

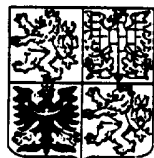
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 297

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **211-92**

(22) Přihlášeno: 24. 01. 92

(30) Právo přednosti:
25. 01. 91 AT 91/163

(40) Zveřejněno: 12. 08. 92

(47) Uděleno: 17. 10. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13. 12. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
A 61 K 35/16
A 61 K 38/00

(73) Majitel patentu:
IMMUNO Aktiengesellschaft, Wien, AT;

(72) Původce vynálezu:
Linnau Yendra dr., Wien, AT;
Sazgary Maria dipl. ing., Wien, AT;

(54) Název vynálezu:
**Komplex srážecího faktoru IX, způsob
jeho výroby, farmaceutický preparát
pro aplikaci při nedostatku faktoru IX
a použití tohoto komplexu**

(57) Anotace:
Komplex srážecího faktoru IX a nosiče, spočívající v tom, že je tvořený nosičem na bázi polymeru s hydrofobními skupinami, na který je selektivně navázán faktor IX z vodné směsi, obsahující vedle faktoru IX ještě alespoň jeden plasmozymogen a/nebo na vitamínu K závislý protein. Faktor IX se selektivně adsorbuje z vodné směsi pomocí hydrofobní chromatografie. Tato metoda umožňuje vysoce produktivní získání faktoru IX pro výrobu farmaceutických preparátů. Řešení se týká použití také shora uvedeného komplexu pro získání monoklonárních nebo polyklonálních protilátek, které jsou směřovány proti faktoru IX.

CZ 280 297 B6

Komplex srážecího faktoru IX, způsob jeho výroby, farmaceutický preparát pro aplikaci při nedostatku faktoru IX a použití tohoto komplexu

Oblast vynálezu

Vynález se týká komplexu, který obsahuje srážecí faktor IX, jakož i způsob výroby farmaceutického preparátu, který obsahuje faktor IX.

Dosavadní stav techniky

Srážecí faktor IX se používá při substituční léčbě pacientů, trpících hemofilií B. Tato krevní choroba je výsledkem nedostatku faktoru IX.

K substituční léčbě se užívají koncentráty faktoru IX, které navíc obsahují srážecí faktory II, VII, IX a X /prothrombinový komplex/. Takové koncentráty, obsahující srážecí faktory patří k faktorům závislým na vitaminu K a jsou sdruženy na základě jejich podobné stavby. Pro osoby, trpící krvácením, které jsou postiženy hemofilií B, však znamená každé zavedení jiných koagulačních faktorů, než je faktor IX, zátěž. Proto je snaha použít v terapii koncentráty faktoru IX s jeho vysokým obsahem, alternativně ke kombinovaným preparátům.

Výchozím materiálem pro výrobu preparátů, obsahujících faktor IX je lidská plasma, která však obsahuje faktor IX jen v malých množstvích /4/ μ g/ml/. Pro získání faktoru IX musí být proto nejen zpracováno velké množství plasmy, musí se ale také oddělit rušící doprovodné proteiny tak, jak jen to je možné. Toto je ztíženo tím, že tyto doprovodné proteiny mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Další obtíž spočívá v tom, že konečný produkt v průběhu zpracování musí být zbaven infekčních agens, protože výchozí materiál může obsahovat například viry hepatidy nebo HIV. Každý stupeň výroby a každá inaktivace viru se musí provádět tak, aby se co nejvíce zachovala biologická aktivita faktoru IX. Již léta jsou činěny pokusy nalézt způsob, který by optimálně splňoval uvedené požadavky.

Získání faktoru IX při současném snížení obsahu jiných faktorů chromatografickými způsoby se daří přirozeně tím lépe, čím je výměna srážecího faktoru IX se stacionární fází specifitější.

Pro výrobu frakcí, obsahujících faktor IX z vodných směsí, obsahujících faktory II, VII, IX a X, jsou známy způsoby iontovýměnné a afinitní chromatografie. Podle způsobů popsaných v pat. spisu DE-C 3914869 se získá frakce, obsahující faktor IX na adsorbentu, obsahujícím α -hydroxylaminoskupinu. Eluce absorbovaného faktoru IX se provádí zvýšením koncentrace aminu nebo soli, což svědčí o iontové vazebné síle mezi faktorem IX a adsorbentem. Na závěr tohoto prvního stupně se provede chromatografie na matici, nesoucí sulfatovaný uhlohydrát.

