промивні фракції додають до основної фракції, що пройшла через мембрану.

(iii) Концентрування/Діаліз

Пристрій для ультрафільтрування, обладнаний мембраною з верхньою межею пропускання молекулярної маси 10 кДа, яку зберігали в 0,05 М розчині гідроксиду натрію, промивають водою для ін'єкцій, доки рН промивної води (що пройшла через мембрану) не досягне приблизно 8. Замінюють воду зрівноважувальним 0,08 М буферним розчином ацетату амонію з рН 7,5.

Концентрують розчин г-hLN. До затриманої фракції додають 0,08 М ацетату амонію з рН 7,5 і концентрують розчин. Діаліз продовжують, доки рН та електропровідність затриманої фракції не зрівняються з відповідними показниками буферного розчину. Одержану затриману фракцію відбирають.

Іонообмінне хроматографування на Q-Сефарозі при високій швидкості потоку (Стадія III)

На цій стадії г-hLN також проходить через колонку. Стадія призначена для видалення потенціальних домішок ДНК та клітин носія або протеїнів із середовища.

(i) Зрівноважування колонки

Кондиціонування колонки виконують шляхом пропускання буферного розчину 0,08 М ацетату амонію з рН 7,5. Діапазон рН, якому віддається перевага, становить $7,5\pm 0,3$.

(ii) Очищення г-hLN на Q-Сефарозі FF

Розчин г-hLN завантажують у верхню частину колонки через фільтрувальний засіб, який змонтовано на колонці з Q-Сефарозою як запобіжний засіб.

Потім елювання продовжують 0,08 М розчином ацетату амонію з рН 7,5.

Головну фракцію елюату відкидають, доки поглинання на базовій лінії не перейде відмітку 5%.

Незв'язану фракцію, що містить г-hLN, збирають, доки поглинання на базовій лінії не знизиться до 10%.

Розчин г-hLN зі стадії III можна зберігати в замороженому стані для подальшого використання. В разі зберігання при температурі -15°C або нижче, проміжний розчин г-hLN перед РХВЕ з оберненою фазою (Стадія IV) розтоплюють при температурі $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$, як правило, протягом 24+8 год.

Перша стадія РХВЕ з оберненою фазою (Стадія TV)

На цій стадії, яку виконують при кімнатній температурі, забезпечується ефективне видалення залишкових кількостей сироватки плоду корови, домішок клітинних (CHO) протеїнів та ендотоксинів.

(i) Заповнення колонки та активація сорбенту

Колонку заповнюють широкопористим силікагелем C18. В разі використання нової партії сорбенту C18 її кондиціонують 2-пропанолом.

(ii) Зрівноважування колонки

Колонку зрівноважують 12,4%-ним (мас.) розчином 2-пропанолу в 0,05 М буферному розчині ацетату амонію, pH 7.

(iii) Регулювання pH та об'єму розчину g-hLN зі стадії III

Розчин g-hLN доводять до pH 7 із використанням концентрованої оцтової кислоти. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$.

Потім об'єм розчину g-hLN додаванням 2-пропанолу доводять до такого значення, щоб кінцева концентрація 2-пропанолу становила 12,4% (мас.)

(iv) Фільтрування відрегульованого розчину g-hLN

Фільтрувальний пристрій, обладнаний фільтром із розміром пор 0,22 мкм, промивають 12,4%-ним (мас.) розчином 2-пропанолу в 0,05 М буферному розчині ацетату амонію, pH 7. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$.

Фільтрують розчин g-hLN із відрегульованими характеристиками.

Завантажувальну посудину промивають аліквотними об'ємами 12,4%-ного (мас.) розчину 2-пропанолу в 0,05 М буферному розчині ацетату амонію, pH 7, фільтрують промивальні розчини і додають фільтрат до розчину g-hLN. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$.

(v) Очищення g-hLN на першій колонці C18 для PXBE з оберненою фазою

Розчин g-hLN завантажують у верхню частину колонки і контролюють хроматографічний процес способом УФ спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм.

В колонку подають 12,4%-ний (мас.) розчин 2-пропанолу в 0,05 М буферному розчині ацетату амонію, pH 7, доки показник поглинання на довжині хвилі 280 нм (A_{280}) не повернеться до значення, що відповідає базовій лінії. При цьому незв'язану фракцію відкидають.

