



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 025 129** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>5</sup> **A 61 K 35/16, G 01 N 33/86**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4831275/14, 04.09.1990  
(30) Приоритет: 05.09.1989 FR 8911567  
(46) Дата публикации: 30.12.1994  
(56) Ссылки: Заявка Франции N 88/07530, кл. А 61К 35/16, 1987.

(71) Заявитель:  
Сантр Региональ де Трансфюзьон Сангин де Лилль (FR)  
(72) Изобретатель: Мариана Бюрнуф-Радосевич[FR], Тьерри Бюрнуф[FR]  
(73) Патентообладатель:  
Региональ де Трансфюзьон Сангин де Лилль (FR)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАТА ФАКТОРА VIII И ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

(57) Реферат:  
Изобретение относится к области медицины и касается способа получения концентрата фактора - VIII и фактора фон Виллебранда, применяемого для лечения гемофилии. Целью изобретения является повышение степени очистки и упрощение способа. Сущность изобретения заключается в предварительной очистке свежей или свежзамороженной плазмы крови осаждением хлоридом бария, отделении осадка, очистке надосадочной жидкости на гидроокиси алюминия с последующим

центрифугированием при низкой температуре, ультрафильтрации или гель-фильтрации надосадочной жидкости, анионообменной хроматографии на ДЭ / АЭ - фрактогеле, отмыванием от неадсорбированных белков и элюции целевого продукта буферным раствором, содержащим 0,27 М хлористого натрия. Технический результат заключается в повышении степени очистки за счет повышения удельной активности, а также упрощении способа за счет исключения криоосаждения. 9 з. п. ф-лы.

RU 2 0 2 5 1 2 9 C 1

RU 2 0 2 5 1 2 9 C 1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 025 129** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>5</sup> **A 61 K 35/16, G 01 N 33/86**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4831275/14, 04.09.1990

(30) Priority: 05.09.1989 FR 8911567

(46) Date of publication: 30.12.1994

(71) Applicant:  
Santr Rezhional' de Transfjuz'on Sangin de Lill' (FR)

(72) Inventor: Mariana Bjurnuf-Radosevich[FR],  
T'erri Bjurnuf[FR]

(73) Proprietor:  
Rezhional' de Transfjuz'on Sangin de Lill' (FR)

(54) **METHOD OF PREPARING OF CONCENTRATE OF FACTOR VIII AND VON VILLEBRAND FACTOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, hematology. SUBSTANCE: method involves the preliminary purification of fresh or frozen plasma blood by precipitation with barium chloride, precipitate separation, purification of supernatant liquid on alumina following by centrifugation at low temperature, ultrafiltration or gel-filtration of supernatant liquid, anion-exchange

chromatography on DEAE-cellulose, washing off of nonadsorbed protein, and elution of the end product with buffer solution containing 0.27M sodium chloride. EFFECT: enhanced purification degree, increased specific activity, simplified method, elimination of cryoprecipitation stage; the end product is used for hemophilia treatment. 10 cl

RU 2 0 2 5 1 2 9 C 1

RU 2 0 2 5 1 2 9 C 1

Изобретение касается метода приготовления из цельной плазмы концентрата комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда", обладающего высокой специфической активностью.

Лечение гемофилии А инъекцией фактора-VIII является обычной практикой и требует использования препаратов высокой чистоты, чтобы, с одной стороны, уменьшить риск загрязнения препарата вирусами, с другой, поскольку инъекции необходимо часто повторять, чтобы избежать нежелательных иммунных последствий, опасных для пациента при накоплении остаточных загрязнений препарата.

В технических центрах уже применяют различные методы обработки плазмы крови человека с целью очистки фактора-VIII. Эти методы включают осаждение загрязняющих протеинов с использованием ряда химических реагентов, гель-проникающую хроматографию, хроматографию по иммунному средству, обменную хроматографию, а также всевозможные сочетания этих весьма различных методов.

