



(19) **UA** (11) **80 469** (13) **C2**
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: а200508678, 13.02.2004

(24) Дата начала действия патента: 25.09.2007

(30) Приоритет: 13.02.2003 АТ А 218/2003

(46) Дата публикации: 25.09.2007А61К 38/38
20060101СFI20070612ВНUA С07К
1/00 20060101СLI20070612ВНUA

(86) Заявка РСТ:
РСТ/ЕР2004/001397, 20040213

(72) Изобретатель:

Герингер Вернер, АТ,
Пок Катарина, АТ,
Рьомш Юрген, АТ,
Свае Тор-Айнар, АТ,
Каннихт Кристоф, DE

(73) Патентовладелец:

ОКТАФАРМА АГ, СН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЛЬБУМИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения альбумина, который характеризуется сочетанием следующих операций, при которых:

(а) для инактивации вируса первый водный раствор альбумина подвергают обработке методом SD путем обеспечения его контакта с реагентами SD при температуре ниже 45 °C;

(b) удаляют, по крайней мере, существенное количество реагентов SD путем масляной экстракции с дальнейшей хроматографией гидрофобного взаимодействия, при которой для обеспечения прохождения упомянутого процесса хроматографии используют гидрофобную матрицу, преимущественно матрицу, с которой необязательно могут быть связаны гидрофобные группы, при условии, что как указанные группы используют алифатические группы более чем с 24 атомами углерода, для получения второго

раствора альбумина, к которому

(с) необязательно добавляют один или несколько стабилизаторов, выбранных из группы сахаров, аминокислот, сахарных этиловых спиртов, при условии, которые не используют в качестве стабилизатора индол и в качестве такого стабилизатора не применяют жирные кислоты C₆-C₁₀, после чего

(d) второй раствор альбумина, к которому уже необязательно был добавлен стабилизатор, подвергают окончательной упаковке и стерильной фильтрации и необязательно загружают в конечные контейнеры.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2007, N 15, 25.09.2007. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **80 469** (13) **C2**
(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: a200508678, 13.02.2004

(24) Effective date for property rights: 25.09.2007

(30) Priority: 13.02.2003 AT A 218/2003

(46) Publication date: 25.09.2007A61K 38/38
20060101CFI20070612BHUA C07K
1/00 20060101CLI20070612BHUA

(86) PCT application:
PCT/EP2004/001397, 20040213

(72) Inventor:

Gehringer Werner, AT,
Pock Katharina, AT,
Roemisch Juergen, AT,
Svae Tor-Einar, AT,
Kannicht Christoph, DE

(73) Proprietor:

OCTAPHARMA AG, CH

(54) **METHOD FOR THE PRODUCTION OF ALBUMIN**

(57) Abstract:

The invention relates to a therapeutically usable virus-inactivated albumin and a method for producing a therapeutically usable virus-inactivated albumin, which is characterized by a combination of the following steps: (a) a first aqueous albumin solution is subjected to a virus inactivation treatment according to the SD method by contacting said aqueous albumin solution with SD reagents at a temperature of less than 45°C; (b) the SD reagents are at least essentially removed by means of oil extraction and subsequent hydrophobic interaction chromatography, a hydrophobic matrix, especially a matrix to which optional hydrophobic groups can be bonded, being used for the chromatography

process provided that said groups are aliphatic groups wherein C>24, and a second albumin solution is obtained to which (c) one or several stabilizers from the group comprising sugar, amino acids, and sugar alcohols is/are optionally added provided that no indole stabilizer and no C₆-C₁₀ fatty acid are used as stabilizers; whereupon i (d) the second albumin solution, to which stabilizer has been optionally added, is finished and sterilized by filtration and optionally filled into final containers.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2007, N 15, 25.09.2007. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **80 469** (13) **C2**
(51) МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
а200508678, 13.02.2004

(24) Дата набуття чинності: 25.09.2007

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 13.02.2003 АТ А 218/2003

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 25.09.2007 А 61 К 38/38
20060101С F I 20070612В H U A C 07 K
1/00 20060101С L I 20070612В H U A

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
РСТ/ЕР2004/001397, 20040213

(72) Винахідник(и):

Герінгер Вернер, АТ,
Пок Катаріна, АТ,
Рьоміш Юрген, АТ,
Сває Тор-Айнар, АТ,
Канніхт Крістоф, DE

(73) Власник(и):

ОКТАФАРМА АГ, СН

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АЛЬБУМІНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання
альбуміну, який характеризується поєднанням
наступних операцій, при яких:

(а) для інактивації вірусу перший водний
розчин альбуміну піддають обробці методом SD
шляхом забезпечення його контакту з реагентами
SD при температурі нижче 45 °С;

