



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013134696, 24.07.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.07.2013Дата регистрации:
11.10.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.08.2012 US 61/681,265

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2015 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 11.10.2017 Бюл. № 29

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

ЛЕБИНГ Витольд (US),
БЕРНС Даг (US),
РОТ Нейтан (US),
ХОТТА Джоан (US)

(73) Патентообладатель(и):

ГРИФОЛЬС, С.А. (ES)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 1479393 A1, 21.11.2003. EP
0696595 A1, 14.02.1996. WO 00/56768,
28.09.2000.

(54) ИНАКТИВАЦИЯ ВИРУСОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ КАПРИЛАТА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу приготовления альбумина плазмы крови для фармацевтического применения и к способу инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин. Способ приготовления альбумина плазмы крови для фармацевтического применения включает следующие стадии: (i) получение элюата фракции IV-1 или фракции Коэна V; (ii) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше чем 5 мас.%; (iii) доведение значения pH раствора до значения pH, составляющего 5 или меньше; (iv) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия до концентрации 20 мМ; (v) повышение температуры раствора до 27-30°C; (vi) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин, с последующим фильтрованием раствора;

выполнением ультрафильтрации и диафильтрации; составлением и увеличением объема раствора; стерилизацией, наполнением емкостей и пастеризацией альбумина. Способ инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин, включает следующие этапы: (i) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше чем 5 мас.%; (ii) доведение значения pH раствора до значения pH, составляющего 5 или меньше; (iii) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия; (iv) повышение температуры раствора до 27-30°C и (v) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин. Группа изобретений обеспечивает уменьшение риска передачи переносимых кровью вирусов, при этом уменьшается время процесса очистки альбумина. 4 н. и 12 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013134696, 24.07.2013**(24) Effective date for property rights:
24.07.2013Registration date:
11.10.2017

Priority:

(30) Convention priority:
09.08.2012 US 61/681,265(43) Application published: **27.01.2015** Bull. № 3(45) Date of publication: **11.10.2017** Bull. № 29

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
sektiya 1, etazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**LEBING Vitold (US),
BERNS Dag (US),
ROT Nejtan (US),
KHOTTA Dzhoan (US)**

(73) Proprietor(s):

GRIFOLS, S.A. (ES)(54) **VIRUSES INACTIVATION OF WITH APPLICATION OF CAPRYLATE**

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: method for blood plasma albumin preparation for pharmaceutical use includes the following steps: (i) obtaining an eluate of fraction IV-1 or a Cohen F fraction; (ii) adjustment of the albumin solution concentration to a value of less than 5 wt %; (iii) solution pH adjustment to a pH of 5 or less; (iv) caprylic acid (octanoic acid) or sodium caprylate addition to a concentration of 20 mM; (v) solution temperature increasing to 27-30°C; (vi) solution incubation for 30-120 minutes, followed by solution filtration; ultrafiltration and diafiltration; solution

volume composition and increasing; sterilisation, containers filling and albumin pasteurization. A method for viruses inactivation in an albumin-containing solution comprises the following steps: (i) adjustment of albumin solution concentration to a value of less than 5 wt %; (ii) solution pH adjustment to a pH of 5 or less; (iii) caprylic acid (octanoic acid) or sodium caprylate addition; (iv) solution temperature increasing to 27-30°C and (v) solution incubation for 30-120 minutes.

EFFECT: reduced risk of blood-borne viruses transmission, reduced time of albumin purification.

16 cl, 7 dwg, 4 tbl, 4 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Здесь описаны способы инактивации вирусов с применением каприлата, во время очистки альбумина плазмы.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Человеческий сывороточный альбумин (далее - альбумин) является самым распространенным белком в плазме крови человека. Циркулирующий в крови альбумин представляет собой белок с 585 аминокислотами с молекулярной массой, составляющей 67 кДа. Белок имеет время полужизни в сыворотке, составляющее приблизительно 20 дней, и принимает участие в переносе многих гормонов, метаболитов, а также
10 лекарственных средств, так же как и в поддержании онкотического давления и в буферировании значения рН крови. Альбумин вводят терапевтически, чтобы заменить утерянную жидкость и восстановить объем крови при травме, ожоге и в случае хирургических пациентов.

Коэн первым описал очистку альбумина плазмы крови человека посредством
15 дифференциального фракционирования. См. Cohn и др., J.. Chem. Soc. 68: 459-475 (1946); Cohn и др., J.. Chem. Soc. 69:1753-1761 (1947); патенты США №2390074 и 2469193. Эти способы были улучшены Герлафом (Gerlough). См. патент США №2710293 и 2710294. В указанных способах применяют холодный этанол и осуществляют преобразование значения рН, ионной силы, концентрации белка, а также температуры, для того чтобы
20 осадить белки плазмы крови, такие как альбумины.

Процедура очистки альбумина плазмы крови человека, для применения в фармацевтических продуктах, обычно включает стадию инактивации вирусов, для того чтобы уменьшить риск передачи переносимых кровью вирусов. Указанные стадии инактивации вирусов могут включать пастеризацию с использованием высокой
25 температуры, применение органических растворителей или комбинаций органических растворителей и детергентов (например, три-н-бутилфосфат и полисорбат 80). Кроме того, производное каприловой кислоты, или ее соль (например, каприлат натрия), эффективно применяли в качестве агента инактивации вирусов. См. патент США №4939176; публикации международных заявок на патент № WO 1998/024485 и WO 2000/
30 056768; Lundblad и Seng, Vox Sang. 60: 75-81 (1991); Johnston, Jonstone, & Wu, Biologicals 31: 213-221 (2003). Кроме того, каприлат также применяли в качестве стабилизирующего агента и в качестве агента разделения при очистке человеческого альбумина для терапевтических целей. См. патенты США №5250663 и 5561115.

Человеческий альбумин выделяют из эффлюента фракции Коэна IV-1 или фракции
35 V и указанное включает стадию сушки с использованием ацетона, для того чтобы сконцентрировать альбумин и инактивировать вирусы. Способ с использованием ацетона является дорогим и в нем применяют большое количество ацетона, что создает опасность взрыва или возгорания. Соответственно, имеется потребность в альтернативных способах инактивации вирусов и концентрирования. Способ очистки
40 альбумина плазмы крови человека с применением каприлата для инактивации вирусов в условиях низкого значения рН и повышенной температуры, сопровождаемый ультрафильтрацией/диафильтрацией, описан здесь.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Здесь описаны способы инактивации вирусов с применением каприлата во время
45 очистки альбумина плазмы.

