PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-4356**
(22) Přihlášeno: **27.06.1997**
(30) Právo přednosti: **01.07.1996 US 1996/673064**
(40) Zveřejněno: **12.05.1999**
(Věstník č. 5/1999)
(47) Uděleno: **10.04.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **20.05.2009**
(Věstník č. 20/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/US1997/011256**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/000154**

(11) Číslo dokumentu:
300 452
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 097 274; US 4 629 567; EP 698 615; US 4 056 614; US 4 656 254; JP 63017899; EP 288 841.

(73) Majitel patentu:
ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION, Los Angeles, CA, US

(72) Původce:
Hwang Duk Sung, South Pasadena, CA, US
Nario Evelyn, Chino Hills, CA, US
Lepe Mark, West Covina, CA, US
Luz Lyndon, Huntington Park, CA, US
Ito Hirokazu, Arcadia, CA, US
Takechi Kazuo, Arcadia, CA, US

(74) Zástupce:
JUDr. Petr Kalenský, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:
Způsob čištění inhibitoru alfa-1-proteinasy

(57) Anotace:
Způsob čištění inhibitoru α-1 proteinasy, neboli α-1-PI, zahrnuje následující stupně: opatření znečištěné proteinové frakce obsahující α-1-PI; suspendaci uvedené znečištěné proteinové frakce, která obsahuje α-1-PI, ve vodném roztoku při pH 6 ± 0,2 po dobu, která postačuje k tomu, aby došlo k rozpuštění rozpustných proteinů; filtraci supenze a izolaci nerozpustných proteinů; resuspendaci nerozpustného proteinu ve vodném roztoku při pH 8,5 ± 0,5; přidání PEG k resuspendovanému nerozpustnému proteinu za účelem vysrážení α-2-globulinu; izolaci supernatantu po srážení pomocí PEG, přičemž tento supernatant obsahuje α-1-PI; přidání $ZnCl_2$ k supematantu za účelem vysrážení surového α-1-PI; izolaci surového α-1-PI; rozpuštění izolovaného surového α-1-PI; nanesení rozpuštěného surového α-1-PI na médium pro výměnu aniontů; a izolaci frakce obsahující přečištěný α-1-PI z média pro výměnu aniontů.

CZ 300452 B6

Způsob čištění inhibitoru α–1–proteinasy

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu čištění inhibitoru α–1–proteinasy, který zahrnuje jedinečnou kombinaci stupňů čištění umožňující dosažení vysokého výtěžku a vysoké specifické aktivity α–1–PI.

Dosavadní stav techniky

Inhibitor α–1–proteinasy (zde též α–1–PI), známý rovněž, jako α–antitrypsin, je sérový glykoprotein o molekulové hmotnosti 52 000. Tato látka je syntetizována v játrech a je obsažena v séru v množstvích mezi 150 až 350 mg/dl (což je 30 až 80μM ekvivalentem) stanoveno pomocí testování plazmovými standardy.

α–1–PI působí v plicích za účelem inhibice neutrofilní elastasy, serinproteasy, jejíž přítomnost ve velkých množstvích může vést k destrukci alveolárních stěn. V normálních plicích zajišťuje α–1–PI více než 90 % anti–neutrofilní ochrany elastasy v nižším dýchacím traktu.

Nedostatek α–1–PI je autosomální, recesivní dědičná porucha, která se projevuje celou řadou allelických variant a která je charakteristická allelickým uspořádáním označovaným jako proteasový inhibiční systém (Pi). Tyto allely jsou seskupeny na bázi hladin α–1–PI, které jsou dosahovány v séru různých jedinců. Normální jedinci mají normální sérovou hladinu α–1–PI (normální jedinci se označují jako jedinci s PiMM fenotypem). Deficientní jednotlivci mají sérovou hladinu α–1–PI nižší než odpovídá 35 % průměrné normální hladiny (tito jedinci se označují jako jedinci s PiZZ fenotypem). Nuloví jedinci mají nedetekovatelný obsah α–1–PI proteinu v séru (tito jedinci se označují jako jedinci s Pi(nula)(nula) fenotypem].

