

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.11.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.11.2000 20.11.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0004086 2000/252148**

(33) Země priority: **SE US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.08.2003**
(Věstník č. 8/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/SE01/02473**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/038610**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1277

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/81

A 61 K 38/55

(71) Přihlašovatel:

OCTAPHARMA AG, Lachen, CH;

(72) Původce:

Karlsson Göran, Vällingby, SE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Postup přípravy latentního antitrombinu III
postup přípravy**

(57) Anotace:

Postup pro přípravu latentního antitrombinu III, který zahrnuje inkubaci roztoku antitropinu III v přítomnosti síranových iontů a pufru, vybraného z Goodových pufrů obojetných iontů.

POSTUP PŘÍPRAVY LATENTNÍHO ANTITROMBINU IIIPOSTUP PŘÍPRAVY**Oblast techniky**

Předkládaný vynález souvisí s postupem pro přípravu latentního antitrombinu III.

Dosavadní stav techniky

Antitrombin III (AT) je plasmatický glykoprotein s celkovou molekulovou hmotností 58,1 kDa (Lebing a kol., Vox Sang. 67, 117-124, 1994), který inhibuje serinové proteasy v koagulační kaskádě a proto hraje hlavní roli v regulaci srážení krve. Antitrombin III je inhibitor Faktorů IXa, Xa, XI a XIIa, stejně jako trombinu. AT tedy reguluje tvorbu sraženiny v různých stádiích koagulační kaskády. Malý pokles obsahu AT v krvi je spojen se zvýšeným rizikem tromboembolismu. Koncentráty AT jsou používány při prevenci a léčbě tromboembolických poruch u pacientů se získaným nebo dědičným nedostatkem antitrombinu. Kromě toho, bylo publikováno, že AT má funkci v mnoha jiných procesech v lidském těle, například během angiogeneze a reakce na zánětlivé podněty. Funkce AT v těchto fyziologických procesech není plně prozkoumána.

Konkrétní forma antitrombinu III, která byla poprvé charakterizována Wardellem a kol. (Biochemistry 36, 13133-13142, 1997), je známa jako latentní forma (L-AT). Bylo ukázáno, že L-AT a selektivně štěpená varianta elastasy mají silnou antiangiogenní aktivitu a také potlačují růst nádoru u myši, které byla subkutánně injektována lidská neuroblastomová buněčná linie (O'Reilly a kol., Science 285, 1926-1928, 1999, a WO 00/20026). Z těchto důvodů musí být L-AT považována za potenciální lidský

protinádorový lék. Klinické ověření tohoto potenciálního léku musí být ještě provedeno.

Purifikace AT afinitní chromatografií byla provedena použitím vyčištěného heparinu jako pevně navázaného ligandu, jak je známo v oboru. Miller-Andersson a kol. (Thrombosis Research 5, 439-452, 1974) ukázali použití heparin-Sepharosy pro purifikaci lidského AT. Tento chromatografický systém je také užitečný pro oddělení AT a L-AT, kde snížená afinita heparinu pro L-AT ve srovnání s AT umožňuje rozlišit tyto dvě složky, jak je popsáno v Chang a Harper (Thrombosis and Haemostasis 77, 323-328, 1997). Hydrofobní chromatografie byla použita pro rozdělení nativní a latentní formy AT (Karlsson, G & Winge, S. (2001) Protein Expr. Purif. 21:149-155).

Indukce latentní formy AT byla dříve provedena, jak je popsáno Wardellem a kol. (supra), kteří získali 50-60% L-AT inkubací AT v 0,25 M citrátu, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, po 15 h při 60°C.

Po inkubaci nativního antitrombinu III při 60°C v médiu nebo pouze v pufru se často tvořily agregáty polymerizovaného proteinu. Přítomnost těchto agregátů poškozuje vysoký výtěžek latentního antitrombinu III a mělo by se jim pokud možno zabránit.

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnout postup pro přípravu latentního antitrombinu III, L-AT z roztoku nativního antitrombinu III, AT, kde takový postup poskytuje vyšší výtěžek žádaného produktu než předchozí postup, známý v oboru.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí postupu pro přípravu L-AT z AT, kde tvorba agregátů polymerů AT je minimální.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí postupu pro přeměnu AT na L-AT, ve kterém jsou použity běžně dostupná

činidla a roztoky pufrů a které jsou prováděny in vitro.

Ještě dalším předmětem vynálezu je poskytnutí postupu pro přípravu L-AT z AT, který je snadno rozšiřitelný pro průmyslovou výrobu L-AT.