Způsoby afinitní chromatografie vykazují vysokou specifitu. Faktor IX se adsorbuje na nosný materiál protilátkou nebo jinými skupinami s vysokou afinitou k faktoru IX, například heparin, promyje se a eluuje. Například se podle způsobu v pat. spisu EP-A 317376 adsorbuje faktor IX na imobilizovaný heparin. Eluce faktoru IX se provádí zvýšením koncentrace soli v pufru. Podobné platí pro protilátku proti faktoru IX jako afinitní nosič.

V pat. spisu EP-A 229026 se adsorbuje faktor IX na imobilizovanou protilátku a eluuje se gradientem soli. Problémem je, že použité eluční podmínky disociují nejen faktor IX, ale také heparin, popřípadě protilátku, které se proto vyskytují v konečném produktu jako nečistoty.

Dále je známo, že koncentrát srážecích faktorů, obsahující faktory II, VII, IX a X, může být chromatografií na hydrofobní matrici zbaven virových antigenů, přičemž se antigen hydrofobně váže na matrici, zatímco srážecí faktory procházejí matricí při zachování jejich biologických aktivit /J.Vir.Meth.,3, 213 až 228/1981//.

Úloha vynálezu spočívá v nalezení chromatografického způsobu, který nemá uvedené nevýhody a umožňuje snadné dosažení faktoru IX z vodné směsi, která obsahuje ještě další proteiny, zejména plasmozymogen nebo na vitaminu K závislé proteiny.

Podstata vynálezu

Podle vynálezu je k dispozici komplex srážecího faktoru IX, který je tvořen nosičem na bázi polymeru s hydrofobními skupinami, na které je selektivně navázán faktor IX z vodné, vedle faktoru IX ještě alespoň jeden plasmozymogen obsahující směsi. Faktor IX může být selektivně navázán v komplexu podle vynálezu také z vodné, vedle faktoru IX ještě alespoň jeden na vitaminu K závislý protein jako protein C, protein S nebo faktory II, VII a X, obsahující směsi nebo z vodné směsi, která obsahuje prothrombinový komplex.

Vynález je založen na poznání, že srážecí faktor IX se selektivně adsorbuje z vodného roztoku, který má vysokou vodivost, na matrici, mající hydrofobní vedlejší řetězce, tj. za přítomnosti plazmazymogenu nebo na vitaminu K závislého proteinu. Toto je překvapující, protože uvedené proteiny mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Tato selektivní adsorpční schopnost faktoru IX může být použita k získání tohoto faktoru.

Výhodná forma provedení komplexu podle vynálezu se vyznačuje tím, že faktor IX se získá nejméně v pětinasobné aktivitě vůči jinému přítomnému, na vitaminu K závislému proteinu.

Komplex podle vynálezu je výhodně podroben zpracování pro inaktivaci popřípadě přítomných infekčních agens.

Komplex podle vynálezu může být vyroben tak, že se pro komplexaci faktoru IX uvede jedna ze shora uvedených, faktor IX obsahujících vodných směsí, které mají vodivost alespoň 30 mS, výhodně v rozmezí 60 až 120 mS, do kontaktu s nosičem na bázi polymeru s hydrofobními skupinami, vzniklý komplex se popřípadě

promyje a popřípadě se inaktivují popřípadě přítomné infekční složky. Podle vynálezu se tedy faktor IX obohacuje technikou hydrofobní chromatografie. Výhodně se tvorba komplexu provádí za přítomnosti detergentu.

Dále se vynález týká farmaceutických preparátů, obsahujících srážecí faktor IX.

Komplex podle vynálezu může být dále použit pro získávání monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, které jsou směřovány proti faktoru IX.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Z 10 litrů lidské krevní plasmy se získá metodou podle Brummelhuse (Methods of Plasma Protein Fractionation, ed. JM Curling, str. 117, Acad. Press. 1980) prothrombinový komplex (krevní srážecí faktory II, VII, IX a X) adsorpcí na DEAE-Sephadexu. 50 ml prothrombinového komplexu (3 669 m.j. faktoru II, 2 858 m.j. faktoru IX a 2 734 m.j. faktoru X) se diafiltruje aby se dosáhlo složení pufru A (1 000 mM NaCl, 15 mM citrát sodný, pH = 7), přičemž vodivost je v rozmezí 60 až 120 mS.

Sloupec 30 ml hydrofilního polymeru s butyl-skupinami /Fractogel TSK-Butyl/Merck, Darmstadt// se ekvilibruje 100 ml pufru A a prothrombinový komplex se nanese průtokovou rychlostí 360 ml/h. Po promytí impregnovaného gelu 350 ml pufru A se eluuje frakce, obsahující faktor IX 180 ml pufru B/400 mM NaCl/.