В плазме фактор-VIII присутствует лишь в небольших количествах, поэтому главной проблемой, которую необходимо решить, является производительность процесса очистки. Кроме того, фактор-VIII представляет собой нестабильный протеин, причем такой, который может быть активирован другими содержащимися в крови факторами. Однако в активированном состоянии он утрачивает свою лечебную ценность. Таким образом, для подступа к решению данной проблемы необходимы специально приспособленные методы очистки, а также точное окончательное дозирование.

Известен метод очистки с использованием ионообменного хроматографирования, который обеспечивает получение концентрата фактора-VIII высокой степени чистоты.

Однако согласно этому методу, как это практикуется и другими изготовителями, выпускающими аналогичный препарат, используемый исходный материал представлял собой криоосажденную фракцию плазмы. На стадии криоосаждения теряется 30-40% фактора-VIII, который остается в осветленной жидкости верхнего слоя.

Предлагается разработать метод приготовления искомого препарата из цельной плазмы, не подвергнутой криоосаждению, с целью ограничения потерь фактора-VIII. Кроме того, подобный метод явился бы весьма выгодным упрощением для неодинаково оснащенных центров-лабораторий, выпускающих препарат, где иногда бывает трудно осуществить криоосаждение.

Вот почему заявитель разработал простой метод выделения очищенного фактора-VIII из цельной плазмы, что позволяет получить стабильный концентрат высокой чистоты, причем данный метод характеризуется очень хорошим выходом продукта.

Таким образом, изобретение касается приготовления концентрата фактора-VIII из цельной плазмы. Этот процесс включает очистку, удаление составляющих протромбинового комплекса (факторы II, VII, IX, X), а также очистку анионообменным хроматографированием, позволяющим через

выбор геля и вымывающего буферного раствора получить комплекс "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда" высокой чистоты.

Этот метод можно также использовать для получения (при условии дополнительных операций очистки) очищенных растворов также других протеинов плазмы, таких как фибриноген, фибронектин, альбумин, иммуноглобулины и антитромбин-III.

Данный метод разработан применительно к плазме крови человека, но он равным образом применим и к плазме животного происхождения.

Согласно предлагаемому способу, в качестве исходного материала можно использовать цельную плазму, но при этом необходимо оговорить, что эта плазма является свежей или замороженной с целью ее сохранения, но только не криоосажденной. Целесообразно, чтобы эта плазма была накоплена в присутствии антикоагулянта или же стабилизирующего раствора. Обычно для этой цели применяют

цитрато-декстрозо-фосфатную смесь. Целесообразно также использовать любой другой специфический стабилизатор фактора - VIII либо вводимый в эту смесь, либо заменяющий ее.

В качестве раствора, стабилизирующего исходный материал плазмы, целесообразно использовать раствор, содержащий смесь 0,2-2 U мл<sup>-1</sup> гепарина, 1-5 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1-10 mM дихлорида кальция, с возможным добавлением глюкозы до концентрации 5-60 г.л<sup>-1</sup>.

Предлагаемый метод в качестве начальной стадии включает предосаждение, являющееся комбинацией осаждения хлоридом бария и адсорбирования на геле гидроксида алюминия.

Целесообразно обрабатывать хлоридом бария плазму, величина pH которой доведена до 6,5, постепенно вводя хлорид бария до тех пор, пока не будет достигнута окончательная его концентрация 0,08 M, при непрерывном перемешивании с последующей обработкой центрифугированием при 5-10°C с целью устранения осаждаемых протеинов и, наконец, отбором надосажденной жидкости. Осажденные протеины целесообразно отобрать для получения из них протромбинового комплекса. Затем осуществляют контактирование надосажденной жидкости с 3% -ным гелем гидроксида алюминия (при pH 6,5), адсорбирующего оставшиеся загрязняющие протеины. Эта обработка сопровождается охлаждением до 5-8°C в криостате, центрифугированием при 5°C и отбором надосажденной жидкости, которую выдерживают при 5-8°C.

Из упомянутой надосажденной жидкости необходимо удалить соли. Это можно осуществить либо ультрафильтрованием в присутствии буферного раствора, используемого на последующей стадии очистки хроматографированием, с добавлением к этому раствору 0,5-2 U мл<sup>-1</sup> гепарина, либо хроматографированием на установке Sephadex G25 также с использованием упомянутого буферного раствора.

