



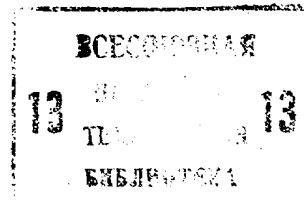
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1375116** **A3**

(51) 4 А 61 К 35/14

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 3611812/28-14
(22) 21.06.83
(31) 392929
(32) 28.06.82
(33) US
(46) 15.02.88. Бюл. № 6
(71) Монсанто Компани (US)
(72) Джон Харпстер Джонсон (US)
(53) 612.015(088.8)
- (56) Biahim. Biophys. Acta, 1981, vol. 668, p. 456-470.
- (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАКТОРА УШ:С СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ
- (57) Изобретение предназначено для выделения препаратов свертывания крови. Цель изобретения - увеличение

выхода целевого продукта. Плазму подвергают адсорбции с применением двух водонерастворимых сшитых полиэлектролитных сополимеров в присутствии гепарина. Смола А - сополимер этилена и малеинового ангидрида, сшитый с метилиминобиспропиламином, содержащий концевые диметиламинопропилимидные группы. Смола Б - сополимер этилена и малеинового ангидрида, сшитый с диметиламинопропилимином. В смоле Б все свободные карбоксильные группы защищены метоксипропиламином. После обработки плазмы крови смолами А и Б получают фильтрат, который концентрируют и частично обессоливают, пропуская через полупроницаемые мембраны. 2 табл.

(19) **SU** (11) **1375116** **A3**

Изобретение относится к медицине, в частности к области фракционирования крови и выделения препаратов свертывания крови.

Цель изобретения - увеличение выхода целевого продукта - фактора УШ:С.

Цель достигается за счет функционирования плазмы крови при определенных значениях pH с использованием двух водонерастворимых сшитых полиэлектролитных сополимеров, применяемых в присутствии экзогенного гепарина.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Кровь человека переливают в пластмассовые мешочки, содержащие противосвертывающее вещество - CPDA-1 (цитратное, фосфатное, декстразовое противосвертывающее вещество с адепином - антикоагулянт-США). Отделяют плазму центрифугированием при силе 500-4000 g в течение 4 ч, при 20-24°C. Порции плазмы по 200 мл замораживают при -20°C.

Самозамороженную плазму подвергают адсорбции при комнатной температуре с применением двух водонерастворимых сшитых полиэлектролитных сополимеров (смола) в присутствии экзогенного гепарина. Смола А - сополимер эквивалентных количеств этилена и малеинового ангидрида, сшитый с 5 мол.% метилиминобиспропиламина, содержащий 90 мол.% концевых диметиламинопропилимидных групп. Смола Б - сополимер этилена и малеинового ангидрида, сшитый с 5 мол.% диметиламинопропилимида, содержащий 5 мол.% концевых диметиламинопропилимидных групп.

В смоле Б все свободные карбоксильные и ангидридные группы защищены метоксипропиламином.

До применения смолу Б предварительно обрабатывают следующим образом.

12 г смолы диспергируют в 200 мл 0,154 М NaCl, содержащего 0,1% альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота (АСК). С помощью 1,0 М лимонной кислоты устанавливают pH 4,0. Диспергирование проводят в течение 3-5 мин при перемешивании. Суспензию отфильтровывают, фильтрат отбрасывают. Получают влажную смоляную фильтр-прессную лепешку, кото-

рую вновь диспергируют в 200 мл NaCl/АСК. Добавляя при перемешивании 1,0 М NaOH, устанавливают pH 5,8.

5 Перемешивание продолжают еще 10 мин. Суспензию отфильтровывают, а влажную лепешку используют для последующего фракционирования.

10 Все растворы, используемые при элюировании и в процессе фракционирования содержат 0,1% АСК.

Натриевую соль свиного гепарина используют в виде раствора ~200 ед/мл в физиологическом растворе.

15 Процесс фракционирования осуществляют следующим образом.

20 Один мешочек (т.е. 200 мл) свежей замороженной плазмы быстро оттаивают, помещая его в перемешиваемую водяную баню при 37°C. Затем добавляют в смесь 1 мл раствора гепарина (т.е. 200 ед), перемешивают смесь 3-5 мин. Отбирают пробу для проведения испытания на коагуляцию (регистрируют объем и время). Контрольные пробы идентичны испытуемым, однако без добавления гепарина в плазму.

25 К плазме добавляют 70 мг смолы А, значение pH доводят до 8,0 с помощью 1 М NaOH, выдерживая это значение pH при перемешивании смеси в течение 20 мин. Затем смесь фильтруют, полученный фильтрат содержит большую часть активности фактора УШ:С.

35 Мокрую смоляную лепешку промывают 20 мл дистиллированной воды, перемешивают 5 мин, фильтруют и два полученных фильтрата собирают и испытывают на фактор УШ:С. Регистрируют объем активности для подсчета общего количества единиц коагулирования.