Popis vynálezu

Shora uvedené a jiné předměty vynálezu vyhovují postupu, který je definován nároky. Proto je poskytnut postup, který zahrnuje inkubaci roztoku nativního antitrombinu III v přítomnosti síranových iontů a pufrů vybraných z Goodových pufrů obojetných iontů. Překvapivě bylo zjištěno, že tyto inkubační podmínky, které se vyhýbají možným agregačním problémům, umožňují znovuzískání L-AT z postupu v takových výtěžcích, které jsou podstatně vyšší než ty, které jsou získány způsoby přednostního oboru (zejména citrátové podmínky Wardella a kol.).

Popisy k Obrázkům

Obrázek 1: Heparinová afinitní chromatografie antitrombinu použitím gradientu chloridu sodného 0-2 M (5-60 min). Nastříknuté množství proteinu bylo 100 µg pro vzorek A-B a 150 µg pro vzorek C-D. Všechny vzorky byly inkubovány při 60 °C po 16 h kromě referenčního AT vzorku A, který nebyl teplotně upraven (vzorek 7 v příkladu). Vzorek B (vzorek 6 v příkladu) byl inkubován podle Wardella, tj. v 0,5 M citrátu. Vzorek C (vzorek 2 v příkladu) byl inkubován v 5 mM HEPES, pH 7,4 s 0,9 M síranem amonným a vzorek D (vzorek 1 v příkladu) byl inkubován v 5 mM HEPES, pH 7,4 s 0,8 M síranem amonným. Integrace vrcholu vázajícího se k heparinu s nízkou afinitou, eluovaného v 22 min, poskytla 44% celkové integrační plochy vzorku B, 71% celkové integrační plochy vzorku C a 89% celkové integrační plochy vzorku D.

Nativní AT byl eluován v 39 min.

Obrázek 2: Nativní elektroforesa vzorků antitrombinu, použitím 12,5% polyakrylamidu v homogenním gelu. Množství vzorku bylo 0,5 µg proteinu/dráha a gely byly po ukončení rozdělení obarveny stříbrem. Všechny vzorky, kromě dráhy 7, byly inkubovány při 60°C po 16 h.

- Dráha 1) 5 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 2) 5 mM HEPES, 0,9 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 3) 5 mM HEPES, 1,1 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 4) 5 mM HEPES, 1,4 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 5) 5 mM HEPES, 2,0 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 6) 10 mmol Tris/HCl, 0,5 M citrát trojsodný,
pH 7,4 (podle Wardell a kol. 1997)
 - Dráha 7) referenční AT vzorek, bez tepelné úpravy
 - Dráha 8) 25 mM fosforečnan sodný, 100 mM chlorid sodný,
pH 7,4
 - Dráha 9) 25 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 10) 5 mM HEPES, 0,5 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 11) 5 mM HEPES, 2,0 M síran amonný, pH 7,4
 - Dráha 12) 5 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,0
- Všechna čísla odpovídají číslům vzorků uvedených v příkladu níže.

Detailní popis vynálezu

Vynález poskytuje popis pro přípravu latentního antitrombinu III (označovaného jako L-AT), počínaje od roztoku antitrombinu III v jeho nativní formě (označované jako AT). AT může být izolován z krevní plasmy chromatografií na heparin-Sepharose, jak bylo popsáno. Podle vynálezu je AT poté inkubován v přítomnosti síranových iontů a pufrů. Teplota a trvání inkubace mohou být snadno stanoveny osobou, orientovanou v oboru, ale bylo zjištěno, že normální pasterační podmínky, jako teplota přibližně 60°C po dobu přibližně

16 hodin také poskytují dobré výsledky.

Síranové ionty jsou přednostně poskytnuty ve formě soli síranu. Zde je přednostní použití síranu alkalických zemin, síranu alkalických kovů nebo síranu amonného. Obzvláště předností je použití síranu amonného. Vhodná koncentrace iontů síranu v postupu podle vynálezu leží v rozmezí od 0,5 do 2,0 M, výhodněji od 0,7 do 1 M a nejpřednostnější koncentrace je mezi 0,8 a 0,9 M.