(b) видаляють принаймні суттєву кількість
реагентів SD шляхом масляної екстракції з
подальшою хроматографією гідрофобної
взаємодії, при якій для забезпечення проходження
згаданого процесу хроматографії використовують
гідрофобну матрицю, переважно матрицю, з якою

необов'язково можуть бути зв'язані гідрофобні
групи, за умови, що як зазначені групи
використовують аліфатичні групи більш ніж з 24
атомами вуглецю, для одержання другого розчину
альбуміну, до якого

(с) необов'язково додають один або декілька
стабілізаторів, вибраних з групи цукрів,
амінокислот, цукрових етилових спиртів, за умови,
що не використовують як стабілізатор індол і як
такий стабілізатор не застосовують жирні кислоти
C₆-C₁₀, після чого

(d) другий розчин альбуміну, до якого вже
необов'язково був доданий стабілізатор, піддають
остаточному пакуванню та стерильній фільтрації і
необов'язково завантажують у кінцеві контейнери.

Опис винаходу

Даний винахід стосується способу одержання терапевтично придатного альбуміну, який пройшов вірусну інактивацію.

Альбумін є білком плазми з найбільшою масовою часткою. Молекула альбуміну може зв'язуватися з багатьма ендogenousними і екзогенними речовинами. Така зв'язувальна здатність альбуміну є основою однієї із його основних функцій: транспорту речовин, зв'язаних з альбуміном.

Завдяки такій зв'язувальній здатності альбумін є важливим депо для великої різноманітності складів, наприклад, жирних кислот з довгим ланцюгом, білірубину, триптофану, тироксину або іонів металів. Фармацевтично активні речовини, що уводяться, типу варфарину, дігітоксину або напроксену, також зв'язуються з альбуміном і транспортуються.

Однак у зв'язку з цим дуже важливо знати, що тільки вільна фракція відповідної фармацевтично активної речовини, а саме фракція, яка не зв'язана з альбуміном, є фракцією, яка виявляє фармакологічну дію. Зменшення ділянки, зв'язаної з альбуміном, збільшує вільну фракцію і таким чином сприяє підвищенню вказаної фармакологічної активності.

Всі відомі на комерційному ринку препарати альбуміну одержують методом модифікованого фракціонування за Коном (Cohn), який звичайно включає декілька стадій фракціонування. Десятиріччями використовувалась пастеризація (протягом 10 годин при 60 °C) концентрату альбуміну як вірус-інактивуюча стадія. З метою виключення денатурації альбуміну під час вказаної вище стадії були використані стабілізатори. Згідно з Європейською Фармакопеею, як стабілізатори були використані каприлат натрію (октаноат натрію) або N-ацетилтриптофан, або комбінація обох речовин.

З метою одержання препаратів фактора VIII або інших білків плазми, які пройшли вірусну інактивацію, використовують так званий SD-метод, описаний, наприклад, у [патентному документі EP-A- 0 131740]. Цей опублікований опис включений у даний документ як посилання.

На підставі власних досліджень заявника відомо, що зв'язувальна здатність комерційного придатного альбуміну значно понижена порівняно з натуральним альбуміном. Це пояснюється тим, що стабілізатори, які використовуються при пастеризації, зв'язуються з альбуміном і тому займають важливі транспортувальні сайти. Останнє призводить до зниження зв'язувальної здатності. Це означає, що пацієнти, які одержують подібні препарати альбуміну, піддаються дії значно підвищених концентрацій вільної активної речовини, тобто такої речовини, яка не зв'язана з альбуміном, у момент приймання фармакологічно активних речовин, що, природно, означає появу підвищеного ризику підвищення фармакологічних ефектів у пацієнта.

Метою даного винаходу є створення препарату альбуміну, який позбавлений зазначеного вище недоліку.

На фіг.1 показане поглинання альбуміном ультрафіолетового випромінювання від різних джерел залежно від часу елювання у процесі хроматографічного поділу.

На фіг.2 показана зв'язувальна активність альбуміну від різних джерел за присутності різних концентрацій фенілбутазону.

На фіг.3 показана зв'язувальна активність альбуміну від різних джерел за присутності різних концентрацій варфарину.

Дана технічна задача вирішується створенням терапевтично застосовного вірус-інактивованого альбуміну, що має підвищену зв'язувальну здатність стосовно речовин, порівняно з альбуміном, вірус-інактованим методом пастеризації. Зокрема, альбумін, відповідно до даного винаходу, має зв'язувальну здатність, що зросла, щонайменше, на 10% у порівнянні із зв'язувальною здатністю альбуміну, вірус-інактованого методом пастеризації. Звичайно зв'язувальна здатність зростає у межах від 20 до 500%, зокрема, від 100 до 500%. У виняткових випадках можливі навіть більш високі значення залежно від підлягаючої скріпленню речовини.