Далее способ включает разделение с использованием анионообменного

хроматографирования. Заявитель уже ранее опубликовал выявленные им преимущества ряда смол с низкой ионообменной способностью и порами большого размера, что в дальнейшем обеспечивает удерживание молекул, весьма крупных по величине. Такое "продленное" удержание молекул позволяет образовывать связи этих молекул со смолой, отличающиеся слабой гидрофобностью, и подобрать такую ионную силу буферного раствора, которая допускает избирательное десорбирование тех или иных связанных таким образом молекул.

Смолы данного типа поступают в продажу под общим наименованием Fractogel. Можно использовать ДЭАЭ-Fractogel 650 (R), а также T- или D-МАЭ-Fractogel фирмы Merck. Некоторые из этих смол обычно доступны в той модификации, которую их поставщик характеризует как "щупальцевидные смолы". Структура их матриц модифицирована с целью увеличения связывающей поверхности по отношению к положительным зарядам, что способствует увеличению рабочей емкости геля.

Буферный раствор хроматографической колонки представляет собой буферный раствор на основе цитрата натрия и хлорида натрия, причем значение pH раствора отрегулировано до 7. Целесообразно, чтобы этот раствор содержал хлорид кальция в количестве 0,5-6 мМ, лизин в количестве 2-4 г.л<sup>-1</sup> и глицин в количестве 8-11 г.л<sup>-1</sup>. Осуществление процесса в дальнейшем заключается в заданном увеличении концентрации упомянутого хлорида натрия.

Осуществление метода очистки согласно изобретению включает введение предпочищенного препарата в хроматографическую колонку. При данных условиях (0,11 М хлорида натрия) колонка в состоянии связывать очень крупные молекулы, например комплекс "фактор фон-Виллебранда + фактор-VIII", позволяя фибриногену, альбумину, иммуноглобулинам, антитромбину-III и фибронектину вымываться вместе с фильтратом.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, цель которого состоит в достижении оптимальной эффективности выделения фактора-VIII, ионную силу буферного раствора хроматографической колонки за один прием сразу увеличивают до концентрации хлорида натрия 0,27 М. Согласно другому варианту осуществления изобретения упомянутая стадия вымывания предваряется предпромывкой путем увеличения ионной силы раствора до концентрации хлорида натрия 0,13 М с целью удаления фибронектина.

Комплекс "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда", десорбируемый и вымываемый в этих условиях, обладает специфической активностью, составляющей, по меньшей мере, 5-10 U мг<sup>-1</sup>. Общий выход продукта при осуществлении процесса составляет, по меньшей мере, 350 U на 1 л исходной плазмы и может быть доведен, по меньшей мере, до 500 U на 1 л при введении в исходную плазму указанной стабилизирующей смеси.

В зависимости от области последующего применения раствор, содержащий комплекс "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда",

можно подвергнуть дополнительной операции очистки, в частности концентрированию и очистке методом повторного хроматографирования. Аналогично предыдущему повторное хроматографирование также можно реализовать на смолах марок ДЭАЭ- или T-(D-МАЭ) Fractogel и т.п. Можно также использовать и иные носители, сульфат декстрана, иммобилизованный аминогексил, иммобилизованный гепарин, сульфопропиловые смолы, смолы с химическим или иммунным средством.

Дополнительное хроматографирование проводят с использованием того же основного буферного раствора, что и ранее. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, цель которого заключается в возможно более высокой степени концентрирования, дополнительное хроматографирование проводят в тех же самых условиях, что и первое, с единственной оговоркой - увеличении ионной силы буферного раствора сразу до 0,27 М хлорида натрия. Согласно другому варианту осуществления изобретения первичное увеличение ионной силы буферного раствора до 0,13 М хлорида натрия призвано удалить остаточные загрязняющие протеины, а последующее (вторичное) повышение ионной силы раствора до концентрации хлорида натрия 0,27 М проводят для выделения особо чистого концентрата комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда", который таким образом приобретает специфическую активность, равную, по меньшей мере, 10-20 U мг<sup>-1</sup>.