Další složkou v inkubační směsi je pufr, vybraný z Goodových pufrů obojetných iontů (Good a kol., Biochemistry 5, 467-477, 1966). Výběr použití jednoho z ukázaných pufrů může být stanoven bez toho, že by se prováděl experiment, s tím, že je třeba mít na paměti, že by pufr měl splňovat většinu nebo všechny z následujících požadavků: měl by vykazovat hodnotu pK_a mezi přibližně 6 a přibližně 9, maximální rozpustnost ve vodě a minimální rozpustnost v jiných rozpouštědlech, vytvářet minimum solných účinků, být stabilní za použitých experimentálních podmínek a neabsorbovat světlo ve viditelné nebo ultrafialové spektrální oblasti (a tak neinterferovat se spektrofotometrickými měřeními). Goodovy pufrы obojetných iontů, včetně pufrů jako jsou HEPES, MES a PIPES, většinou vykazují žádané charakteristiky. Použití HEPES je zejména přednostní v postupu podle vynálezu. Hojně rozšířený Tris pufr je nevhodný pro účely vynálezu. Přednostní koncentrace pufrů jsou určitým způsobem závislé na vybraném pufru, ale většinou leží v rozmezí od 1 do 25 mM, výhodněji od 2,5 do 10 mM a nejvýhodněji od 4 do 6 mM.

Jak je naznačeno výše, mělo by pH inkubační reakce ležet mezi pH 6 a pH 9, výhodně mezi pH 7 a pH 8 a nejvýhodněji mezi pH 7,4 a pH 7,6.

Následně po inkubaci AT za podmínek ukázaných výše, je

oddělení takto získaného L-AT od zbývajících AT provedeno pomocí afinitní chromatografie na heparinu. L-AT, který vykazuje nižší vazebnou afinitu k heparinu, než AT, se eluuje podstatně rychleji a umožňuje snadné oddělení těchto dvou forem antitrombinu III.

Preparát takto získaného L-AT je výhodně vystaven úpravě pro inaktivaci nebo odstranění patogenů, zejména ve formě virů a prionů. Toto může být provedeno v jakémkoliv stupni postupu použitím jednoho z několika způsobů inaktivace nebo odstranění známých v oboru nebo kombinací takových způsobů. Příklady takových způsobů zahrnují chemickou inaktivaci, tepelnou inaktivaci, inaktivaci světlem, mikrovlnou inaktivaci a odstraněním pomocí filtrování přes nanometrické filtry. Filtrace s příčným tokem s vysokým obsahem soli, podobně jak je popsáno v WO96/00237, je zejména přednostní, samotná nebo v kombinaci s jinými postupy. Odstranění a inaktivace patogenů mohou být provedeny, když jsou molekuly antitrombinu III v nativním stavu, před přeměnou na L-AT.

Vynález je dále doložen následujícím, neomezujičím příkladem.

PŘÍKLAD

Laboratorní vzorek AT o čistotě > 95% byl získán z Plasma Products, Pharmacia, Stockholm, Švédsko. Tento vzorek byl připraven podle známých způsobů (Miller-Andersson a kol., supra) a použit pro indukci latentní formy antitrombinu.

Příprava L-AT

Laboratorní vzorek AT byl převeden do následujících roztoků:

Vzorek 1) 5 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,4

- Vzorek 2) 5 mM HEPES, 0,9 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 3) 5 mM HEPES, 1,1 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 4) 5 mM HEPES, 1,4 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 5) 5 mM HEPES, 2,0 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 6) 10 mmol Tris/HCl, 0,5 M citrát trojsodný,
pH 7,4 (podle Wardell a kol.1997)
Vzorek 7-8) 25 mM fosforečnan sodný, 100 mM chlorid
sodný, pH 7.4
Vzorek 9) 25 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 10) 5 mM HEPES, 0,5 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 11) 5 mM HEPES, 2,0 M síran amonný, pH 7,4
Vzorek 12) 5 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,0
Vzorek 13) 5 mM HEPES, 0,8 M síran amonný, pH 7,8

Všechny pufrы uvedené shora byly upraveny na požadované pH při laboratorní teplotě; 1 M HCl byla použita pro úpravu Vzorku 6, zatímco pro úpravu pH všech ostatních vzorků byl použit 1 M hydroxid sodný.

AT ve finální koncentraci 6 mg/ml byl inkubován v roztocích (Vzorky 1-13) ve skleněných trubičkách po 16 h při 60°C (kromě Vzorku 1, který byl udržován v ledničce při přibližně 8°C) a přeneseny do roztoku obsahujícího 50 mM Tris/HCl, 50 mM chlorid sodný, pH 7,4, použitím malých kolon pro gelovou filtraci (NAP-5 Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko).

