



H U 0 0 0 2 1 8 4 6 3 B

(19) Országkód

HU**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL****SZABADALMI
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

218 463 B(51) Int. Cl.⁷**A 61 K 39/395**

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 03557
(22) A bejelentés napja: 1994. 06. 13.
(30) Elsőbbségi adatok:
93/07128 1993. 06. 14. FR
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FR 94/00699
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/29334

(40) A közzététel napja: 1996. 11. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 09. 28.

(72) Feltalálók:

Bonneel, Patrick, Lille (FR)
Burnouf, Miryana, Wavrin (FR)
Burnouf, Thierry, Wavrin (FR)
Dernis, Dominique, Marquette-lez-Lille (FR)

(73) Szabadalmas:

Association Pour L'Essor de la Transfusion
Sanguine Dans la Region du Nord, Lille (FR)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Eljárás terápiás célra használható immunglobulin G koncentrátum
előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás terápiás használatra alkalmas immunglobulin G koncentrátum előállítására.

Az eljárás több kromatográfiás elválasztásból tevődik össze, nem tartalmaz viszont etanolos kicsapást.

Az eljárás tartalmaz vírusinaktiváló lépést is.

A találmány tárgya a találmány szerinti eljárással nyert immunglobulin G koncentrátum, mely terápiás minőségű, alkalmas bármely használatra, különösen intravénás injekciók céljára.

HU 218 463 B

A találmány tárgya eljárás terápiás használatra alkalmas immunglobulin G koncentrátum előállítására.

A polivalens immunglobulin-készítményeket széles körben alkalmazzák. Általában 2000–5000 donortól összegyűjtött szérumból állítják elő, így biztosítva, hogy a készítmény tartalmazza az adott területen élő népesség minden ellenanyagát.

Ezeket az immunglobulinokat a többé-kevésbé módosított hagyományos Cohn-módszerrel állítják elő, azaz etanolos kicsapással. Az eljárás legnagyobb hátránya maga az etanolos kezelés, mely fehérjedenaturálódáshoz és immunglobulin-aggregátumok képződéséhez vezet. Az aggregátumok a komplement rendszer aktiválása és az anafilaktikus reakciók miatt terápiás szempontból káros reakciókat váltanak ki. Így ezek a készítmények alkalmatlanok intravénás injekciós célra, csak intramuszkuláris injekcióként használhatók, ami korlátozza a beadható anyagmennyiséget és ezzel a hatékonyságot.

A probléma megoldására számos módszer használatos: az immunglobulinok hasítása pepszinnel vagy plazminnal, kezelés β -propiolaktonnal vagy redukáló- és alkilezőszerekkel, kezelés pH 4-en, az aggregátum kicsapása PEG-kezeléssel.

A találmány szerinti eljárás előnyösen mellőzi ezeket az enzimatikus vagy kémiai kezeléseket, kiküszöböli az etanolos kicsapási lépést, ehelyett több kromatográfiás elválasztást alkalmaz, melyekben nincs kicsapási lépés.

Már Friesen és társai is előállítottak immunglobulin-koncentrátumot (Friesen: Joint ABS/CSL Symposium on Standardization in Blood Fractionation, Australia, 1986; Develop. Biol. Standard 67, 1987, 3–13; Immunoglobulins, Publ. Central Lab. Netherlands Red Cross 1988, szerkesztők: Krynen, Strengers, Van Aken) egy vagy két ioncserélő kromatográfiás lépés alkalmazásával:

- egyetlen, DEAE-SEPHADEX[®]-en végzett kromatográfiás lépés alkalmas specifikus γ -globulinok előállítására hiperimmunszérumokból, de ez csak kis mennyiségek esetén alkalmazható.
- DEAE-SEPHAROSE[®]-kromatográfiát követő DEAE-SEPHADEX[®]-kromatográfiával már nagyobb mennyiség is feldolgozható, és ez az eljárás alkalmas polivalens immunglobulin-készítmények előállítására, de ipari szempontból nem tekinthető gazdaságosnak.

Az immunglobulinok tisztítása a fentiekén kívül számos különleges problémát vet fel, mivel biológiai aktivitásuk szoros összefüggésben van szerkezeti épségükkel. Az aktivitás sem mérhető könnyen, lásd például enzimaktivitás esetén. Így egy adott specifikus antitest esetén azonos ELISA-antitesttiter mutató koncentrátumok – az előállítási eljárástól függően – különböző mértékű vírusfertőző képességet semlegesítő hatást fejtenek ki.