Один вариант осуществления изобретения, описанный здесь, представляет собой способ получения альбумина из раствора, содержащего альбумин, который содержит: доведение концентрации белка раствора до значения, составляющего меньше чем

приблизительно 5%; доведение значения рН раствора до значения рН, составляющего приблизительно 5 или меньше; добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия; повышение температуры раствора до значения, составляющего больше чем приблизительно 20°C; и инкубацию раствора.

5 В некоторых аспектах, описанных здесь, температура инкубации составляет 27-30°C.

В некоторых аспектах, описанных здесь, инкубацию проводят на протяжении приблизительно 30 минут - приблизительно 120 мин.

В некоторых аспектах, описанных здесь, инкубацию проводят, по крайней мере, на протяжении приблизительно 90 мин.

10 В некоторых аспектах, описанных здесь, концентрация каприлата составляет приблизительно 10 мМ - приблизительно 40 мМ.

В некоторых аспектах, описанных здесь, концентрация каприлата составляет приблизительно 15 мМ - приблизительно 30 мМ.

15 В некоторых аспектах, описанных здесь, концентрация каприлата составляет приблизительно 20 мМ.

В некоторых аспектах, описанных здесь, значение рН составляет приблизительно 3.8 - приблизительно 5.

В некоторых аспектах, описанных здесь, значение рН составляет приблизительно 5.

В некоторых аспектах, описанных здесь, способ дополнительно содержит:

20 фильтрование раствора; выполнение ультрафильтрации и диафильтрации; составление и увеличение объема раствора; а также стерилизацию, наполнение емкостей, и пастеризацию альбумина.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный здесь, представляет собой способ получения альбумина из раствора, содержащего альбумин, который содержит:
25 доведение концентрации белка раствора до значения, составляющего меньше чем приблизительно 5%; доведение значения рН раствора до значения рН, составляющего приблизительно 5 или меньше; добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия до концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; повышение температуры раствора до приблизительно 27-30°C и инкубацию раствора
30 на протяжении, по крайней мере, приблизительно 30 минут - приблизительно 120 мин.

В некоторых аспектах, описанных здесь, инкубацию проводят, по крайней мере, на протяжении приблизительно 90 мин.

В некоторых аспектах, описанных здесь, значение рН составляет приблизительно 5.

В некоторых аспектах, описанных здесь, способ дополнительно содержит:

35 фильтрование раствора; выполнение ультрафильтрации и диафильтрации; составление и увеличение объема раствора; а также стерилизацию, наполнение емкостей, и пастеризацию альбумина.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный здесь, представляет собой способ инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин, при этом способ
40 содержит: доведение концентрации белка раствора до приблизительно 5% белка; доведение значения рН раствора до значения, составляющего меньше чем приблизительно 5; добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия; повышение температуры раствора до значения, составляющего больше чем приблизительно 20°C; и инкубацию раствора.

45 В некоторых аспектах, описанных здесь, вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке.

В некоторых аспектах, описанных здесь, концентрация каприлата составляет приблизительно 15 мМ - приблизительно 30 мМ.

В некоторых аспектах, описанных здесь, температура составляет приблизительно 27-30°.

В некоторых аспектах, описанных здесь, инкубацию проводят, по крайней мере, на протяжении 90 мин.

5 В некоторых аспектах, описанных здесь, концентрация каприлата составляет 20 мМ. В некоторых аспектах, описанных здесь, инкубацию проводят на протяжении 90 мин.

В некоторых аспектах, описанных здесь, температура составляет 30°С.

10 В некоторых аспектах, описанных здесь, вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке, поражающие людей.

Другой вариант осуществления изобретения, описанный здесь, представляет собой способ инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин, при этом способ содержит: доведение концентрации белка раствора приблизительно до 5% белка; доведение значения рН раствора до значения, составляющего меньше чем
15 приблизительно 5; добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия до концентрации, составляющей приблизительно 20 мМ; повышение температуры раствора до значения, составляющего приблизительно 27-30°С; и инкубацию раствора, по крайней мере, на протяжении 90 мин.

20 В некоторых аспектах, описанных здесь, вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке, поражающие людей.

В некоторых аспектах, описанных здесь, способ дополнительно содержит: фильтрование раствора; выполнение ультрафильтрации и диафильтрации; составление и увеличение объема раствора; а также стерилизацию, наполнение емкостей и пастеризацию альбумина.

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГУРА 1 иллюстрирует результаты инактивации вирусов с применением каприлата в 25 ОЕ (оптических единиц) суспензий пасты альбумина при температуре 27°С, значении рН 5.1, на протяжении 1 часа. Концентрации каприлата, составляющие 0, 10, 15 и 20
30 мМ, устанавливали через интервалы времени, составляющие 0, 0,5, и 1 час. Результаты показывают, что 15 мМ каприлата эффективно инактивирует вирус бычьей вирусной диареи и вирус везикулярного стоматита вплоть до предела обнаружения, на протяжении 1 часа при температуре 27°С.

ФИГУРА 2 иллюстрирует результаты инактивации вирусов с применением 20 мМ каприлата при концентрации альбумина 25 или 65 ОЕ, при значении рН, составляющем
35 либо 4.5, либо 5.1, и при трех значениях низких температур, составляющих 5, 12, и 20°С, на протяжении периода в 6 часов. Результаты показывают, что при более низких концентрациях альбумина, 20 мМ каприлата были эффективны в качестве средства, инактивирующего вирусы, при температуре 20°С после 2 часов. Однако инактивация вирусов не была надежной при более низких температурах и зависела от значения рН,
40 времени инкубации, и концентрации альбумина.

ФИГУРА 3 иллюстрирует данные построения опыта (ПО) и расчетные величины логарифмического уменьшения (ВЛУ) для концентрации белка, в зависимости от концентрации каприлата (Блок А), при постоянной температуре (27,5°С) и постоянном значении рН (4.5). Блок В иллюстрирует данные и расчетные ВЛУ для значений рН, в
45 зависимости от концентрации каприлата, при постоянной температуре (27,5°С) и концентрации белка (11,5%).