Vytvoření L-AT ve vzorcích bylo analyzováno afinitní chromatografií na heparinu a přítomnost agregátů byla analyzována nativní elektroforézou.

Afinitní chromatografie na heparinu

Tento způsob byl proveden podle Changa a Harpera (supra). Bylo použito HPLC vybavené TSK Heparin® kolonou (Tosohaas, Stuttgart, Germany, 7,5 vnitřní průměr x 75 mm, 10 µm, 1000 Å). Jako eluční pufrы byly použity 20 mM Tris/HCl pufr, pH 7,4 (pufr A) a 2 M

chlorid sodný ve 20 mM Tris/HCl pufru, pH 7,4 (pufr B). Byl použit lineární gradient (0-5 min 0% B, 5-60 min 0-100% B, 60-90 min 0% B). Průtoková rychlost byla 0,4 ml/min a detekce byla provedena měřením absorbance při 280 nm.

Nativní elektroforeza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforeza byla provedena použitím 12,5% polyakrylamidového homogenního Phast® gelu (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) za dodržení doporučených parametrů. Do každé dráhy bylo nanесeno 0,5 µg proteinu v 1 µl. Bylo provedeno barvení diamino-stříbrem podle příručky od Pharmacia & Upjohn (Phast System™, Technical Note No 2, Two-dimensional electrophoresis with PhastGel™ separation media, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Švédsko), s výjimkou, že byl použit trochu silnější fixační roztok, obsahující 50% ethanol, 10% kyseliny octovou a 40% vodu.

Antitrombinová aktivita

Vzorek 2 (inkubace v 0,9 M síranu amonném) byl analyzován na biologickou AT aktivitu s trombinovým chromogenním peptidovým substrátem (S-2238) (Chromogenix, Molndal, Švédsko), podle Handeland a kol. (Scand J. Haematol. 31, 427-436, 1983). Testovací roztok sestával z trombinu, heparinu, chromogenního substrátu a vzorku, a po inkubaci byla odezva zaznamenána jako změna absorbance při 405 nm.

Výsledky

Afinitní chromatografie na heparinu poskytla eluci nativního AT v 39 min (přibližně 0,9 M chlorid sodný) a hlavní latentní vrchol byl eluován v 22 min

(přibližně 0,3 M chlorid sodný) (obrázek 1A-1B). Integrace vrcholu, málo vázajícího se k heparinu, ukázala výtěžek 44% (obrázek 1B) pro vzorek, připravený podle Wardellova způsobu (Vzorek 6), zatímco inkubace v 0,9 M síranu amonném (vzorek 2) a 0,8 M síranu amonném (vzorek 1) poskytla 71% pro vzorek 2 a 89% pro vzorek 1 celkové integrované plochy (obrázek 1C-1D). Tabulka 1 ukazuje, že procento vytvořeného L-AT se snižuje při zvýšené koncentraci síranu amonného/HEPES nebo při vyšší hodnotě pH.

Nativní elektroforeza AT, inkubovaného při 60°C ve fosforečnanu/NaCl (Vzorek 8), poskytla silnou tvorbu agregátů a pouze nepatrná část proteinu zůstala v monomerní formě (obrázek 2, dráha 8). AT inkubovaný podle Wardella (obrázek 2, dráha 6), stejně jako neinkubovaný AT (obrázek 2, dráha 7), nevytvořily žádné agregáty. Inkubace v 0,5 M síranu amonném (Vzorek 10) indukovala silnou agregaci (obrázek 2, dráha 10), zatímco 0,8 M (Vzorek 1) poskytla pouze nepatrnou část agregátů (obrázek 2, dráha 1). Síran amonný o koncentraci 0,9 - 2,0 M (Vzorky 2-5) nevedl k tvorbě viditelných agregátů (obrázek 2, dráhy 2-5). Mnoho agregátů bylo pozorováno při pH 7,0 (obrázek 2, dráha 12), zatímco při pH 7,8 vzniklo pouze malé množství agregátů (údaje nejsou ukázány).

Test antitrombinové aktivity ve vzorku 2 (s 0,9 M síranem amonným) ukázal, že 34% původní specifické aktivity zůstává; to by mělo být porovnáno s 29% ziskem AT vázajícího se s vysokou afinitou k heparinu po analýzách stejného vzorku afinitní chromatografií (Tabulka 1).

Tabulka 1: Afinitní chromatografie na heparinu. Tvorba L-AT v různých vzorkových pufrech po 16 h inkubace při 60°C.