A találmány tárgya tehát nem denaturáló eljárás immunglobulinok tisztítására, mely alkalmas ipari célra (5000 l szérum mennyiségénél nagyobb sarzsok), és lehetővé teszi egyéb, terápiásan értékes fehérjék elkülönítését.

A találmány szerinti immunglobulin-koncentrátumot előállító eljárás nem tartalmaz etanolos kicsapási lépést, hanem kromatográfiás lépések sorozatát, melyekben az immunglobulinok mindig a folyékony fázisban maradnak pH 5,5 és 7,8 között. Az eljárás tartalmaz még egy vírusinaktiváló lépést, például kezelést oldószer-felületaktív anyaggal.

A találmány szerinti eljárás alkalmas teljes plazma vagy előnyösen cryo-felülűsző feldolgozására.

A találmány szerinti eljárás használható nagy térfogatú plazmamennyiségek esetén polivalens immunglobulin-készítmények előállítására és kisebb mennyiségű hiperimmunplazma-mennyiségek esetén specifikus immunglobulinok készítésére.

A találmány szerinti eljárás alkalmazása előtt a kiindulási plazmán vagy plazmafrakción előnyösen előtisztítást végzünk, mely abból áll, hogy átszűrjük egy sor, 0,5–0,2 μ m porozitású, negatív töltésű cellulóz- vagy perlitpatronon és kis mennyiségű pozitív töltésű gyantán (ZETA PLUS[®] szűrők, Cuno, USA). Negatív töltésüknek köszönhetően ezek a szűrők adszorbeálják, vagyis eltávolítják a IX. faktort, míg előtisztítási lépés nélkül az együtt tisztítódik meg az immunglobulinnal, s így a végtermék mellékhatásokat és nyomásesést okozhat.

Az eljárásban alkalmazhatunk egy vagy több előtisztítási lépést, mellyel eltávolíthatók az egyes plazmafehérjék, s így csökkenthető a további kromatográfiás oszlopok mérete, mely különösen gazdaságos nagy térfogatok esetén.

A fehérjefrakció előtisztítása szakaszosan történhet anioncserélő gyantával – így DEAE-SEPHADEX[®]-szel –, mely adszorpció útján távolítja el a IX. faktort, VII. faktort és C fehérjét. Ezt követően beinjektálható egy anioncserélő géloszlopba – így DEAE-SEPHAROSE[®]-ba –, mely adszorpció útján eltávolítja az albumint és az α -antitripsint. Az utóbbi fehérjék ismert módszerekkel, szokatlanul jó hozammal eluálhatók és koncentrálnak mint a találmány szerinti eljárás melléktermékei.

Az előző oszlopon átfutó fehérjefrakciót adott esetben az antitrombin III eltávolítására heparin-SEPHAROSE[®] oszlopon kromatografáljuk a következő kromatográfiás lépés előtt.

A találmány szerinti eljárás tartalmaz még egy sómentesítő lépést – ultraszűrést vagy géliszűrést –, melyben a legjobb előtisztító lépések szűrletét beinjektáljuk egy 0,022 M TRIS-HCl pufferrel pH=7,8-en egyensúlyba hozott, térhálós, dextrán típusú géloszlopba – SEPHADEX[®] G25-be – és összegyűjtjük a plazmafehérjéket tartalmazó frakciót.

Ezt a fehérjefrakciót aztán anioncserélő kromatográfiás oszlopra injektáljuk, melynek töltete előnyösen DEAE-csoportokat tartalmazó gél. Szokatlanul magas hozam érhető el 0,025 M TRIS-HCl pufferrel pH=7,8-en egyensúlyba hozott térhálós akrilamid típusú gélekkel, így DEAE-TRISACRYL[®] PLUS LS-sel (SEPARCOR-IBF ref. 262080). Ez az oszlop az immunglobulin G kivételével majdnem az összes plazmafehérjét adszorbeálja. Az immunglobulin G átfut az oszlopon, és 50 g/l-re töményíthető be.