Другие протеины, содержащиеся в первом фильтрате колонки, такие как иммуноглобулины, альбумин, антитромбин-III, фибриноген и фибронектин, также можно очистить и концентрировать с использованием обычных хроматографических методов.

Предлагаемый способ предусматривает также обработку по дезактивированию вирус, выполняемую как обычно. В случае использования химического реагента, например, если предусмотрена обработка с участием растворителя-детергента, то ее целесообразно проводить перед каждым хроматографированием, но так, чтобы в дальнейшем гарантировать удаление дезактивирующих реагентов.

Предметом изобретения являются также концентрации комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда", а также концентрации других протеинов плазмы, получаемых с использованием указанного метода.

Упомянутые концентрации установлены в соответствии со стандартами фармакопеи и могут быть использованы для лечебных целей.

Примеры иллюстрируют два варианта осуществления изобретения, не выходящие за пределы области его применения.

Пр и м е р 1. Берут 250 мл свежей плазмы или замороженной плазмы, предварительно растопленной до 22-25°C. Плазму накапливают в присутствии антикоагулянта-стабилизатора (например, цитратодекстрозофосфатного) и доводят pH до 6,5 уксусной кислотой.

а) Предочистка.

К плазме посредством перистальтического насоса добавляют 20 мл 1 М раствора хлорида бария при pH 6,5 до окончательной концентрации хлорида 0,08 М. Хлорид бария вводят со скоростью 4-8 мл. мин<sup>-1</sup>, а затем смесь поддерживают в состоянии перемешивания в течение 15 мин.

Далее смесь центрифугируют при частоте вращения 2 700 мин<sup>-1</sup> и при температуре 8°C в течение 20 мин, после чего отбирают надосадочную жидкость.

Затем надосадочную жидкость адсорбируют на геле гидроксида алюминия марки Alhydrogel с 3%-ной концентрацией Al(OH)<sub>3</sub>, соблюдая соотношение 2,3 г геля на 1 л плазмы. Величину pH доводят до 6,5 и осуществляют охлаждение в криостате до 5 °С. Далее смесь центрифугируют при 5°C и 2 700 мин<sup>-1</sup> в течение 20 мин, после чего отбирают надосадочную жидкость, которую сохраняют при 5°C.

Такая обработка позволяет устранить компоненты протромбинового комплекса (факторы II, VII, IX, X), который можно собрать в качестве самостоятельного продукта и очистить известными методами.

Лучшие результаты можно получить комбинированием двух указанных методов обработки, в то время как обработка препаратом Alhydrogel сама по себе недостаточна для полного устранения протромбина и других компонентов комплекса PPSB, а отдельно взятая обработка хлоридом бария упускает некоторое количество фактора-X, протромбина и, наконец, фактора-VII.

Собранную таким образом надосадочную жидкость очищают от солей ультрафильтрацией в присутствии того же буферного раствора, который используют на последующей стадии хроматографирования, с добавлением гепарина в количестве 1 U мл<sup>-1</sup> или же хроматографированием на колонке Sephadex G25 с использованием того же буферного раствора.

Затем применяют обычную обработку растворителем-детергентом с целью дезактивирования вирусов в течение 6 ч при 24°C. Метод такой обработки известен.

б) Очистка хроматографированием.

Надосадочную жидкость, прошедшую предочистку и диализ, подвергают очистке хроматографированием. Для этого применяют колонку типа K 26/30 (изготовитель фирма Pharmacia-Uppsala Швеция) диаметром 2,6 см и рабочей высотой 30 см, из которых 10 см заполнены смолой ДЭАЭ-Fractogel TSK 650 (R) фирмы Merck.

Вводимый в колонку промывочный буферный раствор имеет следующий состав: 10 мМ цитрата натрия, 1 мМ хлорида кальция, 9 г.л<sup>-1</sup> глицина, 3 г. л.<sup>-1</sup> лизина; к этому буферному раствору добавляют хлорид натрия до конечной концентрации 0,11 М и доводят pH до 7.