Nedostatek α–1–PI je charakterizován nízkými hladinami α–1–PI v séru (méně než 35 % průměrné normální hladiny) a v plicích. Tito deficientní jedinci jsou vystaveni vysokému riziku vývoje panacinárního emfyzému. Tento emfyzém převládá u jedinců s fenotypy PiZZ, PiZ(nula) a PiZ(nula)(nula). Symptomy tohoto stavu se obvykle projeví u postižených jedinců v třetí nebo čtvrté dekádě jejich života.

Emfyzém spojený s nedostatkem α–1–PI se rozvíjí v důsledku koncentrací α–1–PI v nižších částech dýchacího traktu, které jsou nedostatečné pro inhibici neutrofilní elastasy, což vede k destrukci pletiva pojivové tkáně plicního parenchymu. Jedinci s nedostatkem α–1–PI jsou málo chráněni proti neutrofilní elastase, uvolňované neutrofily v nižší části dýchacího traktu. Tato nerovnováha proteasa:inhibitor proteasy u jedinců s nedostatkem α–1–PI se projeví chronickým poškozováním a posléze i destrukcí plicního parenchymu a alveolárních stěn.

Jedinci s vážným nedostatkem α–1–PI se vyznačují typicky endogenními sérovými hladinami α–1–PI pod 50 mg/dl, dle stanovení standardizovanými postupy. U jedinců s tak nízkými sérovými hladinami α–1–PI existuje více než 80% riziko, že se u nich během života vyvine emfyzém. Odhaduje se, že alespoň u 40 000 pacientů v USA, neboli u 2 % ze všech pacientů trpících emfyzémem, je toto onemocnění výsledkem poškození genu kódujícího α–1–PI. Nedostatek α–1–PI představuje jednu z nejběžnějších dědičných smrtelných poruch u bělochů žijících ve Spojených státech a v Evropě.

Léčení pacientů s nedostatkem α–1–PI je zaměřeno na náhradu nebo zvýšení hladiny α–1–PI v séru. Očekává se, že zvýší-li se hladina α–1–PI v séru, zvýší se v důsledku jeho koncentrace

v plicích, čímž se upraví nerovnováha neutrofilní elastasa:α–1–PI v plicích a zabrání se destrukci plicní tkáně, nebo se tento pochod zpomalí. Studie normální a α–1–PI deficientní populace vedly k vyslovení názoru, že minimální ochranná hladina α–1–PI v séru odpovídá 80 mg/dl nebo 11 μM (přibližně 57 mg/dl; při použití čistých standardů). V důsledku toho je většina terapií α–1–PI–deficientních pacientů zaměřena na zajištění minimální ochranné hladiny α–1–PI v séru, protože sérový α–1–PI je zdrojem alveolárního α–1–PI.

Přípravky s obsahem α–1–PI pro terapeutické použití jsou dostupné od 80. let 20. století. Hlavní využití nacházejí při terapii spočívající ve zvýšení (náhradě) vrozeného nedostatku α–1–PI. Poločas lidského α–1–PI in vivo odpovídá 4,38 dne se standardní odchylkou 1,27 dne. V současnosti doporučovaná dávka 60 mg α–1–PI/kg tělesné hmotnosti týdně upraví nízkou hladinu α–1–PI v séru na hladinu překračující minimální ochrannou hladinu 11μM nebo 80 mg/dl.

Dříve byl α–1–PI čištěn různými způsoby. Jeden z těchto způsobů kombinuje chromatografii na aniontově–výměnném chromatografickém médiu s následným srážením pomocí PEG. Jiné způsoby čistění využívají srážení pomocí PEG s následnou aniontově–výměnnou chromatografií, nebo několikanásobné srážení pomocí PEG a následnou aniontově–výměnnou chromatografií. Dále byly použity kombinace srážení pomocí PEG, jednoho či více stupňů aniontově–výměnné chromatografie a stupně chromatografie na bázi chelátů kovů.

Další způsoby využívají pro čištění α–1–PI techniku dělení fází. Pro přečištění α–1–PI se uvádí specifické aktivity 1,26 jedn./mg.