ФИГУРА 4 иллюстрирует данные ПО и расчетные ВЛУ для значений рН, в зависимости от концентрации белка, при постоянной температуре (27,5°С) и

концентрации каприлата (20 мМ).

ФИГУРА 5 показывает диаграмму изолиний, представляющую поверхность отклика для ВЛУ при 95 и более доверительных интервалах для значений рН, в зависимости от концентрации белка, при 30 мМ каприлата и температуре 40°С (Блок А). Блок В показывает трехмерное представление поверхности отклика. ВЛУ была максимальной (т.е., 100%) с наименьшим интервалом предсказания, составляющим 95%, где значение рН составляло 4.4 и концентрация белка составляла 5%, каприлат составлял 30 мМ и температура составляла 40°С.

ФИГУРА 6 показывает диаграммы изолиний, представляющие поверхность отклика для ВЛУ при 95 и более доверительных интервалах для концентрации белка, в зависимости от концентрации каприлата, при значении рН, составляющем 3.96, и температуре 40°С (Блок А) или для значения рН, в зависимости от концентрации каприлата, при 6,6% белка и температуре 36,9°С (Блок В).

ФИГУРА 7 показывает схему последовательности операций модифицированного способа очистки альбумина, который включает стадию инактивации вирусов с применением каприлата.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ

Существующий способ очистки альбумина включает стадию сушки с использованием ацетона. Стадия сушки с использованием ацетона была признана в качестве стадии инактивации вирусов. Однако стадия с использованием ацетона является сложной, требует дорогого производственного оборудования, а также присутствие большого количества используемого ацетона несет опасность воспламенения и/или взрыва, что вызывает необходимость больших мер предосторожности. Замена стадии сушки с использованием ацетона является желательной. Инкубация с применением каприлата, описанная здесь, может применяться в качестве стадии инактивации вирусов, после чего может быть выполнено концентрирование альбумина с применением стадии ультрафильтрации/диализации.

Каприловая кислота (каприлат; октановая кислота) может представлять собой эффективный агент инактивации вирусов. Кроме того, в настоящее время каприлат применяют в технологии приготовления альбумина, и, таким образом, инактивация вирусов с применением каприлата может быть просто включена в процесс приготовления альбумина, без применения дополнительных реактивов, таких как растворители или детергенты, и с минимальными изменениями самого процесса.

Каприловую кислоту или каприлат натрия добавляют во время технологического процесса приготовления альбумина в качестве стабилизатора во время стадии увеличения объема. При этом значение рН раствора альбумина в повышенном объеме является слишком высоким (~7) для того, чтобы образовать достаточно свободной каприловой кислоты для инактивации вирусов. Каприлат может быть добавлен во время суспендирования пастообразной фракции V (пастообразный альбумин), которая уже представляет собой раствор с низким значением рН. Поскольку каприлат по существу является стабилизатором альбумина, его действие на альбумин является минимальным. Подходящее фильтрование перед ультрафильтрацией/диализацией удаляет большую часть каприлата в виде неразбавленной каприловой кислоты. Так как обработка альбумина продолжается на стадиях ультрафильтрации/диализации, то значение рН будет повышено, и каприлат натрия будет вымыт диализацией, что даст нормальное увеличение объема альбумина.

В целом, модифицированный способ приготовления альбумина состоит из применения эффлюента фракции IV-1 (или фильтрата) или пастообразной фракции Коэна V в

качестве исходного материала. Пастообразную фракцию Коэна V повторно суспендируют в холодной воде для инъекций, или эффлюент фракции IV-1 разбавляют до концентрации белка, составляющей приблизительно 25 ОЕ (A_{280}). Каприлат натрия добавляют к концентрации каприлата, составляющей 20 мМ, и, в случае необходимости, значение рН доводят до значения, составляющего меньше чем рН 5. Затем раствор инкубируют при температуре 27-30°C на протяжении 90 мин, См. Фигуру 7.

Для того чтобы протестировать виروцидную эффективность, выполняли опыты инактивации вирусов с панелью покрытых оболочкой вирусов (а именно, вирусом бычьей вирусной диареи (BVDV), вирусом псевдобешенства (PRV) и вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)) в суспензии фракции Коэна V и в суспензии альбумина, с применением модели предложенного производственного процесса в уменьшенном масштабе. Пастообразную фракцию V или пастообразный альбумин суспендировали в воде, в которую вводили приблизительно 5% вируса, и рН доводили до соответствующего значения, в случае необходимости. Добавляли каприлат натрия, чтобы достичь заданной концентрации каприлата, проверяли значение рН раствора, и раствор инкубировали при соответствующей температуре. Образцы отбирали в разные моменты времени во время инкубации и титровали с применением клеточных анализов для определения количества инфекционного вируса. Быстрая и эффективная инаktivация BVDV, PSV, и ВИЧ наблюдалась при соответствующем значении рН, концентрации каприлата, концентрации белка и соответствующей температуре.

Технологические возможности оценивали отдельно как для суспензии Фракции V, так и для суспензии пастообразного альбумина, с применением уменьшенного масштаба (500 г пастообразной суспензии) предложенного производственного процесса. Добавляли каприлат натрия, и, при необходимости, значение рН доводили до достижения заданной концентрации каприлата и значения рН. После инкубации, материал отфильтровывали, обрабатывали с применением ультрафильтрации/диафильтрации, составляли, увеличивали в объеме, стерилизовали фильтрованием, и пастеризовали. Характеристики промежуточного и конечного продукта, полученные в результате лабораторного исследования модифицированного способа, были сопоставимы с характеристиками, полученными в результате контрольного лабораторного опыта, а также с характеристиками, полученными в результате существующего полномасштабного производственного процесса.

Лабораторную демонстрацию модифицированного способа проводили с применением фракции Коэна V или пастообразного альбумина. Приблизительно 500 г пасты сначала разбавляли холодной водой для инъекций. Затем разбавленную пасту нагревали до температуры ~27°C, и добавляли каприлат натрия до концентрации ~20 мМ. Этот разбавленный основной объем раствора подвергали инкубированию на протяжении 90 минут, для того чтобы произошла инаktivация вирусов. Очищение раствора альбумина от примесей достигали при помощи фильтрования через ряд фильтров. Затем очищенный раствор альбумина концентрировали до ~12% в отношении массы к объему посредством ультрафильтрации, при этом основной объем белка диафильтровали с применением солевого раствора и холодной воды для инъекций. Концентрация белка, составляющая ~28%, была достигнута при помощи второй стадии ультрафильтрации. Затем ультрафильтрованный/диафильтрованный основной объем раствора белка составляли посредством добавления гидроксида натрия, триптофана и каприлата натрия. Составленный основной объем раствора стерилизовали фильтрованием, наполняли им флаконы, закупоривали и запаивали. Указанные флаконы затем пастеризовали при температуре 60°C на протяжении 10-11 часов, для того чтобы

получить итоговое содержимое флаконов.