Обрабатываемую пробу вводят в колонку со скоростью 100 мл. ч<sup>-1</sup>.

Колонку промывают буферным раствором для удаления неадсорбированных протеинов, включающих фибриноген, альбумин, иммуноглобулины, антитромбин-III и фибриноген, а также агенты, дезактивирующие вирусы.

Затем десорбируют комплекс "фактор-VIII

+ фактор фон-Виллебранда" посредством повышения ионной силы раствора (буферного раствора) до концентрации используемого для этого хлорида натрия, равной 0,27 М.

5 Содержащий фактор-VIII раствор, полученный данным методом, обладает специфической активностью порядка 5-10 1 U мг<sup>-1</sup>, причем эффективность очистки по отношению к плазме, вводимой в колонку, составляет 60-80%.

10 Для концентраций обоих факторов, т.е. фактора-VIII и фактора фон-Виллебранда, всегда наблюдается отношение, близкое к 1U/1U, причем фактор фон-Виллебранда выражают в единицах софактора ристоцетина.

15 Чистоту упомянутого раствора, содержащего фактор-VIII, еще можно слегка улучшить введением дополнительного хроматографического разделения, в результате которого получают продукт, подлежащий последующему концентрированию. Например, берут вторую колонку со смолой ДЭАЭ-Fractogel, соблюдая те же условия заправки, что и выше, и осуществляют предпромывку 0,13 М раствором хлорида натрия, устраняющую остаточные загрязняющие протеины. Затем повышают ионную силу раствора до концентрации хлорида натрия 0,27 М с целью десорбирования и вымывания очищенного до высокой степени и концентрированного комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда".

30 Вторую операцию концентрирования хроматографированием можно заменить ультрафильтрацией.

Согласно обычному варианту осуществления изобретения, первую стадию очистки хроматографированием проводят на смоле ДЭАЭ-Fractogel. Однако весьма хорошие результаты были также получены с использованием новых смол фирмы Merck, таких как ТМАЭ-Fractogel (здесь ТМАЭ означает три-метил-амино-этил) или DMAЭ-Fractogel (DMAЭ-di-MAЭ), эквивалентных по свойствам смоле ДЭАЭ-Fractogel. Применяют и новые смолы т.н. "щупальцевидного" типа, разработанные фирмой Merck, которые В. Мюллер представил на конференции по жидкостной хроматографии, проходившей в Стокгольме в июне 1989 г.

45 П р и м е р 2. Второй вариант осуществления изобретения также позволяет получить концентраты фибриногена и фибронектина при одновременном получении концентрата, содержащего фактор-VIII и фактор фон-Виллебранда, при несколько пониженном выходе продукта, но при немного улучшенной специфической активности соответствующего комплекса.

55 Технологический процесс аналогичен процессу примера 1, за исключением операции вымывания комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда" из первой колонки со смолой ДЭАЭ-Fractogel.

60 При этом фибриноген, антитромбин-III, альбумин и иммуноглобулины не удерживаются колонкой и вымываются в фильтрат.

Комплекс "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда" можно очистить и концентрировать на второй стадии методом хроматографического разделения на колонке,

содержащей смолу ДЭАЭ-Fractogel буферный раствор, ионная сила которого соответствует концентрации хлорида натрия 0,13 М, не допускающей связывания остаточных загрязняющих протеинов. Увеличение ионной силы до концентрации хлорида натрия 0,27 М обеспечивает десорбирование и вымывание комплекса "фактор-VIII + фактор фон-Виллебранда". Таким образом получают препарат со специфической активностью 10-20 1 Умг<sup>-1</sup>.

Далее можно очистить и концентрировать фибриноген и фибронектин с использованием известных хроматографических методов для получения растворов, пригодных по своему качеству для лечебных целей.

Прочие протеины плазмы можно очистить и концентрировать с использованием обычных методов разделения.