Podstata vynálezu

Předmětný vynález se týká zlepšeného způsobu čištění α–1–PI. Uvedený způsob zahrnuje opatření znečištěné proteinové frakce, s výhodou pastové Cohnovy frakce $IV_1 + IV_4$, jež obsahuje α–1–PI. Tato znečištěná proteinová frakce se suspenduje ve studené vodě nebo v solném roztoku při pH přibližně 6, aby došlo k rozpuštění rozpustných proteinů, včetně albuminu, α–2–globulinu (α–2–makroglobulinu a hatoglobulin) a β–globulinu (transferrinu). Suspenze se poté filtruje, čímž se získají nerozpustné proteiny včetně α–1–PI, které se promyjí vodou (nebo solným roztokem). Frakce promytých nerozpustných proteinů se znovu suspenduje ve vodě (nebo v solném roztoku), hodnota pH se upraví na přibližně 8,5 a přidáním PEG se vysráží α–2–globulin. Supernatant se odlije a přidáním chloridu zinečnatého se vysráží surový α–1–PI. Tato surová látka se znovu rozpustí v NaEDTA pufru a viry se deaktivují přidáním činidla Tween 80 a tri–n–butylfosfátu (TNBP). S výhodou se přidá některý ze sacharidů, jako je sacharosa, maltosa, glukosa apod., aby se stabilizoval α–1–PI v průběhu uvedené deaktivace virů a zvýšil se tak jeho výtěžek.

Takto zpracovaný roztok se nanese na aniontově–výměnné médium za účelem oddělení α–1–PI od dalších zbývajících proteinů. Frakce obsahující α–1–PI se oddělí a výhodně se k nim přidá bentonit, aby se tak odstranily jakékoli apolipoproteiny, které jsou v této frakci přítomné. Vzniklý přečištěný roztok α–1–PI se izoluje a zahustí.

Tímto způsobem přečištěný α–1–PI má specifickou aktivitu větší než 1,0 jedn./OD_{280}. Tímto postupem lze dosáhnout výtěžku více než přibližně 1,0 jedn./g pasty, s výhodou pak více než přibližně 1,3 jedn./g pasty.

Použitím způsobu podle tohoto vynálezu se zlepší kvalita i výtěžek α–1–PI. Dále se tímto způsobem zkrátí doba čistění ve srovnání s jinými způsoby.

Způsob podle tohoto vynálezu zahrnuje jedinečnou kombinaci stupňů čistění, kterou se dosáhne vysokého výtěžku a vysoké specifické aktivity α–1–PI.

Čistění α–1–PI vychází ze znečištěné proteinové frakce. Touto znečištěnou proteinovou frakcí může být plazma, dále α–1–PI získaný rekombinantními metodami nebo jakýkoli jiný zdroj obsahující α–1–PI protein. Ve výhodném provedení je znečištěnou proteinovou frakcí pastová Cohnova frakce $IV_1 + IV_4$, jejíž příprava je v daném oboru velmi dobře známa.

Výchozí zpracování pastové frakce $IV_1 + IV_4$

Pastová frakce $IV_1 + IV_4$ (nebo jiná znečištěná proteinová frakce) se suspenduje v 5 ± 2 dílech vody nebo solného roztoku, tj. od přibližně 0,05 do přibližně 0,15 M chloridu sodného na 1 díl frakce, tedy $IV_1 + IV_4$) při teplotě nižší než přibližně 15 °C a pH přibližně 6,0 ± 0,2, a to alespoň přibližně jednu hodinu. Rozpustné proteiny, včetně albuminu, α–2–globulinu a β–globulinu, se poté oddělí od nerozpustných proteinů, včetně inhibitoru α–1–proteinasy, a to pomocí filtračního lisu, odstředění apod. Zbytek se promyje při teplotě nižší než 15 °C vodou nebo solným roztokem při pH 6 ± 0,2, čímž se odstraní jakýkoli další rozpustný protein zachycený fyzicky v nerozpustné pastě, přičemž objem vody nebo solného roztoku použitého k promývání činí přibližně pětinásobek původního objemu pasty.

Bylo zjištěno, že suspendováním pastové frakce $IV_1 + IV_4$ ve vodě nebo solném roztoku při pH 6,0 ± 0,2 s následným promýváním se odstraní téměř veškerý albumin a vysráží se většina α–2– a β–proteinů z frakcí $IV_1 + IV_4$.