40 К фильтрату добавляют предварительно обработанную смолу Б (12 г), добавкой 1 М лимонной кислоты доводят pH до 5,8 и суспензию перемешивают 20 мин, выдерживая pH 5,8. Суспензию отфильтровывают, осадок промывают 200 мл 0,002 М NaCl. Затем осадок диспергируют в 200 мл 0,3 М NaCl, устанавливают pH 5,8, суспензию перемешивают 5 мин, снова фильтруют, промывают осадок дополнительными 200 мл 0,3 М NaCl, а фильтрат отбрасывают.

55 Фильтрованный осадок вновь диспергируют в 200 мл растворителя для элюирования, содержащего 1,5 М NaCl, 0,1 М лизин и 0,1% АСК. Устанавливают pH 6,0 и перемешивают суспензию

20 мин. Суспензию отфильтровывают и осадок промывают 20 мл растворителя элюирования, после чего отбирают пробу фильтрата для испытания на коагуляцию, как указано в табл. 1.

Фильтраты, содержащие 40-70% первоначальной свертывающей активности фактора УШ:С в очищенном виде, концентрируют и частично обессоливают, пропуская через полупроницаемые мембраны (Millipore Pellicon Cassette filtration system или Amicon DH4 hollow fiber concentrator system).

Концентрированный раствор сушат вымораживанием и упаковывают для их хранения.

В табл. 1 приведены результаты нескольких проходов фракционирования с использованием собранной плазмы стабилизированной СРДА, иллюстрирующие благоприятное действие добавления гепарина к плазме в сочетании с использованием смол А и Б.

Определение фактора УШ:С осуществляют путем индикации начала процесса свертывания. Измеряют вторую производную скорости коагулирования (т.е. скорости изменения скорости коагулирования). В качестве контроля используют плазму, в которой отсутствует фактор УШ:С, при этом в качестве активатора используют эллаговую кислоту.

Определяют время коагулирования на серийных разбавлениях используемых фракционированных проб. Полученные результаты выражают как процент выделения активности фактора УШ:С, считая на степень активности первоначально собранной пробы плазмы. Первоначальная проба считается содержащей 1 ед активности коагулирования

фактора УШ:С на 1 мл. Каждое из испытаний начинали с общего количества 200 ед коагулирования. Наконец регистрируют кумулированную единицу и процент выделения активности после каждой обработки смолой.

Пример 2. Способ осуществляют, как описано в примере 1, за тем исключением, что к исходной плазме до обработки смолой А и к фильтрату до обработки смолой Б добавляют три разные концентрации гепарина.

Результаты представлены в табл. 2.

Формула изобретения

Способ получения фактора УШ:С свертывания крови путем фракционирования его из крови адсорбцией на водонерастворимом шитом полиэлектролитном сополимере с последующим элюированием целевого продукта с адсорбента, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода целевого продукта, плазму крови при pH 8,0 смешивают с 0,035 мас.% сополимера этилена и малеинового ангидрида, шитого в присутствии 0,1-1,0 МЕ/мл гепарина с 5 мол.% метилиминбиспропиламина, содержащего 90 мол.% концевых диметиламинопропилимидных групп, с последующим отделением супернатанта, в который при pH 5,8 добавляют 6% сополимера этилена и малеинового ангидрида, шитого с 5 мол.% метилиминобиспропиламина, содержащего 5 мол.% концевых диметиламинопропилимидных групп, при этом свободные карбоксильные и ангидридные группы блокируют добавлением метоксипропиламина в присутствии 0,1-1,0 МЕ/мл гепарина.

Таблица 1

Серия испытаний	Единицы, элюированные из смолы А	Активность, выделенная из смолы А, %	Единицы, элюированные из смолы Б	Активность, выделенная из смолы Б, %*
1	2	3	4	5

Контрольные пробы без добавки гепарина

1	145	72,5	88	44,0
2	137	68,5	76	38,0
3	106	53,0	41	20,5

1	2	3	4	5
4	144	72,0	84	42,0
5	105	52,5	93	46,5
M±m	127±20	63,7±10,1	76,0±21,0	38,2±10,4
Пробы, обработанные гепарином (1,03 ед/мл)				
6	171	85,5	118	59,0
7	190	95,0	120	60,0
8	166	83,0	112	56,0
9	164	82,0	109	54,5
10	204	102,0	139	69,5
M±m	188±27,0	93,9±13,5	120±12,0	59,8±5,9

* В пересчете на активность первоначальной плазмы.

Т а б л и ц а 2

Активность	Количество добавленного гепарина, ед/мл		
	1,0	0,5*	0,1
Активность, выделенная из смола А, %	91±6	81	96±14
Кумулированная активность, выделенная из смола В, %	53±17	48	53±5

* Одна серия испытаний.

Редактор М. Недолуженко Составитель А. Агуреев Техред Л. Сердюкова Корректор М. Максимишинец

Заказ 622/57

Тираж 655

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4