Было неожиданным обнаружить, что каприлат может действовать как в качестве средства, инактивирующего вирусы, так и в качестве стабилизатора одновременно, во время процесса с применением определенных концентраций белка и каприлата, а также продолжительности и температуры инкубации. Указанное также было неожиданным, по той причине, что альбумин связывает каприлат, и при этом концентрации каприлата были эффективными для инактивации вирусов при средних концентрациях белка с коротким периодом инкубации при комнатной температуре.

Существующий способ очистки альбумина, который включает стадию сушки с использованием ацетона, описан в Примере 1, и его начинают с эффлюента фракции Коэна IV-1 или фракции V. См. Cohn и др., J. Am. Chem. Soc. 68: 459-475 (1946); Cohn и др., J. Am. Chem. Soc. 69: 1753-1761 (1947); патенты США №2390074 и №2469193.

Пример 1

Подготовка человеческого альбумина

Фракцию Коэна V суспендировали в холодной воде для инъекций. В качестве альтернативы, вместо фракции V может применяться эффлюент IV-1. Для того чтобы получить раствор спирта, составляющий приблизительно 10%, добавляли холодный денатурированный этанол (SDA-3A), охлаждая раствор до температуры, составляющей приблизительно 0°C. Раствор перемешивали на протяжении приблизительно 1 часа при температуре, составляющей приблизительно 0°C, и затем очищали с помощью глубинного фильтрования.

Затем фракцию альбумина осаждали из эффлюента IV-1 или фракции V посредством регулирования значения pH, добавляя холодный денатурированный этанол (SDA-3A), и инкубируя раствор при низкой температуре. После инкубации с применением низкой температуры, фракцию альбумина выделяли при помощи центрифугирования.

Инактивация вирусов с применением ацетона

Фракцию альбумина затем суспендировали в холодном ацетоне и выдерживали на протяжении нескольких минут при температуре приблизительно 0°C. Белок выделяли из суспензии и промывали холодным ацетоном. Сырой порошок альбумина подвергали сушке посредством пропускания сухого азота и/или воздуха через порошок.

Концентрирование и фильтрование

Высушенный порошок альбумина разбавляли холодной водой для инъекций до концентрации белка, составляющей приблизительно 7%. Раствор альбумина очищали при помощи фильтрования через ряд фильтров, расположенных в последовательном порядке, где заключительный абсолютный фильтр имел пористость, составляющую 0,2 мкм (по мере необходимости, для того чтобы способствовать фильтрованию, применяли диатомит). Значение pH раствора альбумина доводили до значения pH, составляющего приблизительно 7, ультрафильтровали, чтобы сконцентрировать раствор приблизительно в два раза, и затем диафильтровали с использованием 3% NaCl, и затем воды для инъекций. Затем раствор альбумина, в случае необходимости, концентрировали посредством применения ультрафильтрования до соответствующей концентрации белка (прибл. 25%).

Увеличение объема, стерилизация, наполнение в емкости и пастеризация

Водный основной объем альбумина составляли посредством регулирования ультрафильтрованного/диафильтрованного раствора альбумина с помощью добавления каприлата натрия, наполнителей, гидроксида натрия, хлорида натрия, а также воды для инъекций, чтобы достичь 20 mM каприлата натрия, 25% концентрации белка и значения pH 7. Значение pH доводили с помощью использования 1,0 M карбоната

натрия и/или 1,0 М HCl, в случае необходимости.

Раствор альбумина стерилизовали при помощи фильтрования через ряд фильтров, расположенных в последовательном порядке, где заключительный абсолютный фильтр имел пористость, составляющую 0,2 мкм. Стерильным раствором альбумина в стерильных условиях наполняли стерильные емкости и пастеризовали на протяжении приблизительно 10 часов при температуре приблизительно 60°C. Итоговое содержимое емкостей инкубировали при температуре 25°C на протяжении приблизительно двух недель и затем хранили при комнатной температуре.

Пример 2

Опыты инаktivации вирусов

Обработка ацетоном пастообразного альбумина является очень эффективной стадией инаktivации покрытых оболочкой вирусов, но при этом является острой проблемой указанного процесса, и связана со многими проблемами очистки и безопасности (пожароопасности). По этой причине обработка каприлатом является возможной альтернативой образованию суспензии ацетона и ее сушки. Опыты проводили для того, чтобы определить инаktivацию покрытых оболочкой вирусов вследствие обработки пастообразной суспензии альбумина каприлатом. С целью исследования, в пастообразную суспензию альбумина, где концентрация белка составляла 25 ОЕ, вводили вирус бычьей вирусной диареи (BVDV) или вирус везикулярного стоматита (VSV), и инкубировали на протяжении 1 часа при температуре 27°C, значении pH 5.1, с применением 0, 10, 15, или 20 мМ каприлата. Данные показывают инаktivацию вирусов до предела обнаружения, после обработки с применением 15 мМ каприлата. См. Таблицу 1 и Фигуру 1.

Таблица 1												
Опыты инаktivации вирусов												
Логарифмический титр вируса												
t (ч)	SP-BVDV				SUPE-BVDV				SP-VSV			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	0	10	15	20	0	10	15	20	0	10	15	20
	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ	мМ
0,0	6,3	6,3	6,3	5,1	6,3	6,1	6,1	5,2	7,0	6,6	6,4	5,6
0,5	5,9	4,7	1,8	1,8		5,5	1,8	1,8	5,6	3,4	1,8	1,8
1,0	6,0	4,2	0,7*	0,7*	5,9	4,0	0,7*	0,7*	6,3	2,9	0,7*	0,7*
ВЛУ	0,3	2,1	≥5,6	≥5,6	0,4	2,1	≥5,4	≥5,4	0,7	4,1	≥6,3	≥6,3

* Тестирование увеличенного объема; подчеркнутые значения = неопределяемый вирус

Пример 3

Опыты проводили, чтобы определить вицидную способность каприлата при низких температурах. Пастообразные суспензии альбумина и фракции V разбавляли до 25 и 65 оптических единиц (ОЕ), и каприлат натрия добавляли до конечной концентрации, составляющей 20 мМ. Раствор доводили до значения pH, составляющего 4.5 или 5.1, и вводили BVDV с отрегулированным значением pH, после чего выполняли инкубацию при температуре 5, 12, или 20°C. Образцы для титрования, с отрегулированным значением pH и/или концентрацией белка (т.е., A₂₈₀), отбирали сразу после введения вируса (0 часов) и по истечении 0,5, 2 и 6 часов.