Srážení s použitím PEG

Nerozpustný proteinový zbytek se znovu suspenduje v přibližně 5 ± 2 objemech vody na objem zbytku, při pH 8,5 ± 0,5, a to při teplotě přibližně 15 ± 5 °C, výhodně po dobu přibližně 6 hodin, ačkoliv se mohou využít kratší či delší časy. Kratší doby nejsou výhodné, protože výtěžek se s prodlužující se dobou suspendace zvyšuje. Jako optimální kombinace doby suspendace a výtěžku se v současnosti jeví doba 6 hodin. Poté se přidá pevný Tris do konečné 10 ± 5μM koncentrace, pevný chlorid sodný do konečné 150 ± 20mM koncentrace a hodnota pH se upraví na 8,0. Následně se přidá polyethylenglykol 3350 (PEG) do konečné koncentrace 15 ± 5 % hmotn. a reakční směs se míchá přibližně hodinu při teplotě 15 ± 5 °C. PEG se přidává za účelem α–2–globulinu.

Sraženina, jež se vyloučí po přidání PEG, se odstraní pomocí filtračního lisu. Filtrační lis se promyje před filtrací i po filtraci roztokem obsahujícím 150 ± 25 mM chloridu sodného a 5 % hmotn. PEG, při pH 8,0 ± 0,5. Alternativně lze sraženinu odstranit odstředěním.

Srážení chloridem zinečnatým

K PEG supernatantu se přidá chlorid zinečnatý (100 ± 10mM) až do konečné 6 ± 5mM koncentrace a pH roztoku se upraví na 7,5 ± 0,5. Roztok se ochladí na teplotu 5 ± 5 °C a míchá se nejméně hodinu. Chlorid zinečnatý vysráží surový α–1–PI. Surový α–1–PI se oddělí filtrací, s výhodou použitím filtrace Prostak®, jak je popsána například v publikaci „Prostak Open–Channel Modules“, Millipore Corporation, jejíž obsah je zde zahrnut formou odkazu, nebo odstředěním a filtrát se odstraní. Koncentrovanou suspenzi nebo sraženinu lze pro další upotřebení zmrazit.

Deaktivace virů zpracováním bez použití rozpouštědla

Surový α–1–PI se znovu rozpustí v přibližně 50 mM roztoku NaEDTA s použitím filtrace Prostak a recirkulace. Přidá se sacharid, s výhodou sacharosa, a to v množství přibližně 15 ± 5 % hmotn. (nebo přibližně 0,25 ± 0,05 citranu sodného), které slouží jako stabilizátor během deaktivace viru. Roztok se míchá při teplotě 15 ± 5 °C, dokud se sacharosa nerozpustí.

Roztok obsahující α–1–PI se z hlediska viru deaktivuje přidáním rozpouštědla–detergentu. K roztoku α–1–PI se přidá roztok 10 ± 1 % hmotn./obj. polysorbátu 80 a 3 ± 0,3 % hmotn. tri–n–butylfosfátu, a to až do konečné koncentrace 1,0 ± 0,5 % hmotn./obj. polysorbátu–80 a 0,3 ± 0,15 % hmotn. tri–n–butylfosfátu. Poté se roztok inkubuje při teplotě 27 ± 3 °C, pH 8 ± 0,5 po dobu nejméně 6 hodin, čímž se deaktivují jakékoli viry, které mohou být přítomné v α–1–PI.

Bylo zjištěno, že přítomnost sacharidu, například sacharosy, jakožto stabilizátoru během deaktivace viru pomocí přídavku rozpouštědla–detergentu zvyšuje výtěžek α–1–PI v jednotkách ve srovnání s kontrolním pokusem, tj. s deaktivací viru v roztoku α–1–PI přídavkem rozpouštědla–detergentu bez použití sacharidu jakožto stabilizátoru. Zvýšení výtěžku činí s výhodou nejméně 10 %, s výhodou nejméně 20 % a nejvýhodněji nejméně 30 %.

Po inkubaci se ošetřený roztok α–1–PI ochladí na 0 až –10 °C, pH se potom upraví na 8,0 ± 0,1.

Aniontově–výměnná chromatografie

Upravený roztok se zředí přibližně jedním objemem vody na objem upraveného roztoku. Zředěný roztok se dále nanese na předem ekvilibrované chromatografické médium QAE nebo na jiné podobné médium pro výměnu aniontů, jež váže α–1–PI, což umožňuje oddělení této látky od jiných proteinů. Lze použít buď vsádkovou chromatografii, nebo sloupcovou chromatografii. Jakmile se α–1–PI absorbuje na médium, promyje se toto pufrem obsahujícím 20 ± 10 mM chloridu sodného a 20 ± 10 mM dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) při pH 8 ± 1, čímž se odstraní nenavázané podíly, včetně β–proteinů. Poté se z chromatografického média pro výměnu aniontů vymyje α–1–PI, a to elucí promývací kapalinou, která obsahuje 100 ± 50 mM chloridu sodného a 20 ± 10 mM fosforečnanu sodného, při pH 8 ± 1. Eluát obsahující α–1–PI se jímá pro další zpracovávání.