Потім виконують елюювання g-hLN із використанням як рухомої фази сумішей 2-пропанолу з 0,05 М розчином ацетату амонію з лінійним градієнтом концентрації 2-пропанолу від 14,7% (мас.) до 20,7% (мас.).

Фракції g-hLN починають відбирати, коли A_{280} починає зростати. Всі фракції піка g-hLN, яким відповідають значення висоти понад 20% повної шкали приладу, збирають в один збірник.

Друга стадія PXBE з оберненою фазою (Стадія V)

На цій стадії, яку виконують при кімнатній температурі, забезпечується ефективне видалення залишкових кількостей сироватки плоду корови, домішок клітинних (CHO) протеїнів та ендотоксинів.

(i) Заповнення колонки та активація сорбенту

Колонку заповнюють широкопористим силікагелем C18. В разі використання нової партії сорбенту C18 її кондиціонують 2-пропанолом.

(ii) Зрівноважування колонки

Колонку зрівноважують 14,7%-ним (мас.) розчином 2-пропанолу в 0,5 М буферному розчині Трис-HCl, pH 7. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$.

(iii) Регулювання pH та об'єму розчину g-hLN зі стадії IV

До розчину g-hLN додають 2 М буферний розчин Трис-HCl, pH 7, для зниження концентрації 2-пропанолу приблизно до значення його концентрації у зрівноважувальному буферному розчині (14,7% (мас.)).

Розчин g-hLN доводять до pH 7 із використанням 12 М хлористоводневої кислоти. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$.

(iv) Очищення g-hLN на другій колонці C18 для PXBE з оберненою фазою

Розчин g-hLN завантажують у колонку і контролюють хроматографічний процес способом УФ спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм.

В колонку подають 14,7%-ний (мас.) розчин 2-пропанолу в 0,5 М буферному розчині Трис-HCl, pH 7. Діапазон pH, якому віддається перевага, становить $7 \pm 0,2$. Незв'язану фракцію відкидають.

Потім виконують елюювання g-hLN із використанням як рухомої фази сумішей 2-пропанолу з 0,5 М розчином Трис-HCl з лінійним градієнтом концентрації 2-пропанолу від 14,7% (мас.) до 20,7% (мас.).

Фракції g-hLN починають відбирати, коли A_{280} починає зростати. Всі фракції піка g-hLN, яким відповідають значення висоти понад 20% повної шкали приладу, збирають в один приймач.

(v) Діаліз

Розчин g-hLN із другої стадії PXBE з оберненою фазою розбавляють водою для ін'єкцій (ВДІ). Перевага віддається використанню 8 об'ємів ВДІ.

Розбавлений розчин g-hLN діалізують шляхом ультрафільтрування через мембрану з верхньою межею пропускання 10 кДа (дивись Таблицю 1, стадія VI) проти ВДІ. Потім додають аліквотні частки 0,5 М розчину бікарбонату амонію, pH 8, і продовжують діаліз до досягнення показників буферного розчину бікарбонату амонію.

Затриманий на мембрані розчин концентрують до кінцевого об'єму приблизно 1 л і відбирають. Ультрафільтр промивають 0,5 М розчином бікарбонату амонію, pH 8, і промивний розчин додають до затриманого розчину і факультативно піддають подальшому концентруванню. Це подальше концентрування залежить від розміру колонки, яку використовують на наступній стадії, тобто на Стадії VI.

Гель-проникне хроматографування на сорбенті Сефакрил S100 HR та рпльтрафільтрування (Стадія VI)

На цій стадії здійснюють розділення за розміром молекул та ультрафільтрування розчину. Усі операції на цій стадії виконують при температурі приблизно $+5^{\circ}\text{C}$. Температурний діапазон, якому віддається перевага, становить $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

(i) Гель-проникне хроматографування на сорбенті Сефакрил S100 HR

Колонку заповнюють сорбентом Сефакрил S100 HR і зрівноважують спочатку водою для ін'єкцій.

Потім колонку зрівноважують 0,5 М розчином бікарбонату амонію, pH 8.

В колонку подають 0,5 М розчин бікарбонату амонію, pH 8. Контролюють хроматографічний процес способом УФ спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм.

Фракції g-hLN починають відбирати, коли A_{280} починає зростати. Всі фракції піка g-hLN, яким відповідають значення висоти понад 20% повної шкали приладу, збирають в один приймач.