Речовинами, які зв'язуються або переносяться нативним (природним) альбуміном, зокрема, є низькомолекулярні активні речовини. Прикладами таких низькомолекулярних активних речовин є органічні або неорганічні речовини, нуклеїнові кислоти, поліпептиди, що мають, як правило, молекулярну вагу $\leq 10\,000$ дальтонів (Da).

З метою лікування, як було згадане вище, альбумін за даним винаходом може бути використаний у вигляді рідкого розчину або у вигляді твердого тіла, зокрема, у ліофілізованій формі.

Відповідно до винаходу альбумін може бути одержаний з використанням способу, який характеризується поєднанням наступних операцій, при яких:

(а) для інактивації вірусу перший водний розчин альбуміну піддають обробці методом SD шляхом забезпечення його контакту з реагентами SD при температурі нижче 45°C;

(b) видаляють, принаймні, суттєву кількість реагентів SD шляхом масляної екстракції з подальшою хроматографією гідрофобної взаємодії, при якій для забезпечення проходження згаданого процесу хроматографії використовують гідрофобну матрицю, зокрема матрицю, з якою доволно можуть зв'язуватися гідрофобні групи, за умови, що як зазначені групи використовуються аліфатичні групи більш ніж з 24 атомами вуглецю, для одержання другого розчину альбуміну, до якого (c) доволно додають один або декілька стабілізаторів, обраних з групи цукрів, амінокислот, цукрових етилових спиртів, за умови, що не використовують індол як стабілізатор, а також як такий стабілізатор не застосовують жирну кислоту C₆-C₁₀, після чого

(d) другий розчин альбуміну, до якого вже доволно був доданий стабілізатор, піддають остаточному пакуванню та стерильній фільтрації і доволно завантажують у контейнери.

Термін "стабілізатор типу індол" стосується всіх стабілізаторів, що мають скелет індолу, наприклад, ацетилтриптофан.

Метод SD (= розчинник/детергент), що застосовується для інактивації вірусів, відомий з [патентного документа EP-A-0 131 740]. В описі до даного документа серед інших протеїнів згадувався також й альбумін.

Крім того, з [патентного документа EP-A-0 366 946] відомо, що реагенти SD можуть бути видалені за допомогою рослинних олій, наприклад, соєвої олії з подальшою хроматографією гідрофобної взаємодії. Таким чином, порівняно з суттєвими ознаками способу, розкритого у [патентному документі EP-A-0 366 946], спосіб, поданий у п. 8 формули, слід було б розглядати як аналог способу приготування альбуміну, відповідного одному з аспектів даного винаходу. Проте зазначений вище патент для процесу хроматографії, переважно, як матрицю пропонує, наприклад, матрицю кремнію, з якою зв'язуються гідрофобні бічні ланцюги, тобто відгалужені або не відгалужені ланцюги алкілу C₆-C₂₄.

Несподівано було виявлено, що використання гідрофобної матриці замість матриці, яка несе в собі ланцюги алкілу C₁₈, наприклад, як гідрофобні бічні ланцюги, призводить до більш високої зв'язувальної здатності щодо поглинання детергентів. Отже, відпадає будь-яка потреба у додаткових гідрофобних групах, призначених для зв'язування з матрицею, що використовується згідно з даним винаходом. Тому даний винахід стосується також способу використання такої матриці.

Інактивація вірусу успішно проходить при температурі в діапазоні від 25 до 40°C.

У переважному прикладі здійснення даного винаходу інактивація вірусу здійснюється протягом періоду часу в діапазоні від 4 до 6 годин.

Гліцин виявив себе дуже добрим стабілізатором.

Рицинова олія виявилася дуже підходящою для здійснення процесу масляної екстракції.

Було виявлено, що використання полістиролдивінілбензол-полімеру або полімеру на основі метакрилату як гідрофобної матриці надає процесу очищення особливої ефективності.

Гідрофобні матриці, що застосовуються відповідно до даного винаходу, можуть нести розгалужені або лінійні аліфатичні групи більш ніж з 24 атомами вуглецю.

Залежно від застосовуваного вихідного матеріалу може виявитися необхідною операція виснаження активності так званого активатора прокалікрейну (РКА). РКА відомий своєю здатністю понижувати кров'яний тиск після приймання РКА-вмісних препаратів за рахунок виділення вазоактивної речовини брадикініну із високомолекулярного кініногену (НМВК).

РКА звичайно інактивується під час пастеризації протеїнових препаратів. Як відомо з рівня техніки, теплова обробка, у процесі якої РКА, щонайменше, частково інактивується, чинить несприятливу дію на альбумін, приготовлений відповідно до винаходу. Якщо виникне потреба, із згаданих вище причин РКА може бути видалений завдяки використанню спеціальних методів. Вони включають інкубацію (витримування у термостаті) з активованим вугіллем, після чого здійснюється фільтрація переважно за допомогою глибоких фільтрів або пряма фільтрація через фільтри, що містять активоване вугілля.