Výtěžek faktoru IX činí asi 76 % výchozí aktivity. Specifická aktivita faktoru IX činí 19,7 m.j. faktoru IX/mg proteinu. Faktory II a X vykazovaly aktivitu nižší než 20 % výchozí aktivity.

Příklad 2

50 ml prothrombinového komplexu se chromatografuje analogicky příkladu 1. Jako materiál sloupce se však použije 45 ml methakrylátového polymeru s fenylskupinami /Toyopearl Phenyl 650 M /TOSO HAAS, Stuttgart//, který byl ekvilibrován s 1,4 M síranem amonným. Eluce faktoru IX se provádí 0,2M síranem amonným.

Výtěžek faktoru IX činí 48 % výchozí aktivity a specifická aktivita činí 27,2 m.j. faktoru IX/mg proteinu.

Příklad 3

150 ml prothrombinového komplexu se předčistí pomocí dextransulfátu /Miletech a spol., Analytical Biochemistry 105, 304/1980//. 20 ml eluátu /912 m.j. faktoru IX, 160 m.j. faktoru X/ se analogicky příkladu 1 nanese na sloupec 20 ml agarosového polymeru s oktylskupinami /Octyl-Sepharose-CL-4B/PHARMACIA, Švédsko//. Sloupec se předtím ekvilibruje 80 ml pufru A. Po pro-

mytí impregnovaného gelu 120 ml pufru A se eluuje faktor IX obsahující frakce 80 ml 250 molárního roztoku NaCl.

Výtěžek faktoru IX činí asi 54 % výchozí aktivity. Specifická aktivita je 186 m.j. faktoru IX/mg proteinu. Faktor X byl stopový.

Příklad 4

50 ml prothrombinového komplexu se dělí analogicky příkladu 1 pomocí hydrofobní chromatografie. Bezprostředně před nanesením na 35 ml hydrofilního vinylpolymeru s butylskupinami /Fractogel TSK-Butyl/ se prothrombinový komplex navíc zpracuje se 2 % polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleátem Tween 80 a 0,01 % tri-/n-butyl/fosfátu podle v pat. spise US-A 4820805 popsaného způsobu.

Výtěžek faktoru IX činí asi 83 % výchozí aktivity a specifická aktivita činí 24,1 m.j. faktoru IX/mg proteinu.

Příklad 5

Pro inaktivaci eventuálních původců chorob se 2 g lyofilizovaného prothrombinového komplexu zahřívají způsobem podle pat. spisu EP-A-0159311 10 hodin dlouho na 60 °C za zvýšení parciálního tlaku vodní páry. Nakonec se provede hydrofobní chromatografie na 20 ml agarozového polymeru s oktylskupinami /Octyl-Sepharose-CL-4B/.

Výtěžek faktoru IX činí asi 63 % výchozí aktivity. Specifická aktivita činí 32 m.j. faktoru IX/mg proteinu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Komplex srážecího faktoru IX a nosiče, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je tvořený nosičem na bázi polymeru s hydrofobními skupinami, na který je selektivně navázán faktor IX z vodné směsi, obsahující vedle faktoru IX ještě alespoň jeden plazmozymogen a/nebo na vitaminu K závislý protein.
2. Komplex podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že na vitaminu K závislý protein je zvolený ze skupiny zahrnující protein C, protein S nebo faktory II, VII a X.
3. Komplex podle nároků 1 a 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že faktor IX je navázán z vodné směsi, která obsahuje prothrombinový komplex.
4. Komplex podle nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje faktor IX v alespoň pětinasobné aktivitě vzhledem k jinému, na vitaminu K závislému proteinu.

5. Komplex podle nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije pro výrobu farmaceutických preparátů, obsahujících srážecí faktor IX.
6. Způsob výroby komplexu podle nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se vodná směs podle nároků 1 až 4, která má vodivost nejméně 30 mS, výhodně 60 až 120 mS, uvede pro komplexaci faktoru IX do kontaktu s nosičem na bázi polymeru s hydrofobními skupinami a vytvořený komplex se promyje.
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se vytvořený komplex ve vlhkém stavu tepelně zpracuje k inaktivaci popřípadě přítomných infekčních agens.
8. Způsob podle nároků 6 a 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tvorba komplexu provádí za přítomnosti anionických, kationických nebo neionických povrchově aktivních látek, obsahujících alespoň jednu hydrofilní a jednu hydrofobní skupinu.
9. Farmaceutický preparát pro aplikaci při nedostatku faktoru IX, popřípadě při hemofilii, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje srážecí faktor IX, eluovaný z komplexu podle nároků 1 až 4.
10. Použití komplexu podle nároků 1 až 4 pro získání monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, které jsou směrovány proti faktoru IX.

Konec dokumentu