A tömény immunglobulin-oldatot ekkor vírusinaktiváló kezelésnek vetjük alá, például oldószer-felületaktív anyag keverékének, előnyösen 0,3% TnBP [tri(n-butil)/foszfát] és 1% TWEEN®-80 keverékének jelenlétében, melynek során legalább 6 óra hosszat lassan kevertetjük 25 °C-on.

A találmány szerinti eljárás továbbá magában foglal kationcserélőgél-kromatográfiát, előnyösen karboxi-metil (CM)-csoportokat tartalmazó gélen végezve. Szokatlannal nagy hozam érhető el 0,024 M acetátpufferrel pH 5,5-en egyensúlyba hozott CM-TRISACRYL®-LS (SEPRACOR, ref. 260280) gélen.

Ez a gél adszorbeálja az immunglobulinokat, és lehetővé teszi az oldószer-felületaktív anyag eltávolítását a szűrletből. Az immunglobulinok deszorpcióját és eluálását a puffer ionerősségének 0,15-ről 0,19 M NaCl-ra történő emelésével végeztük.

A koncentrátumhoz 110 g/l szacharózt adtunk, szétlőtöttük és liofilizáltuk.

A fenti eljárással kapott immunglobulin G analízise azt mutatja, hogy a koncentrátum mentes az aggregátumoktól, immunglobulin A-tól, és meglepő módon nem tartalmaz immunglobulin E-t sem, vagy legfeljebb a plazmaszint 10%-ában, mely a termék további terápiás előnyét bizonyítja.

A találmány szerinti eljárással egy új, plazmából származó immunglobulin G koncentrátumot kapunk, mely nem tartalmaz immunglobulin G aggregátumot, immunglobulin E-t és immunglobulin A-t.

Ezek a tulajdonságok különösen alkalmassá teszik intravénás injekciók céljára, így ennek megfelelően állítottuk össze a készítményt.

A találmányt nem korlátozó jelleggel a következő példákon szemléltetjük.

1. példa

A kiindulási anyag a normál népességből találmányra kiválasztott, egészséges donoroktól összegyűjtött 500 l plazma.

Hagyományos módszerrel, fagyasztásos kicsapás után a felülúszót elkülönítettük, majd egy sor kromatográfiás lépésben tisztítottuk.

1A. Sómentesítő kromatográfia

Ezt a kromatográfiát GF 04-06 oszlopon (SEPRACOR®) végeztük. Az oszlopot 65 liter 0,022 M TRIS-HCl pufferrel, pH 7,8-en egyensúlyba hozott SEPHADEX®-G25-tel töltöttük meg 450 l/óra áramlási sebesség mellett.

A szűrletet denzitometriásan analizáltuk, és összegyűjtöttük az összes fehérjét tartalmazó frakciót.

Az oszlopot 1 M NaCl-oldattal regeneráltuk.

1B. Ioncserélőgél-kromatográfia

Ezt a kromatográfiát GF 08015 oszlopon végeztük. Az oszlopot 65 l 0,025 M TRIS-HCl pufferrel, pH 7,8-en egyensúlyba hozott DEAE-TRISACRYL®-lel töltöttük meg 150 l/óra áramlási sebesség mellett.

Ilyen körülmények között az immunglobulin G az egyetlen fehérje, mely nem adszorbeálódik az oszlopra.

Az oszlopon átfolyó szűrletet denzitometriásan analizáltuk, és összegyűjtöttük a fehérjefrakciót, mely kö-

zel 100%-os tisztaságú immunglobulin G-t tartalmazott.

Az oszlopon visszamaradó albumint a pufferhez adott 0,4 M NaCl-dal eluáltuk, majd hagyományos módszerrel töményítettük be.

Az oszlopot 2 M NaCl-oldattal regeneráltuk.

1C. Vírusinaktiválás

Az előző oszlop szűrletét betöményítettük 50 g/l-re, majd ismert módon kezeltük: 6 óra hosszat lassan kevertettük 25 °C-on a hozzáadott oldószer-felületaktív anyagkeverékkel. A keverék összetétele 0,3% TnBP és 1% TWEEN 80.

1D. Kationcserélőgél-kromatográfia

Ezt a kromatográfiát GF 08015 oszlopon végeztük.