Крім того, для видалення РКА дуже зручні іонообмінники, наприклад, катіонообмінники або аніонообмінники. Дана операція може бути успішно здійснена шляхом забезпечення контакту розчину, що містить альбумін, з матрицею в колонках або з використанням групової технології, відомої кваліфікованому фахівцю у даній галузі техніки. Як альтернатива, з метою зниження вмісту РКА можуть бути використані матриця декстрансульфату або гепарину.

В одержаному розчині, що містить альбумін, вміст РКА зменшений і вже не піддається виявленню у кожному оптимальному випадку. Відповідно до даного стану рівня техніки РКА ідентичний активізованому (в результаті коагуляції) фактору XII (FXII), який проведений від його проферментної форми (FXII). Це явище може відбуватися на поверхнях як результат автокаталізу або ферментативної дії, наприклад, калікрейну. Відповідно, виснаження FXII (проферменту), який є попередником РКА, також може бути рекомендоване, але не є обов'язковим. Однак щоб запобігти появі оновленого покоління РКА із проферментної форми, остання також може бути видалена у процесі іонообмінної хроматографії. Виснаження FXII може бути доцільно здійснене з метою забезпечення довгострокового зберігання альбуміну у рідкому стані. Це може виявитися доцільним після розморожування розчину альбуміну, який, можливо, зберігався у замороженому стані. Отже, розчин альбуміну після заповнення контейнерів для зберігання може бути підданий глибокому заморожуванню. Крім того, він може бути охолоджений, і в рідкому або сухому замороженому стані зберігатися при температурі до 40°C.

Таким чином, для видалення РКА або речовин-попередників РКА активність будь-якого активатора прокалікрейну (РКА), яка може бути присутня до та після операцій (а), (b) або (с), може бути ліквідована відомим способом, зокрема, при якому розчин альбуміну:

А) вводять у контакт з активованим вугіллем з наступним видаленням активованого вугілля з розчину альбуміну; або

В) піддають іонообмінній хроматографії.

Операцію (А) здійснюють при концентрації альбуміну від 1 до 25% за вагою, переважно, від 5 до 10% за вагою.

Операцію (В) здійснюють, зокрема, при концентрації альбуміну від 5 до 10% за вагою.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу іонообмінник поданий у вигляді аніонообмінника, і буферну дію на розчин альбуміну чинить ацетат натрію у кількості від 100 до 150ммол/л, при значенні водневого показника рН від 5,0 до 6,0, переважно <5,5.

Ще в одному прикладі здійснення винаходу описаний спосіб, який характеризується тим, що іонообмінник поданий у вигляді катіонообмінника, і буферну дію на розчин альбуміну чинить ацетат натрію у кількості від 20

до 30ммол/л, при значенні водневого показника рН від 4,8 до 6,0, переважно, від 4,8 до 5,2.

Крім того, даний винахід стосується розчину альбуміну, який може бути одержаний при використанні способу за даним винаходом. Даний спосіб може бути застосований для одержання розчинів альбуміну з різних джерел. Наприклад, з плазми крові або сироватки, з фракцій процесу фракціонування плазми, що містять альбумін, з альбуміну, відновленого із супернатанту (спливаючого шару) культури після приготування рекомбінанта, або з альбуміну, приготовленого за трансгенною технологією, або з будь-якого середовища, що містить альбумін, наприклад, з молока.

Далі переважний приклад здійснення винаходу описується за допомогою наступного конкретного процесу.

Приклад

До 1000г водного розчину альбуміну одержаного методом Коена (після діалізації/ультрафільтрації), з вмістом протеїну біля 23% додавали Triton X-100 та три-н-бутилфосфат (TNBP) до одержання 1%-ї концентрації кожного. Після цього розчин альбуміну перемішували при температурі 30°C протягом 4 годин.

З метою видалення реагентів SD спочатку додавали при перемішуванні рицинову олію до одержання 5%-ї концентрації, причому одночасно розчин доводили до температури в діапазоні від 20 до 25°C. Після цього суміш перемішували протягом 30 хвилин. Після перемішування суміші давали можливість відстоятися протягом 60 хвилин з метою формування водної важкої та легкої фаз. Важка фаза відділялася і фільтрувалася через фільтр, обладнаний мембранами з розміром пор <1μм та <0,45μм. Легка фаза (масляна фаза) містить TNBP і відділяється.

З метою відділення Triton X-100 відфільтрований розчин пропускають через екстракційну колонку для вилучення твердої фази. Полістиролдивінілбензол-полімер (Amberchrome CG 161) без гідрофобних бічних ланцюгів використовують як гідрофобну матрицю. Воду для ін'єкцій використовують для промивки колонки, при цьому моніторинг даного процесу здійснюють вимірюванням ультрафіолетового поглинання при 280нм. Після використання колонку відновлюють.