Розчин g-hLN, елюований з колонки із сорбентом Сефакрил S100 HR, потім у варіанті, якому віддається перевага, пропускають через фільтр, наприклад, Virosolve™, для видалення вірусних

забруднювачів.

(ii) Діаліз та концентрування r-hLN

Мембрани (ультрафільтрувальні мембрани з верхньою межею пропускання молекулярної маси 10 кДа), які у проміжках між операціями очищення зберігають в 0,05 М розчині гідроксиду натрію, промивають водою для ін'єкцій, доки рН не досягне приблизно 8.

Розбавлений розчин r-hLN діалізують проти ВДІ на ультрафільтрувальних мембранах із верхньою межею пропускання 10 кДа. Потім додають аліквотні частки 0,01 М розчину натрій-фосфатного буферу, рН 8, і продовжують діаліз до досягнення показників буферного розчину.

Затриманий на мембрані розчин в разі необхідності концентрують до кінцевого об'єму приблизно 500 мл і відбирають. Ультрафільтр промивають 0,01 М розчином натрій-фосфатного буферу, рН 8, і промивний розчин додають до затриманого розчину.

Залежно від обраних умов зберігання, можливе виконання факультативної стадії додаткового концентрування LH.

Розчин r-hLN фільтрують і збирають фільтрат у стерильний посуд.

Очищений нефасований розчин r-hLN у варіанті, якому віддається перевага, зберігається в стерильних пляшках при температурі приблизно -15°C.

Реагенти, буферні розчини, елюенти та реактиви

Хроматографічні сорбенти

В процесі очищення на цей час використовуються хроматографічні сорбенти, перелічені нижче. При очищенні можуть використовуватися також їх еквіваленти.

Стадія II: ДЕАЕ-Сефароза CL-6B (DEAE-Sepharose CL-6B) (фірма Pharmacia)

Стадія III: Q-Сефароза для великої швидкості потоку (Q-Sepharose Fast Flow) (фірма Pharmacia)

Стадія IV: Силікагель C18 для PXBE з оберненою фазою (C18 Silica RP-HPLC) (фірма Waters)

Стадія V: Силікагель C18 для PXBE з оберненою фазою (C18 Silica RP-HPLC) (фірма Waters)

Стадія VI: Сефакрил S 100 HR (Sephacryl S 100 HR) (фірма Pharmacia)

Постачальники:

Pharmacia - Amersham Pharmacia Biotech, Bjorkgatan 30, S-751 84, Uppsala, Sweden.

Waters - Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757, USA

Результати

Біологічна активність

Біологічна активність різних партій r-hLN після очищення за способом цього винаходу відображена в Таблиці 2. Концентрацію протеїну (1 мг протеїну LH на 1 мл) визначали спектрофотометричним методом на довжині хвилі 276,5 нм із використанням значення коефіцієнта поглинання $a=0,812$, визначеного на основі аналізу амінокислотної послідовності.

Середня питома активність препаратів r-LH має особливо високе значення і досягає приблизно 25000 МО/мг (протеїну LH).

Таблиця 2

Питома активність партій r-hLN

№ партії	Питома активність (МО/мг)
BLCA 9802	28173
BLCA 9803	25819
BLCA 9804	27472
BLCA 9805	31229
BLCA 9806	26995
BLCA 9808	26279
BLCA 9809	20522
BLCA 9810	22275
BLCA 9811	27642
BLCA 9812	29941
BLCA 9813	28345
BLCA 9814	27581
BLCA 9815	24541

Композиції

Розроблено ліофілізовані композиції на основі рекомбінантного r-hLN високої чистоти, очищеного способом за цим винаходом.

Як типовий приклад нижче описана ліофілізована композиція з ефективністю 75 МО, приготована у флаконах за стандартом DIN 2R із використанням сахарози як наповнювача (Таблиця 3), яка залишалася стабільною при зберіганні при 4°C протягом кількох місяців.

Таблиця 3

Назва інгредієнта	Кількість на одиницю
Активний інгредієнт Рекомбінантний LH людини	3,4 мкг (75 МО)
Інші інгредієнти Сахароза	47,75 мг

Твін20	0,05 мг
Вторинний кислий фосфат натрію (дигідрат)	0,825 мг
Первинний кислий фосфат натрію (моногідрат)	0,052 мг