Po odstranění α–1–PI se médium pro výměnu aniontů vyčistí postupným promytím následujícími složkami: vodným roztokem obsahujícím 2 ± 0,2 mM chloridu sodného a 20 ± 10 mM fosforečnanu sodného, pH 8 ± 1; vodou pro injekce (WFI); vodným roztokem obsahujícím 500 mM hydroxidu sodného; a potom znovu WFI. Chromatografické médium se potom uchovává v roztoku obsahujícím 2 ± 0,2 M roztoku chloridu sodného, 20 ± 10 mM roztoku fosforečnanu sodného, pH 8 ± 1.

Zpracovávání eluátu s obsahem α–1–PI

Eluát obsahující α–1–PI se spojí a přidá se k němu 0,1 až 1,0 % (hmotn./hmotn.) bentonitu, a to na přibližně 1 hodinu, čímž se sníží množství apolipoproteinů na méně než přibližně 0,01 mg/ml apolipoproteinu A a na méně než přibližně 0,01 mg/ml apolipoproteinu B. Bentonit se odfiltruje, s výhodou použitím filtrace Cuno®, například tak, jak je popsáno v publikaci „Zeta Plus C Series Filter Medium“, Cuno Inc., jejíž obsah je formou odkazu zahrnut v tomto textu. Získaný roztok se zahušťuje pomocí ultrafiltrační membrány dokud aktivita α–1–PI není alespoň 10 jedn./ml. Koncentrovaný produkt se dále filtruje přes filtr s póry o velikosti 0,45 μm, čímž se odstraní jakýkoli částicovitý materiál. α–1–PI se filtruje technologie „Planova“, čímž se odstraní virus, sterilně se filtruje přes filtr s póry o velikosti 0,22 μm, filtrát se rozdělí do lékovek a pro uskladnění se lyofilizuje. α–1–PI se skladuje při teplotě 2 ± 8 °C.

Lyofilizovaný α–1–PI se může znovu rozpustit ve sterilní vodě za účelem podání pacientovi.

Testy aktivity α–1–PI

Chromogenní test se může využít k detekci α–1–PI aktivity rekonstituovaného α–1–PI. Test využívá trypsin–sensitivní chromogenní substrát, ze kterého se v přítomnosti trypsinu uvolňuje p–

nitroanilin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Uvolněný p–nitroanilin se detekuje při vlnové délce 405 nm. α–1–PI inhibuje uvolňování p–nitroanilinu ze substrátu. Aktivita α–1–PI v produktu se stanoví porovnáním s kalibrační křivkou aktivity α–1–PI. Při chromogenním testu rekonstituovaného lyofilizovaného α–1–PI, připraveného výše popsaným způsobem, je vykazována specifická aktivita alespoň přibližně 1,0 jedn./OD_{280}.

Podávání

Pacientovi lze podávat α–1–PI infuzemi rychlostí přibližně 0,08 ml/kg tělesné hmotnosti za minutu po dobu prvních 10 minut. Pokud si pacient na nic nestěžuje, lze rychlost podávání zvýšit na tolerovanou míru. Pokud je toto podávání tolerováno, lze následné infuze témuž pacientovi podávat zvýšenou rychlostí. Dojde-li k opaku, sníží se rychlost podávání nebo se infuze přeruší do vymizení symptomů. Poté lze infuzi obnovit, a to rychlostí, jež je pacientem tolerována. Mají-li se podávat vysoké dávky, pak lze několik ampulí α–1–PI spojit s použitím aseptické techniky do prázdného, sterilního i.v. infuzního zásobníku.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

600 g pastové frakce IV_1 + IV_4 z Cohnova frakcionačního schématu se suspenduje při teplotě 5 °C a pH 6,0 v 1800 ml vody, bez jakékoli titrace po dobu jedné hodiny. Po skončení suspendace se suspenze filtruje při tlaku 10 CP přes filtr (Cuno). Filtrát se izoluje, testuje a změří se specifická aktivita (S. A.) α–1–PI (A1PI) a optická hustota při 280 nm (OD_{280}). Pasta zbylá ve filtračním lisu se promyje 600 ml vody o teplotě 5 °C, filtrát se jímá a tento postup se opakuje čtyřikrát. Všechny filtráty se spojí, testují a měří se specifická aktivita (S. A.) a optická hustota (OD_{280nm}). Hmotnost výsledné pasty: 350 g. Specifická aktivita a optická hustota vzorků získaných tímto postupem je popsána v následující tabulce I.