Як стабілізатори можуть бути додані наступні речовини: гліцин, глутамат, аргінін, мальтоза, сорбітол або суміші названих речовин:

Одержаний розчин доводять до досягнення водневого показника рН 7,0; вміст протеїну доводять до 200г/л, а вміст натрію - до 80ммол/л Na⁺. Після цього розчин піддають стерильній фільтрації через мембранний фільтр з розміром пор ≤0,2μм.

Стерильним відфільтрованим розчином заповнюють стерильні апірогенні мішки з полівінілхлориду в асептичних умовах, а самі мішки маркують.

Марковані мішки піддають глибокому заморожуванню при температурі <-60°C, причому температура всередині мішка досягає <-30°C. Мішки зберігають при цій температурі (≤-30°C).

Виснаження прокалікрейну

У той час, коли повинне відбуватися виснаження РКА, можуть бути використані варіанти наступних процедур:

а) розчин альбуміну, що має концентрацію протеїну від 1 до 25% за вагою, переважно, від 5 до 10% за вагою, перемішується протягом однієї години з 3-10% за вагою, переважно, 5% за вагою активованого вугілля при рН = 5. Згодом активоване вугілля відфільтровують;

б) розчин альбуміну, що має концентрацію протеїну від 5 до 10% за вагою, піддають іонообмінній хроматографії (сефароза DEAE, сефароза Q) при рН 5-6, переважно <5,5, у системі з буферною дією, яка забезпечується 100-150мм ацетату натрію. Завдяки високій іонній силі (буфера) у фільтраті одержують розчин альбуміну, звільнений від РКА;

в) розчин альбуміну, що має концентрацію протеїну від 5 до 10% за вагою, піддають іонообмінній хроматографії (Тоуореагі SP, сефароза CM) при рН 5-6, переважно, 4,8-5,2, у системі з буферною дією, яка забезпечується 20-30ммол/л ацетату натрію. У фільтраті одержують розчин альбуміну, звільнений від РКА.

Висновок

Одержані розчини доводяться до стану, що характеризується водневим показником рН = 7,0 кожний, вмістом протеїну 200 г/л і вмістом натрію до 80ммол/л Na⁺. Потім розчин піддають стерильній фільтрації через мембранний фільтр з розміром пор <0,2μм.

Стерильними відфільтрованими розчинами заповнюють стерильні апірогенні мішки з полівінілхлориду в асептичних умовах, а самі мішки маркують.

Марковані мішки піддають глибокому заморожуванню при температурі <-60 °C, при цьому температура всередині мішка досягає <-30°C. Мішки зберігають при цій самій температурі (≤-30 °C).

Вимірювання приєднувальної здатності речовин стосовно різних препаратів з вмістом альбуміну

Безпосереднім методом визначення приєднувальних властивостей речовин стосовно альбуміну є гель-хроматографія (SEC), якщо наслідувати Hummel & Dreyer [Biochim Biophys Acta 1962; 63:530-532].

Отже, колонка SEC зрівноважується буферним розчином, що містить зв'язувальний ліганд (наприклад, феншбутазон або варфарин). Процес поглинання в ультрафіолетовому спектрі піддається безперервному моніторингу. Протеїн надходить у колонку і елююється у зрівноважувальному буферному розчині. Зв'язаний ліганд починає піддаватися елююванню разом з альбуміном, тоді як не зв'язаний ліганд, який у більшості випадків є меншим, починає піддаватися елююванню, відповідно, пізніше. Як правило, поглинання зв'язаного ліганду перешкоджає поглинанню альбуміну та супровідних речовин, якщо вони є, наприклад, стабілізаторів. Чим пізніше з'являється "негативний" або так званий "вільний (vacancy)" пік елюювання, що є результатом виснаження ліганду у наступному буферному розчині, який займає більшу частину поверхні, тим більше виявляється здійснених зв'язків із попередньо елюйованим альбуміном. Koizumi та інші [Biomed Chromatogr 1998;

12: 203-210] використали даний спосіб в дещо видозмінений формі для дослідження зв'язувальної здатності речовин стосовно альбуміну або їх схожості, наприклад, шляхом додання збільшеної кількості ліганду до постійних концентрацій альбуміну в окремих серіях дослідів, в результаті чого зв'язувальна здатність могла бути встановлена у вигляді відношень "альбумін-речовина".

В даних дослідженнях була використана колонка Biosep-SEC-s, 300x4,6мм мікронів (Phebomenex) на установці Shimadzu HPLS. Витрата буферного розчину склала 0,35мл/хв, колонка була зрівноважена 50мМ буферного розчину фосфату калію, рН 7,4. Концентрація протеїну склала 50мМ, обсяг уприскування склав 80 μ л. Фенілбутазон піддавався моніторингу при 263нм, а фарфарин - при 308нм. Спектри лінійного поглинання були позначені наперед.