И для пастообразной суспензии альбумина и для пастообразной суспензии фракции V инаktivация вирусов с применением каприлата была большей при более высоких температурах и при более низких концентрациях белка. См. Фигуру 2. Для суспензий фракции V при 25 ОЕ и 65 ОЕ инаktivация вирусов была выше при значении pH 4.5, чем при значении pH 5.1. Инаktivация вирусов была также выше при значении pH 4.5

для суспензий альбумина при 25 ОЕ. Для суспензий альбумина при 65 ОЕ, тем не менее, инактивация вирусов была больше при значении рН 5.1, чем при значении рН 4.5. Поскольку механизм инактивации вирусов с применением каприлата приписывают неионизированной форме каприлата, и концентрации неионизированной формы должны
5 быть выше при значении рН 4.5, чем при значении рН 5.1, то результаты с 65 ОЕ альбумина были неожиданными.

Инактивация вирусов зависит от значения рН, времени воздействия, концентрации белка и состава продукта. В отличие от обработки при температуре 27°C на протяжении 30 минут, где происходила инактивация BVDV до значения, ниже предела обнаружения
10 (данные не показаны), обработка при температуре 5°C при оптимальных условиях (25 ОЕ, рН 4.5) требовала 2 часа для полной инактивации BVDV. При температуре 5°C стадия инкубации альбумина/фракции V с применением каприлата для инактивации покрытых оболочкой вирусов была неэффективной.

Пример 4

15 Построение опыта по исследованию переменных процесса инактивации вирусов

Построение опыта, основанное на полученных вначале результатах инактивации вирусов с применением каприлата в образцах альбумина или фракции V, выполняли для исследования, проводимого с целью определения условий, которые максимально повышают вицицидное действие. Переменные, которые оптимизировали, представляли
20 собой концентрацию альбумина (5%-20%); концентрацию каприлата (10 мМ - 30 мМ); значение рН раствора (3.8-5.5); температуру инкубации (20°C-40°C) и время инкубации (10 минут и 120 минут). Зависимые переменные представляли собой величину логарифмического уменьшения вируса (ВЛУ), концентрацию альбумина, агрегирование (% мономера) и концентрацию гаптоглобулина. Линейное построение опыта было
25 составлено так, чтобы протестировать три уровня каждой переменной (т.е., Низкий, Средний и Высокий; см. Таблицу 2).

Таблица 2:

Переменные построения опыта			
Переменная	Уровень переменной	Начальные параметры	Конечные параметры
Концентрация альбумина (± 1 ОЕ)	Низкая	26,5 ОЕ (5%)	26,5 ОЕ (5%)
	Средняя	66,25 ОЕ (12,5%)	60,95 ОЕ (11,5%)
	Высокая	106 ОЕ (20%)	95,4 ОЕ (18%)
Концентрация каприлата	Низкая	3 мМ	10 мМ
	Средняя	16,5 мМ	20 мМ
	Высокая	30 мМ	30 мМ
Температура ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Низкая	20°C	15°C
	Средняя	30°C	27,5°C
	Высокая	40°C	40°C
Значение рН (± 1)	Низкое	3,8	3,8
	Среднее	4,65	4,50
	Высокое	5,50	5,20

В общем, было проведено 28 отдельных опытов. Смотри Таблицу 3.

Таблица 3:

Эксперименты построения опыта					
День	Эксперимент	Конц. каприлата (мМ)	Температура (°C)	Конц. белка (%)	рН
1	1а	10	15	5	3,8
	17	20	40	5	3,8
	20	10	27,5	5	5,2
	13	20	27,5	18	5,2
	3а	30	15	18	3,8

5	2	4a	10	40	18	3,8
		7	30	15	18	5,2
		19	10	27,5	18	3,8
		5a	10	15	5	5,2
		6	30	40	5	5,2
10	3	14	30	27,5	11,5	5,2
		15	20	40	11,5	5,2
		18	30	15	11,5	3,8
		2a	30	40	5	3,8
		5b	10	15	5	5,2
10	4	11	10	40	5	4,5
		10	30	15	5	4,5

Таблица 3:

Эксперименты построения опыта						
День	Эксперимент	Конц. каприлата (мМ)	Температура (°С)	Конц. белка (%)	рН	
15	3b	30	15	18	3,8	
	8	10	40	18	5,2	
	4b	10	40	18	3,8	
20	9	30	40	18	4,5	
	12	10	15	18	4,5	
	16	20	15	5	5,2	
	1b	10	15	5	3,8	
	2b	30	40	5	3,8	
25	4a	10	40	18	3,8	
	6	4b	10	40	18	3,8
	19	10	27,5	18	3,8	
		4a	10	40	18	3,8

Опыты проводили следующим образом: пастообразную фракцию V суспендировали в воде для инъекций и выдерживали при температуре 2-8°С на протяжении ночи. Затем температуру повышали до 27-30°С, и концентрацию (основанную на поглощении на длине волны 280 нм) доводили до одного из трех опытных значений, например, 5, 11,5, или 18% (т.е., г альбумина/100 мл; 26,5, 60,95, или 95,4 ОЕ соответственно; ~0.75 М, 1,7 М, или 2,7 М, соответственно). После этого, регулировали значение рН раствора (значения рН составляли 3.8, 4.5, или 5.2). Затем образцы инкубировали, применяя температуры опыта (например, 15, 27,5, или 40°С). Затем добавляли вирус в концентрации, составляющей 1%. Затем добавляли каприлат в одной из трех концентраций: 10, 20, или 30 мМ. Затем образцы инкубировали, применяя температуры опыта, на протяжении 120 мин. Также получали образцы для титрования (перед добавлением каприлата и через 5, 10, 15, 30, 60, 90 и 120 минут), для того чтобы определить кинетику виروцидной активности каприлата. В заключение, определяли ВЛУ для каждого опыта. Результаты опыта показаны в Таблице 4 и на Фигурах 3-6.