Tabulka 1

Aktivita A1PI a O.D. 280 nm frakcí vymytých vodou

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	O.D. 280 nm	S.A. (jedn./OD)
Promytí 0	1450	0,06	87	22,2	0,003
Promytí 1	600	0,1	60	29,9	0,003
Promytí 2	600	0,08	48	25,5	0,003
Promytí 3	600	0,04	24	13,0	0,003
Promytí 4	600	0	0	4,8	0
Promytí 5	600	0	0	3,0	0

Příklad 2

350 g výsledné pasty z příkladu 1 se resuspenduje v 1050 ml vody při pH 8,5 a teplotě 18 °C po dobu 6 hodin. Přidá se pevný Tris do koncové 10mM koncentrace a pevný chlorid sodný do koncové 150mM koncentrace, pH se upraví na hodnotu 8,0. Dále se přidá polyethylenglykol (PEG 3350) do koncové koncentrace 15 % (hmotn.) a výsledná směs se míchá jednu hodinu při 18 °C. Vzniklá sraženina se odstraní pomocí filtračního lisu s 10 CP filtrem, čímž se získá supernatant. Pasta ve filtračním lisu se následně promývá roztokem s obsahem 15 % (hmotn.) polyethylenglykolu PEG–3350, 10 mM Tris a 150 mM chloridu sodného. Filtrát a filtrát z následného promývání se spojí. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2

PEG–3350 srážení

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	O.D. 280 nm	S.A. (jedn./OD)
Resusp.	1400	1,063	1488	13,32	0,0798
PEG-filtrát	2465	0,513	1265	2,16	0,2375

Příklad 3

K získanému filtrátu PEG–3350 z příkladu 2 se přidává chlorid zinečnatý do koncové 2mM koncentrace, hodnota pH se upraví na 7,5 a teplota se sníží na 5 °C, čímž dojde k vysrážení surového A1PI. Po jedné hodině míchání se surový A1PI odfiltruje pomocí filtrace Prostak a získaná suspenze se znovu rozpustí v roztoku NaEDTA. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Srážení chloridem zinečnatým

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	O.D. 280 nm	S.A. (jedn./OD)
Prostak filtrát	2200	0,0159	35	0,15	0,106
NaEDTA resusp.	264	4,305	1065	13,72	0,3138

Příklad 4

Sacharosa v množství 16,7 % (hmotn.) se přidá k rekonstituovanému NaEDTA roztoku z příkladu 3 a výsledná směs se míchá při teplotě 18 °C až do úplného rozpuštění sacharosy. K tomuto roztoku se přidá polysorbát–80 do konečné koncentrace 1,0 % a tri–n–butylfosfát do konečné koncentrace 0,3 %. Roztok se dále inkubuje při teplotě 27,5 °C po dobu alespoň 6 hodin, aby došlo k deaktivaci možného kontaminujícího lipidem obaleného viru. Po skončení inkubace se roztok ochladí na 5 °C a hodnota pH se upraví na 8,0. Pro kontrolu se výše uvedený postup opakuje bez přidání sacharosy. Stabilita A1PI během působení rozpouštědla–detergentu (SD) v přítomnosti 16,7 % sacharosy a bez sacharosy (kontrolní pokus) je vyjádřena v následující tabulce 4.

Tabulka 4

Stabilita A1PI během úpravy pomocí rozpouštědla–detergentu v přítomnosti sacharosy

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	% A1PI z NaEDTA
SD-A1PI	311	3,35	1042	97,8
Kontrola	293	2,13	624	58,6

Příklad 5

K získanému SD A1PI roztoku z příkladu 4 se přidá 311 g destilované vody, aby se snížila iontová síla před nanesením na QAE kolonu. Roztok se nanese na 300 ml předem ekvilibrované QAE kolony pro výměnu iontů s průtokem 12 ml/min. Kolona se promyje s použitím 6 ml solného fosfátového pufru (20mM NaCl, 20mM NaH_2PO_4, pH 8,0). Dále se A1PI eluuje pomocí 1,8 l solného fosfátového pufru (100mM chlorid sodný, 20mM NaH_2PO_4, pH 8,0).