В даних дослідженнях були використані: альбумін, відповідно до даної заявки (1), а також наявні на комерційному ринку (стабілізовані) препарати з вмістом альбуміну (2,3). Вони були використані у вигляді 20%-их розчинів альбуміну.

На фіг.1 показане розташування чотирьох різних хроматограм. Колонка була зрівноважена у 50мМ фенілбутазону (у буферному розчині фосфату). Із затримкою у часі 11 хвилин спочатку приступили до елююванню альбуміну. Пік вказує на загальну кількість поглиненого протешу та зв'язаної речовини. На 14,5хв. з'являється пік N-ацетилтриптофану (стабілізатора), у випадку використання комерційного альбуміну. По закінченні 18,5хв. з'являється "вільний (vacapsu)" пік у вигляді "негативного" зображення процесу поглинання по відношенню до рівня зрівноважувального буферного розчину, що включає зазначену речовину. Чим вище (мається на увазі негативне зображення) зазначений пік або ширше зона піку, тим більша кількість речовини була зв'язана із попередньо елююваним альбуміном.

На фіг.2 показане схематичне зображення ультрафіолетового поглинання трьох концентрацій фенілбутазону, зв'язаного з альбуміном (після віднімання піку буферного розчину). Таким чином, два комерційних альбуміна (що містять каприлат та N-ацетилтриптофан) і альбумін, приготовлений відповідно до способу за даним винаходом, були піддані хроматографічному дослідженню і порівнянню зв'язувальних властивостей. При порівнянні молярних концентрацій фенілбутазону по відношенню до альбуміну було виявлено, що піки значно ширше як щодо висоти, так і щодо площі у випадку з новим альбуміном. Такий саме висновок напрошується і при аналізі другого прикладу, тобто у випадку використання варфарину, показаного на фіг.3.

Результати досліджень підкреслюють, що відомий на ринку збуту комерційний альбумін поступається альбуміну, описаному у даній заявці на винахід, стосовно зв'язувальних властивостей.

Зв'язувальна здатність колонок RP-18 у порівнянні з полістиролдивінілбензол-полімерами (Amberchrome 161M)

Система досліджень: колонка об'ємом 44 мл. Витрата: 4мл/хв.

Колонку завантажували 1%-им розчином Triton X-100. Вміст Triton X-100 в елюаті виміряли після кожного об'єму колонки за допомогою обернено-фазової рідинної хроматографії високого розділення. Як тільки Triton можна було виявити в елюаті, зв'язувальна здатність гелю виснажувалася.

Результат:

Гель RP-18 зв'язує 140мг гелю Triton X-100/мл, а гель Amberchrome зв'язує 160мг гелю Triton X-100/мл.

Формула винаходу

1. Спосіб одержання альбуміну, що характеризується поєднанням наступних операцій, при яких:

(а) для інактивації вірусу перший водний розчин альбуміну піддають обробці методом SD шляхом забезпечення його контакту з реагентами SD при температурі нижче 45 °C;

(b) видаляють принаймні суттєву кількість реагентів SD шляхом масляної екстракції з подальшою хроматографією гідрофобної взаємодії, причому гідрофобна матриця, переважно матриця, з якою необов'язково можуть бути зв'язані гідрофобні групи, використовується для зазначеної хроматографії, за умови, що зазначеними групами є аліфатичні групи більш ніж з 24 атомами вуглецю, для одержання другого розчину альбуміну, до якого

(c) необов'язково додають один або декілька стабілізаторів, вибраних з групи цукрів, амінокислот, цукрових етилових спиртів, за умови, що як зазначений стабілізатор не використовують індольні стабілізатори та жирні кислоти C₆-C₁₀, після чого

(d) другий розчин альбуміну, до якого вже необов'язково був доданий стабілізатор, піддають остаточному пакуванню та стерильній фільтрації і необов'язково завантажують у кінцеві контейнери.

2. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що інактивацію вірусу здійснюють при температурі в діапазоні від 25 до 40 °C.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який характеризується тим, що інактивацію вірусу здійснюють протягом періоду часу в діапазоні від 4 до 6 годин.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який характеризується тим, що як стабілізатор використовують гліцин, глутамат, аргінін або лізин, або їх комбінації.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який характеризується тим, що як стабілізатор використовують мальтозу і/або сорбіт.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який характеризується тим, що для операції масляної екстракції використовують рицинову олію.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який характеризується тим, що як гідрофобну матрицю використовують

полістиролдивінілбензолний полімер або полімер на основі метакрилату.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який характеризується тим, що розгалужені або лінійні аліфатичні групи з більш ніж 24 атомами вуглецю зв'язані з матрицею.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який характеризується тим, що розчин альбуміну піддають глибокому заморожуванню після заповнення ним кінцевих контейнерів для зберігання зазначеного розчину.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який характеризується тим, що будь-яку активність активатора прекалікрейну (ПКА), яка може бути присутня перед або після операцій (а), (b), (с), ліквідують будь-яким з відомих способів.