Az oszlopot 65 l 0,024 M nátrium-acetát-pufferrel, pH=5,5-en egyensúlyba hozott CM-TRISACRYL®-el töltöttük meg 20-100 l/óra áramlási sebesség mellett.

Ilyen körülmények között az immunglobulin G adszorbeálódik az oszlopra, míg az oldószer-felületaktív anyagkeverék, az esetleg denaturálódott szennyező anyagok és egyéb maradékok a szűrlettel távoznak.

Az immunglobulinokat ezután az ionerősség növelésével – a pufferhez adott 0,15-0,19 M NaCl-dal – deszorbeáltuk az oszlopról.

Az eluátum immunglobulin-koncentrációja 30-50 g/l, mely 110 g/l szacharóz hozzáadása után minden további művelet nélkül kiszerezhető.

Az oszlopot 1 M NaCl-oldattal regeneráltuk.

2. példa

Az 1. példában ismertetett eljárást alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy az első kromatográfia elé még egy előtisztítási lépést iktattunk.

A fagyasztva kicsapódás után képződő felülúszót három 0,5-0,2 µm porozitású, főként negatív töltésű patronon szűrtük (ZETA PLUS® szűrők – CUNO-ipari szűrők – Commercial Intertech Corp. USA leányvállalata, a 4 783 262 és 4 859 340 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban ismertetett „CUNO” szűrők). Ezek a szűrők tisztított cellulózból, perlitekből és kis mennyiségű pozitív töltésű gyantából készülnek. Más, kereskedelemben beszerezhető szűrőrendszerek is használhatók.

A szűrőket nátrium-citrát, dinátrium-foszfát, kálium-foszfát, nátrium-klorid és dinátrium-EDTA-tartalmú citrát/foszfát pufferrel, pH 5,5-6,5-en, előnyösen pH 6-on öblítettük át.

Ez a szűrési lépés biztosítja a XI. faktor adszorpcióját, vagyis eltávolítását.

3. példa

Az 1. és 2. példában leírt eljárást alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy az első, sómentesítő SEPHADEX® G25 kromatográfia elé további előzetes, anioncserélő gélen végzett adszorpció lépést iktattunk.

Az előzetes adszorpciót szakaszos üzemben 1,5 g DEAE-SEPHADEX®/l plazma jelenlétében, 2-5 óra hosszat végeztük. Ekkor adszorbeáltuk, illetve távolítottuk el a IX. faktort, VII. faktort és C fehérjét, míg az immunglobulinok a felülúszóban maradtak.

A felülúszó további előtisztítását DEAE-SEPHAROSE® CL6B FF (Pharmacia-Svédország) oszlopkromatográfiával végeztük. A plazmafrakciót dializáltuk, vezetőképességét 0,025 M nátrium-acetáttal 1,6 mS-re és pH-ját 7,6-re állítottuk be. Az oszlopot pH 7,6-es 0,025 M nátrium-acetáttal hoztuk egyensúlyba.

Az immunglobulinok átáramlanak a szűrletbe.

Az eljárás két szempontból előnyös:

– az előtisztított immunglobulinok átáramlanak az oszlopon, így a következő lépésekben egyre kisebb oszlopok használhatók,

– adszorbeálódik az albumin és az α -antitripszin, melyek így ismert módszerekkel igen jó hozammal kivonhatók és tisztíthatók.

A szűrlet – mely tartalmazza az előtisztított immunglobulin G-t – további oszlopkromatográfiával tisztítható heparin-SEPHAROSE®-on. Az oszlopot pH 6,8-es 0,02 M foszfát–0,154 M NaCl-pufferrel hoztuk egyensúlyba.

Ez a kromatográfia biztosítja az antitrombin III adszorpcióját, vagyis eltávolítását, míg az immunglobulinok átáramlanak a szűrletbe.

4. példa

Modellként citomegalovírust (CMV) alkalmazva összehasonlítottuk a hagyományos etanolos frakcionálást követő pH=4-es pepszines kezeléssel készített immunglobulinok és a találmány szerinti eljárással készített immunglobulinok antitesttiterét és vírusfertőző képességet semlegesítő kapacitását.