Таблица 4:

Результаты построения опыта							
День	Эксперимент	Конц. каприлата (мМ)	Температура (°С)	Конц. белка (%)	рН	ВЛУ, 10 мин	ВЛУ, 120 мин
40	1a	10	15	5	3,8	<0,2 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
	17	20	40	5	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
	20	10	27,5	5	5,2	>1,8 ВЛУ	<0,2 ВЛУ

Таблица 4:

Результаты построения опыта							
День	Эксперимент	Конц. каприлата (мМ)	Температура (°С)	Конц. белка (%)	рН	ВЛУ, 10 мин	ВЛУ, 120 мин

5		13	20	27,5	18	5,2	>1,8 ВЛУ	0,2<ВЛУ<1,8
		3a	30	15	18	3,8	0,2 ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
	2	4a	10	40	18	3,8	-*	>1,8 ВЛУ
		7	30	15	18	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	0,2<ВЛУ<1,8
		19	10	27,5	18	3,8	-*	-*
		5a	10	15	5	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	0,2<ВЛУ<1,8
10	3	6	30	40	5	5,2	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		14	30	27,5	11,5	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
		15	20	40	11,5	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
		18	30	15	11,5	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		2a	30	40	5	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
15	4	5b	10	15	5	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	<0,2 ВЛУ
		11	10	40	5	4,5	0,2<ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
		10	30	15	5	4,5	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		3b	30	15	18	3,8	0,2<ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
		8	10	40	18	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	0,2<ВЛУ<1,8
20	5	4b	10	40	18	3,8	-*	-*
		9	30	40	18	4,5	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		12	10	15	18	4,5	0,2<ВЛУ<1,8	0,2<ВЛУ<1,8
		16	20	15	5	5,2	0,2<ВЛУ<1,8	0,2<ВЛУ<1,8
		1b	10	15	5	3,8	0,2<ВЛУ<1,8	>1,8 ВЛУ
		2b	30	40	5	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
	6	4a	10	40	18	3,8	-*	-*
		4b	10	40	18	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		19	10	27,5	18	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ
		4a	10	40	18	3,8	>1,8 ВЛУ	>1,8 ВЛУ

Таблица 4							
Результаты построения опыта							
День	Эспе-римент	Конц. каприлата (мМ)	Температура (°С)	Конц. белка (%)	РН	ВЛУ, 10 мин	ВЛУ, 120 мин
- *Эти реакции проходили с загущением и данные не были получены. Затененные клетки соответствуют: эффективному виروцидному действию, составляющему >1,8 ВЛУ; небольшому виروцидному действию, составляющему 0,2<ВЛУ<1,8; ограниченному виروцидному действию, составляющему <0,2 ВЛУ.							

Выявлен ряд концентраций каприлата, концентраций белка, температур и значений рН, которые были эффективными в отношении виروцидного действия. Исходя из условий, протестированных в исследовании ПО, являются очевидными следующие общие положения:

- Повышенная температура усиливает вироцидное действие;
- Увеличенное время инкубации усиливает вироцидное действие;
- Повышенная концентрация каприлата усиливает вироцидное действие;
- Пониженная концентрация белка (альбумина) усиливает вироцидное действие и
- Пониженное значение рН усиливает вироцидное действие.

Кроме того, расчетная ВЛУ, по шкале от 0 до 100, достигает максимального значения, то есть, равна 100% (что соответствует ВЛУ, составляющей 2.16), с наименьшим доверительным интервалом предсказания, составляющим 95%, при следующих обобщенных переменных параметрах (см. Фигуры 6-7):

- Концентрация каприлата: 30 мМ;
- Концентрация альбумина: 5% (прибл. 26,5 ОЕ; 750 мМ);
- Значение рН: 4.4;
- Температура: 40°С и
- Время инкубации: 120 мин.

Исходя из этих данных, следующие условия были определены как целесообразные для стадии инактивации вирусов, для способа очистки альбумина:

- Концентрация белка: ≤ 25 ОЕ (A_{280}) (т.е., $< 5\%$; < 750 мМ)
- Концентрация каприлата: > 20 мМ;
- Значение рН: ≤ 5.0 ;
- Температура: $27-30^\circ\text{C}$ и
- 5 - Время инкубации: ≥ 90 мин.

Эти условия максимально усиливают вицицидное действие, уменьшая при этом стоимость производства и время процесса очистки альбумина.

Объем условий, способов и процессов, описанных здесь, включает все комбинации вариантов осуществления изобретения, аспектов, примеров, стадий и преимуществ, описанных здесь.

(57) Формула изобретения

1. Способ приготовления альбумина плазмы крови для фармацевтического применения, который включает следующие стадии:

- 15 (i) получение элюата фракции IV-1 или фракции Коэна V;
- (ii) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше чем 5 мас.%;
- (iii) доведение значения рН раствора до значения рН, составляющего 5 или меньше;
- (iv) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия;
- 20 (v) повышение температуры раствора до $27-30^\circ\text{C}$;
- (vi) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин, и с последующим фильтрованием раствора; выполнением ультрафильтрации и диафильтрации; составлением и увеличением объема раствора; стерилизацией, наполнением емкостей и пастеризацией альбумина.

25 2. Способ по п. 1, где инкубацию проводят на протяжении по меньшей мере 90 мин.

3. Способ по п. 1, где концентрация каприлата составляет 10-40 мМ.

4. Способ по п. 1, где концентрация каприлата составляет 15-30 мМ.

5. Способ по п. 1, где концентрация каприлата составляет 20 мМ.

6. Способ по п. 1, где значение рН составляет 3.8-5.

30 7. Способ по п. 1, где значение рН составляет 5.

8. Способ приготовления альбумина плазмы крови для фармацевтического применения, который включает следующие стадии:

- (i) получение элюата фракции IV-1 или фракции Коэна V;
- (ii) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше
- 35 чем 5 мас.%;
- (iii) доведение значения рН раствора до значения рН, составляющего 5 или меньше;
- (iv) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия до концентрации 20 мМ;
- (v) повышение температуры раствора до $27-30^\circ\text{C}$;
- 40 (vi) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин, и с последующим фильтрованием раствора; выполнением ультрафильтрации и диафильтрации; составлением и увеличением объема раствора; стерилизацией, наполнением емкостей и пастеризацию альбумина

9. Способ инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин, включающий

45 следующие этапы:

- (i) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше чем 5 мас.%;
- (ii) доведение значения рН раствора до значения рН, составляющего 5 или меньше;

- (iii) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия;
- (iv) повышение температуры раствора до 27-30°C и
- (v) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин.