11. Спосіб за п. 10, який характеризується тим, що розчин альбуміну: а) піддають контакту з активованим вугіллям, після чого видаляють активоване вугілля з розчину альбуміну; або

(b) піддають іонообмінній хроматографії для ліквідації активності активатора прекалікрейну, яка може бути присутня.

12. Спосіб за п. 11, який характеризується тим, що операцію а) здійснюють при концентрації альбуміну від 1 до 25 мас. %.

13. Спосіб за п. 12, який характеризується тим, що використовують концентрацію альбуміну від 5 до 10 мас. %.

14. Спосіб за п. 11, який характеризується тим, що операцію b) здійснюють при концентрації альбуміну від 5 до 10 мас. %.

15. Спосіб за п. 11 або п. 14, який характеризується тим, що як іонообмінник використовують аніонообмінник, а як буфер для розчину альбуміну використовують ацетат натрію у кількості від 100 до 150 ммоль/л, при цьому рН складає від 5,0 до 6,0.

16. Спосіб за п. 15, який характеризується тим, що $\text{pH} < 5,5$.

17. Спосіб за п. 11 або п. 14, який характеризується тим, що як іонообмінник використовують катіонообмінник, а як буфер для розчину альбуміну використовують ацетат натрію у кількості від 20 до 30 ммоль/л, при цьому значення рН складає від 4,8 до 6,0.

18. Спосіб за п. 17, який характеризується тим, що значення рН знаходиться в діапазоні від 4,8 до 5,2.