Iontoměničové médium se postupně promyje: 2M NaCl, 20mM NaH_2PO_4, pH 8,0, 500mM NaOH a destilovanou vodou. Chromatografické médium se uchovává v 2M roztoku chloridu sodného, 20mM NaH_2PO_4, pH 8,0. Spojené frakce s obsahem A1PI se testují a výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 5.

Tabulka 5

QAE–iontová chromatografie

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	O.D. 280 nm	S.A. (jedn./OD)
Eluát	1500	0,62	930	0,58	1,058

Příklad 6

Ke spojenému eluátu z příkladu 5 se přidají 3,0 g depyrogenovaného bentonitu a vzniklá směs se míchá jednu hodinu při 20 °C. Bentonit se odstraní filtrací (Cuno). Filtrát se zahustí ultrafiltrací. Koncentrát se filtruje (Planova) a dále se sterilně filtruje v sériích. Filtrát se rozdělí do lékovek a lyofilizuje se za účelem skladování. Všechny procesní vzorky byly testovány a výsledky jsou shrnuty v tabulce 6:

Tabulka 6

Vzorek	Objem (ml)	A1PI (jedn./ml)	Celkový A1PI (jedn.)	O. D. 280 nm	S. A. (jedn./OD)
Filtrát (Cuno)	1710	0,52	885	0,385	1,351
Koncentrát	75	11,6	870	8,092	1,434
Konečný vzorek	92	0,4	865	6,225	1,510

Vynález není jakkoli omezen na popsané konkrétní příklady provedení. Odborníkovi je zřejmé, že ve výše popsaných výhodných provedeních lze provést změny materiálů, stupňů a procesních parametrů, aniž by došlo k vybočení z rozsahu tohoto vynálezu. V souladu s tím není rozsah předmětného vynálezu omezen na výše popsané příklady. Naopak, rozsah vynálezu je definován následujícími patentovými nároky.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob čištění inhibitoru α–1–proteinasy, neboli α–1–PI, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující stupně:

- opatření znečištěné proteinové frakce obsahující α–1–PI;
- suspendaci uvedené znečištěné proteinové frakce, která obsahuje α–1–PI, ve vodném roztoku při pH 6 ± 0,2 po dobu, která postačuje k tomu, aby došlo k rozpuštění rozpustných proteinů;
- filtraci suspenze a izolaci nerozpustných proteinů;
- resuspendaci nerozpustného proteinu ve vodném roztoku při pH 8,5 ± 0,5;
- přidání PEG k resuspendovanému nerozpustnému proteinu za účelem vysrážení α–2–globulinu;
- izolaci supernatantu po srážení pomocí PEG, přičemž tento supernatant obsahuje α–1–PI;
- přidání $ZnCl_2$ k supernatantu za účelem vysrážení surového α–1–PI;
- izolaci surového α–1–PI;
- rozpuštění izolovaného surového α–1–PI;
- nanesení rozpuštěného surového α–1–PI na médium pro výměnu aniontů; a
- izolaci frakce obsahující přečištěný α–1–PI z média pro výměnu aniontů.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedená znečištěná proteinová frakce obsahující α–1–PI se suspenduje ve 3 až 7 objemech vodného roztoku na každý díl znečištěné proteinové frakce obsahující α–1–PI.

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že uvedený vodný roztok jak při suspendaci, tak při resuspendaci je vybraný ze souboru sestávajícího z vody a roztoků obsahujících NaCl v koncentraci od 0,05 do 0,15M.

4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že PEG se přidává do dosažení koncentrace 10 až 20 % hmotn.

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že pH supernatantu ze srážení pomocí PEG se upraví na hodnotu 7,5 ± 0,5.

6. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že $ZnCl_2$ se přidává do dosažení 1 až 11mM koncentrace.

7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje úpravu surového α–1–PI izolovaného po srážení pomocí $ZnCl_2$ za účelem deaktivace jakýchkoli virových kontaminantů.

8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že na uvedený surový α–1–PI se působí rozpouštědlem a detergentem.