10. Способ по п. 9, где вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке.

5 11. Способ по п. 9, где инкубацию проводят на протяжении по меньшей мере 90 мин.

12. Способ по п. 9, где инкубацию проводят на протяжении 90 мин.

13. Способ по п. 9, где температура составляет 30°C.

14. Способ по п. 10, где вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке, поражающие людей.

10 15. Способ инактивации вирусов в растворе, содержащем альбумин, включающий следующие этапы:

(i) доведение концентрации раствора альбумина до значения, составляющего меньше чем 5 мас.%;

(ii) доведение значения pH раствора до значения pH, составляющего 5 или меньше;

15 (iii) добавление каприловой кислоты (октановой кислоты) или каприлата натрия до концентрации 20 мМ;

(iv) повышение температуры раствора до 27-30°C и

(v) инкубацию раствора на протяжении 30-120 мин.

20 16. Способ по п. 15, где вирусы представляют собой вирусы в липидной оболочке, поражающие людей.

25

30

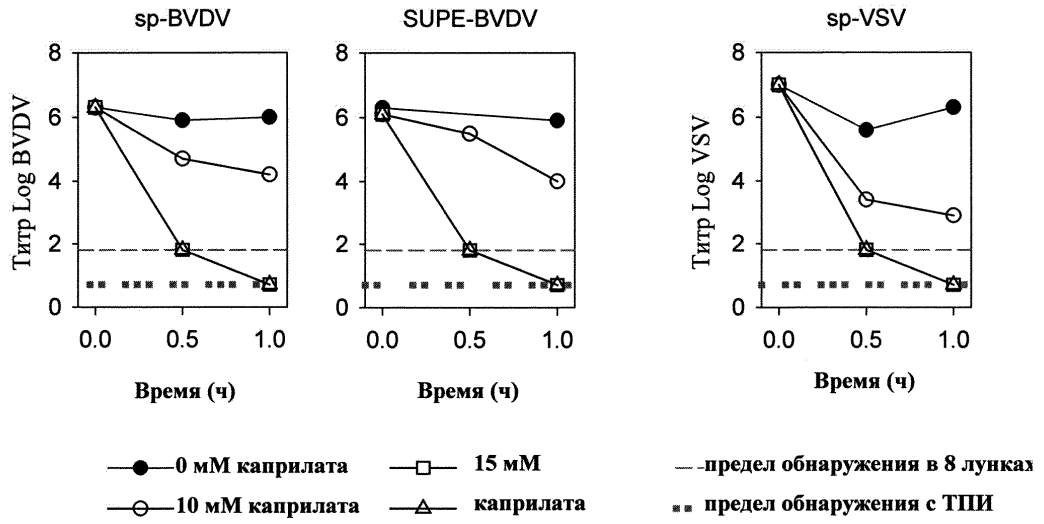
35

40

45

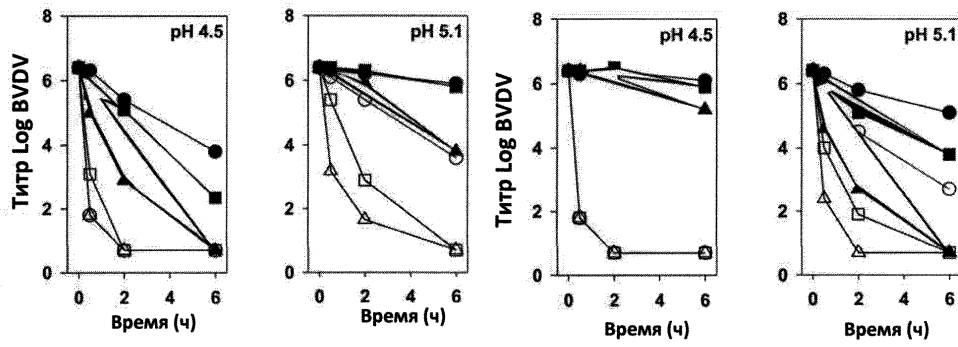
1

ФИГ. 1



2

ФИГ. 2



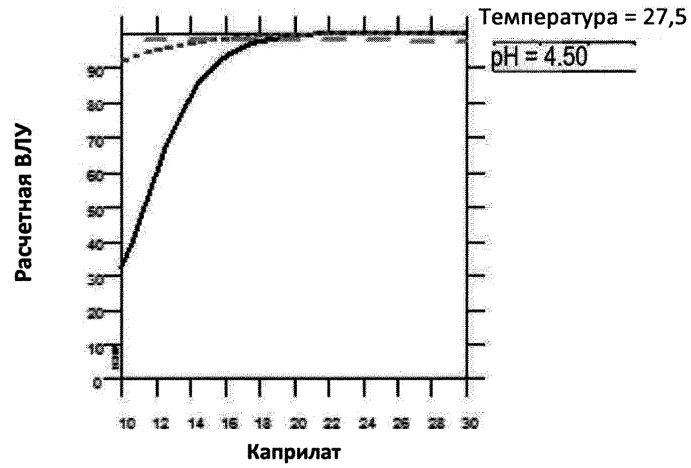
Суспенз. фр. V + 20 мМ Каприлата				
Белок	Темп	Символ	ВЛУ	
			pH 4.5	pH 5.1
25 OE	5C	○	5.7	2.8
	12C	□	5.7	5.7
	20C	△	5.7	5.7
65 OE	5C	●	2.6	0.5
	12C	■	4.1	0.6
	20C	▲	5.7	2.6

Суспенз. альбумина + 20 мМ Каприлата				
Белок	Темп	Символ	ВЛУ	
			pH 4.5	pH 5.1
25 OE	5C	○	5.7	3.7
	12C	□	5.7	5.7
	20C	△	5.7	5.7
65 OE	5C	●	0.3	1.6
	12C	■	0.5	2.6
	20C	▲	1.2	5.7