Пример 3. Производительность очистки можно еще более улучшить стабилизированием исходной плазмы, предварительно подвергнутой оттаиванию до 25°C, посредством добавления следующей смеси:

Гепарин 1 мл<sup>-1</sup>

Этилендиаминтетра-

уксусная кислота 2 мМ или 0,74 г.л<sup>-1</sup>

Хлорид кальция 6 мМ или 0,67 г.л<sup>-1</sup>

В эту смесь можно также ввести дополнительно глюкозу (концентрация 5-60 г. л<sup>-1</sup>). После этого рН понижают до 6,5 добавлением уксусной кислоты. Далее выполняют операции очистки точно так же, как это изложено в примере 1 или 2. В этих условиях общий выход продукта очистки составляет, по меньшей мере, 500 U фактора-VIII : С на 1 л исходной плазмы. Это соответствует проявлению суммарной активности фактора-VIII при специфической активности последнего, равной 10-30 U : С на 1 мг протеина.

#### Формула изобретения:

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАТА ФАКТОРА VIII И ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА путем предварительной очистки плазмы крови на гидроокиси алюминия с последующим центрифугированием при низкой температуре и ее анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-фрактогеле, элюции целевого продукта раствором хлористого натрия и концентрирования, отличающийся тем, что используют свежую или свежемороженную плазму, перед очисткой на гидроокиси алюминия проводят осаждение хлоридом бария, осадок отделяют, а надосадочную жидкость подвергают ультрафильтрации в присутствии гепарина и буфера, используемого для анионообменной хроматографии, или гель-фильтрации на сефадексе G25 с использованием того же буфера, анионообменную хроматографию осуществляют в присутствии буферного раствора рН 7,0, содержащего цитрат натрия

и хлорид кальция, с добавлением глицина, лизина и хлорида натрия до концентрации 0,11 М, отмывание от неадсорбированных белков осуществляют этим же буфером, а элюцию целевого продукта проводят повышением концентрации хлористого натрия в буферном растворе до 0,27 М.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение хлоридом бария осуществляют введением раствора с концентрацией хлорида бария 1 М и величиной рН 6,5 при непрерывном перемешивании, после чего проводят центрифугирование при 5 - 10°C.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что адсорбцию на геле гидроокиси алюминия осуществляют при концентрации геля 3% и величине рН 6,5 с последующим резким охлаждением до 5°C и центрифугированием при 5°C.

4. Способ по пп.1 - 3, отличающийся тем, что ионную силу буферного раствора повышают до концентрации хлорида натрия 0,13 М с целью исключения фибронектина, а затем до 0,27 М с целью десорбирования из хроматографической колонки комплекса фактор - VIII + фактор фон Виллебранда.

5. Способ по пп. 1 - 3, отличающийся тем, что комплекс фактор-VIII + фактор фон Виллебранда, десорбированный из хроматографической колонки, подвергают дополнительной операции очистки и концентрирования хроматографией.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что дополнительную хроматографию проводят на ионообменной смоле, выбранной из группы смол, включающей ДЭАЭ- (или же Т- или Д-МАЭ)-фрактогель, иммобилизованный аминогексил, иммобилизованный гепарин, сульфат декстрина, сульфопропил, а также на смолах, обладающих химическим или иммунным сродством.

7. Способ по пп.5 и 6, отличающийся тем, что дополнительную хроматографию проводят с использованием буферного раствора с концентрацией хлорида натрия 0,11 М, причем эта обработка включает два повышения ионной силы раствора: сначала до 0,13 М хлорида натрия, а затем до 0,27 М.

8. Способ по п.5, отличающийся тем, что дополнительную хроматографию проводят с использованием буферного раствора с концентрацией хлорида натрия 0,17 М, причем эта обработка заключается в однократном повышении ионной силы раствора сразу до 0,27 М хлорида натрия.

9. Способ по пп.1 - 8, отличающийся тем, что протеины, содержащиеся в хроматографическом фильтрате, полученном согласно п.1, подвергают дополнительной операции очистки и концентрирования.

10. Способ по пп.1 - 8, отличающийся тем, что перед каждой хроматографической операцией проводят обычную обработку по дезактивированию вирусов с использованием растворителя-детергента.