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že na uvedený surový α–1–PI se působí tri–n–butylfosfátem a polysorbátem 80.

10. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že na uvedený surový α–1–PI se působí tri–n–butylfosfátem o koncentraci 0,15 až 0,45 g/100 ml roztoku a polysorbátem 80 o koncentraci 0,5 až 1,5 g/100 ml roztoku.

11. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje přidávání bentonitu k eluentu, jenž obsahuje inhibitor α–1–proteinasy.

12. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že přečištěný α–1–PI má specifickou aktivitu ve výši 1,0 jednotka/OD_{280}.

13. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že výtěžek α–1–PI je alespoň 1 jednotka na gram pasty obsahující frakci $IV_1 + IV_4$.

14. Způsob čištění α–1–PI podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující stupně:

- opatření znečištěné proteinové frakce obsahující α–1–PI;
- suspendaci uvedené znečištěné proteinové frakce, která obsahuje α–1–PI, ve vodném roztoku při pH 6 ± 0,2 po dobu, která postačuje k tomu, aby došlo k rozpuštění rozpustných proteinů;
- filtraci suspenze a izolaci nerozpustných proteinů, které obsahují α–1–PI;
- resuspendaci proteinů ve vodném roztoku při pH 8,5 ± 0,5;
- přidávání PEG k vodnému roztoku obsahujícímu resuspendovaný nerozpustný protein do dosažení koncentrace 10 až 20 % hmotn., a to za účelem vysrážení α–2–globulinu;
- izolaci supernatantu po srážení pomocí PEG, přičemž tento supernatant obsahuje α–1–PI;
- úpravu pH uvedeného supernatantu na hodnotu 7,5 ± 0,5;

- přidání $ZnCl_2$ k supernatantu za účelem vysrážení surového α–1–PI;
- izolaci surového α–1–PI pomocí filtrace Prostak a opětovné rozpuštění surového α–1–PI ve vodném roztoku;
- působení rozpouštědla a detergentu na rozpuštěný α–1–PI za účelem deaktivace jakýchkoli virových kontaminantů;
- nanesení surového α–1–PI upraveného rozpouštědlem a detergentem na médium pro výměnu aniontů;
- izolaci frakce obsahující přečištěný α–1–PI z média pro výměnu aniontů;
- přidání bentonitu k uvedené frakci obsahující přečištěný α–1–PI za účelem adsorpce apolipoproteinu; a
- izolaci roztoku obsahujícího α–1–PI.

15. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje úpravu izolované frakce, která zahrnuje ultrafiltraci roztoku obsahujícího přečištěný α–1–PI.

16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje lyofilizaci ultrafiltrovaného roztoku obsahujícího přečištěný α–1–PI.

17. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že přečištěný α–1–PI má specifickou aktivitu ve výši 1,0 jednotka/OD_{280}.

18. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že výtěžek α–1–PI je alespoň 1 jednotka na gram pasty obsahující frakci $IV_1 + IV_4$.

19. Způsob čištění α–1–PI podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující stupně:

- opatření znečištěné proteinové frakce obsahující α–1–PI;
- suspendaci uvedené znečištěné proteinové frakce ve vodném roztoku při pH 6 a teplotě, jež umožňuje rozpuštění albuminu, α–2–proteinu a β–proteinů aniž by došlo k rozpuštění α–1–PI;
- separaci nerozpustných proteinů, včetně α–1–PI, od rozpuštěných proteinů;
- resuspendaci nerozpustných proteinů ve vodném roztoku a přidání PEG, přičemž koncentrace PEG se pohybuje v rozmezí od 10 do 20 % hmotnostních a teplota a pH roztoku jsou zvoleny tak, aby došlo k vysrážení α–2–proteinů bez vysrážení α–1–PI;
- izolaci supernatantu ze srážení pomocí PEG a přidání $ZnCl_2$, přičemž pH roztoku je v rozmezí od 7 do 8, koncentrace $ZnCl_2$ je v rozmezí od 1 do 11mM a teplota je zvolena tak, aby došlo k vysrážení surového α–1–PI;
- izolaci vysráženého surového α–1–PI a rozpuštění uvedeného surového α–1–PI ve vodném roztoku;
- nanesení vodného roztoku surového α–1–PI na médium pro výměnu aniontů; a
- izolaci frakce obsahující přečištěný α–1–PI z média pro výměnu aniontů.

Konec dokumentu