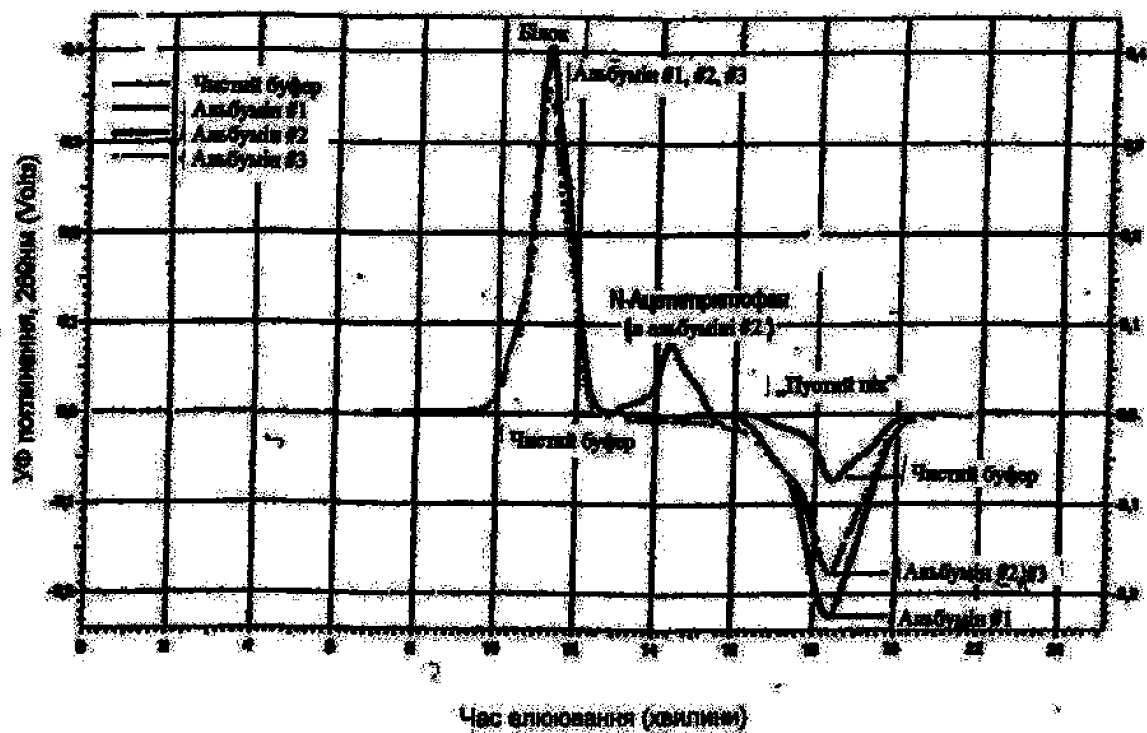


Fig. 1

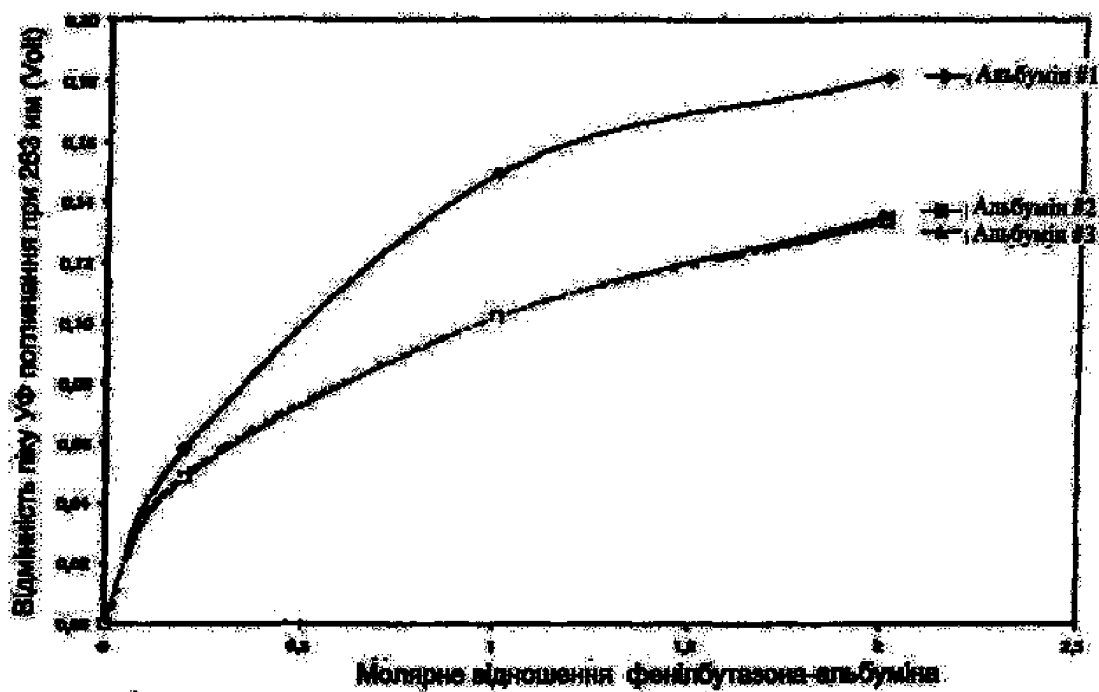
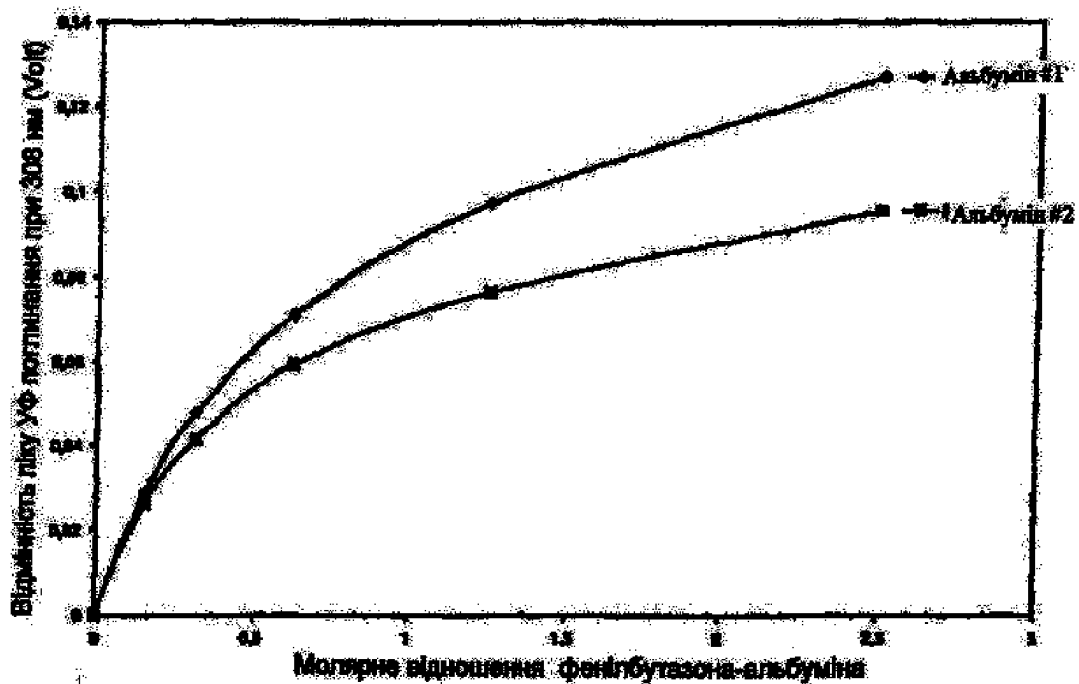


Fig. 2



Фіг. 3

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2007, N 15, 25.09.2007. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.