Eljárás IgG előállítására	ELISA-titer (E/ml)	Semlegesítő- kapacitás (CMV-titer)
Hagyományos módszer		
1. sarzs	100	1280
2. sarzs	110	640
3. sarzs	110	640
Találmány szerinti eljárás		
1. sarzs	90	2560
2. sarzs	120	5120
3. sarzs	100	5120

Az eredményekből kitűnik, hogy hasonló mennyiségű antitest esetén (ELISA-val mérve) a biológiai aktivitás (semlegesítőképesség) alapján értékelt minőség jelentős mértékben jobb a kromatográfias eljárással készült antitestek esetén.

5. példa

Mértük az IgE mennyiségét a kiindulási plazmában, a hagyományos módszerrel készített IgG koncentrátumban (4. példa) és a találmány szerinti kromatográfias eljárással előállított IgG koncentrátumban.

A következő táblázatban látható, hogy a kromatográfias eljárással előállított termék gyakorlatilag IgE-mentes, míg több IgE található a hagyományos termékekben, mint a kiindulási anyagként használt plazmában.

	Sarzsszám	IgE (UI/ml)
Kiindulási plazma	99030120	96
	30162	108
	30170	118
Hagyományos IgG	50020200	293
	20231	259
	20291	272
	23300	220
	30070	230
	30071	210
	30072	246
	30080	242
	30081	258
	30082	248
	30090	214
	30091	212
	30092	170
	30100	160
	30101	117
	30102	144
	30110	250
30112	224	
30120	195	
30121	161	
30122	220	
30130	238	
30131	248	
30132	227	
Kromatográfias el- járással nyert IgG	50230050	12
	070	6
	080	8,1
	090	4,1
	100	7,5
	110	3,5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás terápiás célra alkalmazható immunglobulin G koncentrátum emberi plazmából vagy fagyasztva kicsapatott plazma felülúszójából történő előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az eljárásban etanolos kicsapási lépés helyett több kromatográfias műveletet alkalmazunk, melyek során az immunglobulinok mindig folyadékfázisban, 5,5 és 7,8 közötti pH-értéken maradnak, továbbá egy vírusinaktiváló lépést is alkalmazunk, ennek megfelelően az eljárás a következő egymást követő lépésekből áll:

- a) sómentesítés,
- b) anioncserélő gélen végzett kromatográfia,
- c) vírusinaktiválás,
- d) kationcserélő gélen végzett kromatográfia.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
5 hogy kiindulási anyagként a plazmából a fagyasztva ki-
csapatást követően kapott felülúszót használjuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
10 hogy a fagyasztva szárítást követően képződő felül-
úszót előtisztítjuk 0,5–0,2 µm porozitású, negatív tölté-
sű cellulózból és perlitekből készült, kis mennyiségű
pozitív töltésű gyantát is tartalmazó szűrőpatronok soro-
zatán.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,
15 *azzal jellemezve*, hogy beiktatunk egy vagy több előtisztít-
tató lépést, melyben egyes plazmafehérjéket gélekre
– így például anioncserélő géle és heparin-SEPHA-
ROSE®-ra – adszorbeáltatunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
20 hogy az a) lépést pH 7,8-en, 0,022 M TRIS-HCl puffer-
rel egyensúlyba hozott, térhálós, dextranszerű gélen

végezzük, és az összegyűjtött plazmafehérjéket tartal-
mazó frakciót visszük tovább a b) lépésbe.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
hogy a b) lépést pH 7,8-en, 0,025 M TRIS-HCl pufferrel
egyensúlyba hozott, térhálós, akrilamid típusú, DEAE-
csoportokat tartalmazó gélen végezzük, és az összegyűj-
tött szűrletet visszük tovább a c) lépésbe.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
hogy a c) lépésben 25 °C-on legalább 6 óra hosszat ke-
zelést végzünk az oldószer és a felületaktív anyag keve-
rével.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
hogy a d) lépést pH 5,5-en, 0,024 M nátrium-acetát-puf-
ferrel egyensúlyba hozott, térhálós, akrilamid típusú, kar-
boxi-metil-csoportokat tartalmazó gélen végezzük, és a
gélre adszorbeálódott immunglobulinokat növekvő ion-
erősségű pufferrel, 0,15–0,19 M NaCl hozzáadásával
eluáljuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,
hogy a d) lépésben eluált immunglobulinokat 110 g/l
szacharózzal egészítjük ki, majd fagyasztva szárítjuk.