ФИГ. 3

A

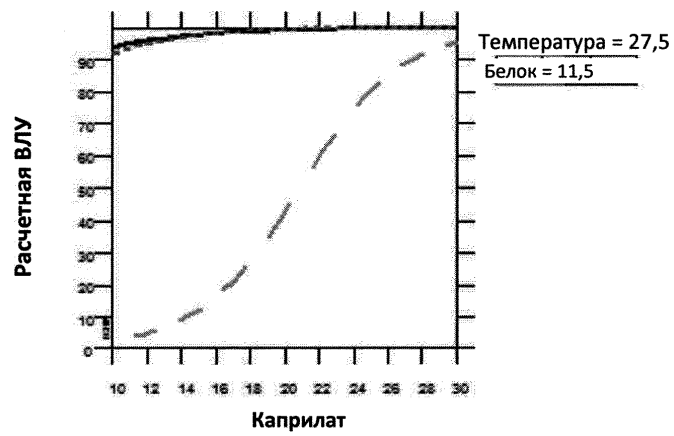
Взаимодействие –ВЛУ_0-100_шкала



B

— Низкий белок – 5,0
- - - Средний белок – 11,5
- · - Высокий белок – 18,0

Взаимодействие –ВЛУ_0-100_шкала

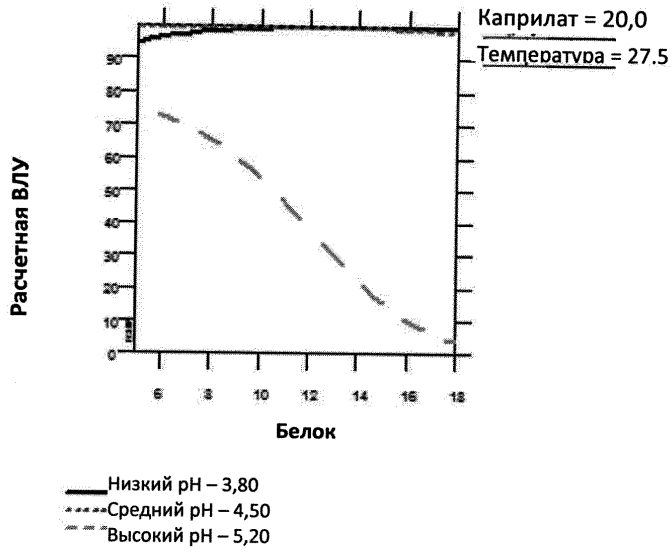


— Низкий рН – 3,80
- - - Средний рН – 4,50
- · - Высокий рН – 5,20

4

Фиг. 4

Взаимодействие –ВЛУ_0-100_шкала

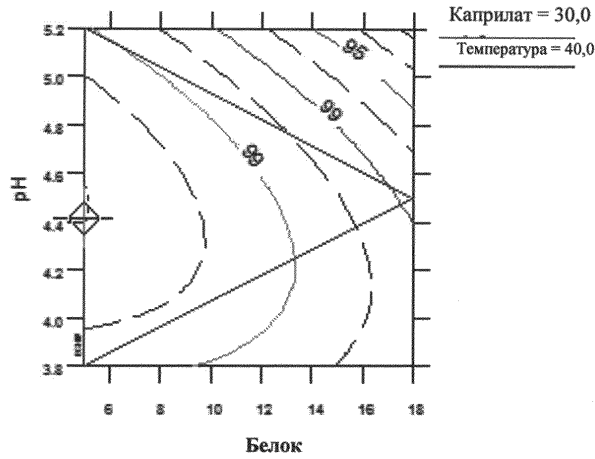


5

ФИГ. 5

A

ВЛУ_0-100_шкала

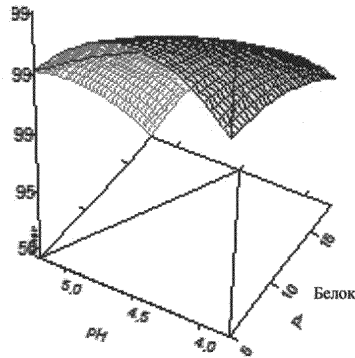


Белок - 5,00	Низкий предел	pH - 4,41
Объем предел		Высокий

B

ВЛУ_0-100_шкала

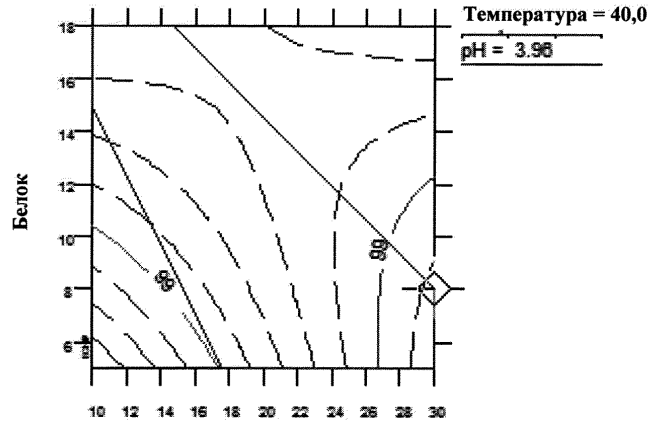
Каприлат = 30,0
Температура = 40,0



ФИГ. 6

А

ВЛУ_0-100_шкала

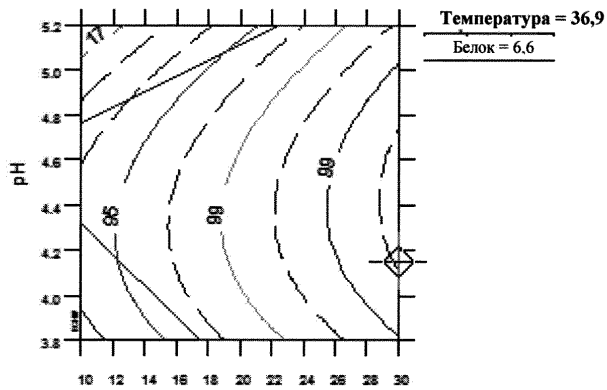


Каприлат

Каприлат - 30,00	Белок - 8,06
Объем	Низкий предел
100,00	43,59
	Высокий предел
	100,00

В

ВЛУ_0-100_шкала



Каприлат

Каприлат - 30,00	pH - 4,15
Объем	Низкий предел
100,00	60,82
	Высокий предел
	100,00

ФИГ. 7