Inkubační roztok	Vzorek č ¹	% AT s nízkou afinitou k heparinu
10 mmol Tris/HCl, 0,5 M citrát, pH 7,4 (Wardell)	6	44*
5 mM Hepes, 0,5 M síran amonný, pH 7,4	10	99
5 mM Hepes, 0,8 M síran amonný, pH 7,4	1	89
5 mM Hepes, 0,9 M síran amonný, pH 7,4	2	71*
5 mM Hepes, 1,1 M síran amonný, pH 7,4	3	56*
5 mM Hepes, 1,4 M síran amonný, pH 7,4	4	49*
5 mM Hepes, 2,0 M síran amonný, pH 7,4	5	48*
25 mM Hepes, 0,8 M síran amonný, pH 7,4	9	70
5 mM Hepes, 0,8 M síran amonný, pH 7,0	12	99
5 mM Hepes, 0,8 M síran amonný, pH 7,8	13	65

¹ Podle příkladu

* Analýza nativní elektroforézou neukázala agregáty
(viz Obr.2)

Experimentální závěry

Inkubací AT v 5 mM HEPES, pH 7,4, obsahující 0,8 M síran amonný při 60°C po dobu 16h bylo přeměněno přibližně 85-90% AT na latentní formu a inkubací AT v 5 mM HEPES, pH 7,4, obsahující 0,9 M síran amonný při 60°C po dobu 16h bylo na latentní formu AT přeměněno přibližně 70-75%. Nativní elektroforeza ukázala malý podíl agregátů v 0,8 M síranu amonném a žádné agregáty nebyly pozorovány v 0,9 M. Purifikačním postupem mohou být taková malá množství agregátu snadno odstraněna

gelovou filtrací nebo podobnými technikami.

Optimální koncentrace pro přeměnu AT na L-AT použitím síranu amonného je 0,8-0,9 M. Dobrých výsledků přeměny bude také dosaženo mezi 0,7 a 1 M, a určitých výsledků mezi 0,5 a 2,0 M. Pro tvorbu L-AT, byl postup využívající 0,5-2,0 M síranu amonného, výhodně 0,8-0,9 M, a až 25 mM HEPES, výhodně ne více než 10 mM, při pH kolem 7,4 nalezen jako ten, který poskytuje nejuspokojivější výsledky. Procento vytvořeného L-AT se bude snižovat s vyšší koncentrací síranu amonného/HEPES nebo při vyšší hodnotě pH. Kromě toho pro zabránění tvorby agregátů je nutné nepoužívat příliš nízkou koncentraci síranu amonného nebo příliš nízkou hodnotu pH.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Postup pro přípravu latentního antitrombinu III, zahrnující inkubaci roztoku nativního antitrombinu III v přítomnosti síranových iontů a pufru, vybraného z Goodových pufrů obojetných iontů.

2. Postup podle nároku 1, kde řečené síranové ionty jsou poskytnuty jako sůl, vybraná ze síranu amonného, síranů alkalických kovů a síranů alkalických zemin.

3. Postup podle nároku 2, kde řečený síran je síran amonný.

4. Postup podle jakéhokoliv z nároků 1-3, kde koncentrace řečených síranových iontů je v rozmezí od 0,5 do 2,0 M.

5. Postup podle nároku 4, kde koncentrace síranového iontu je v rozmezí od 0,7 do 1 M.

6. Postup podle nároku 5, kde koncentrace síranového iontu je v rozmezí od 0,8 do 0,9 M.

7. Postup podle jakéhokoliv z nároků 1-6, kde řečený puftr zahrnuje HEPES puftr.

8. Postup podle jakéhokoliv z nároků 1-7, kde koncentrace řečeného pufru je v rozmezí od 1 do 25 mM.

9. Postup podle nároku 8, kde koncentrace pufru je v rozmezí od 2,5 do 10 mM.

10. Postup podle nároku 9, kde koncentrace pufru je

v rozmezí od 4 do 6 mM.

11. Postup podle jakéhokoliv z nároků 1-10, kde hodnota pH je v rozmezí od 6 do 9.

12. Postup podle nároku 11, kde hodnota pH je v rozmezí od 7 do 8.

13. Postup podle nároku 12, kde hodnota pH je v rozmezí od 7,4 do 7,6.

14. Postup podle jakéhokoliv z nároků 1-13, dále zahrnuje úpravu inaktivace nebo odstranění patogenů, zejména virů nebo prionů.

15. Postup podle nároku 1, kde nativní antitrombin III byl upraven pro inaktivaci nebo odstranění patogenů, zejména virů a prionů.

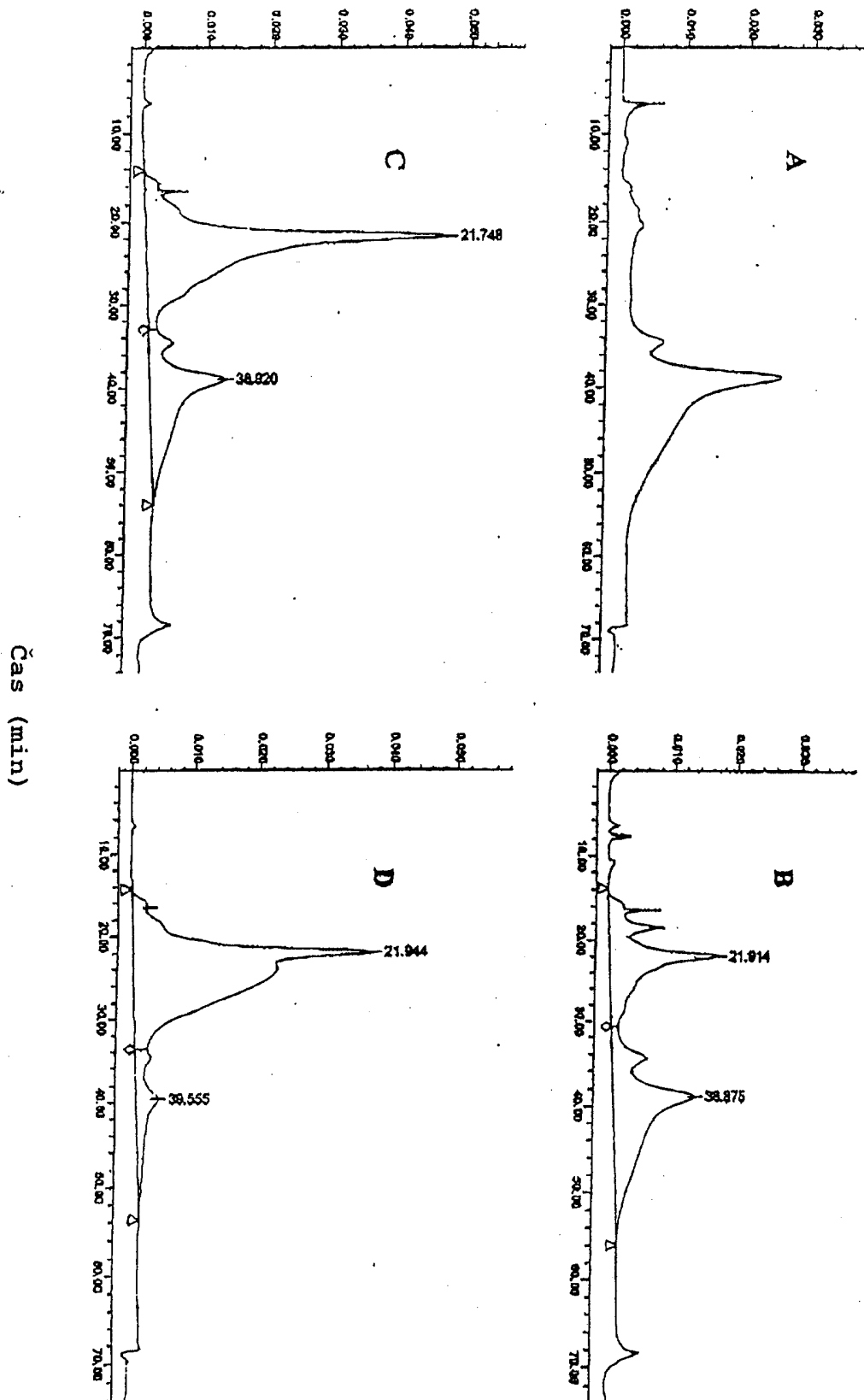
16. Postup podle nároku 14 nebo 15, kde řečená úprava zahrnuje jeden z nebo kombinaci způsobů, vybraných z chemických inaktivací, tepelných inaktivací, inaktivaci světlem, mikrovlnou inaktivaci a odstranění pomocí filtrování přes nanometrické filtry.

27.05.03

PV 2003 - 1244

1/1

Absorbance (280 nm)



Obt. 1

30.5.03

27.05.03

PV 2003-1277

2/2



Obr. 2

30.3.03 Ca 28