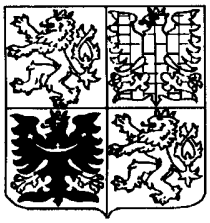
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 24.01.92

(32) 25.01.91

(31) 91/163

(33) AT

(40) 17.04.96

(21) 1547-94

(13) A3

6(51) A 61 K 35/16
A 61 K 38/00

(71) IMMUNO Aktiengesellschaft, Wien, AT;

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

(54) Způsob izolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu

(57) Řešení se týká způsobu isolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického praparátu, obsahujícího srážecí faktor IX, jehož podstata spočívá v tom, že se plasma nebo frakce plasmy, obsahující faktor IX podrobí aniontovýměnné chromatografii, navázaný faktor IX se eluuje, eluovaný faktor IX se podrobí za přítomnosti detergentu aniontovýměnné chromatografii, navázaný faktor IX se eluuje, v elulátu, obsahujícím faktor IX se inaktivují popřípadě přítomná infekční agens a hydrofobní chromatografií se oddělí faktor IX a tento se zpracuje na farmaceutický preparát.

JUDr. Miloš VŠETEČKA
advokát
120 00 PRAHA 2, Hálkova 2

1547-94

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
Došlo 14. IV 95
Čj. U 2525/23

Způsob izolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu izolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu, který obsahuje srážecí 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 koncentrátu faktoru IX s jeho vysokým obsahem, alternativně ke kombinovaným preparátům.

Výchozím materiálem pro výrobu preparátů, obsahujících faktor IX, je lidská plazma, která však obsahuje faktor IX jen v malých množstvích /4 µg/ml/. Pro získání faktoru IX musí být proto nejen zpracováno velké množství plazmy, musí

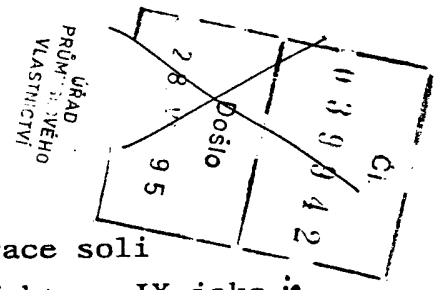
se ale také oddělit rušící doprovodné proteiny tak, jak jen to je možné. Toto je ztíženo tím, že tyto doprovodné proteiny mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti.

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 specifičtější.

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 DE-C 3914869, se získá frakce, obsahující faktor IX na adsorbentu, obsahujícím α-hydroxylaminoskupinu. Eluce adsorbovaného 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 matrici, 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, např. heparin, promyje se a eluuje. Například se podle způsobu v 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 je afinitní nosič.

V 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, 213-228/1981//.

Úloha vynálezu spočívá v nalezení chromatografického způsobu, který nemá uvedené nevýhody a umožňuje snadné získání faktoru IX z vodné směsi, která obsahuje ještě další proteiny, zejména plazmozymogen, nebo na vitaminu K závislé proteiny, a jeho zpracování na farmaceutický preparát

Podstata vynálezu

Výše uvedený úkol byl vyřešen vypracováním způsobu, jehož podstata spočívá v tom, že se

- plazma nebo frakce plazmy, obsahující faktor IX, podrobí aniontovýměnné chromatografii,
- navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je maximálně o 20 % nižší, než při chromatografii,
- eluovaný faktor IX se podrobí za přítomnosti detergentu, vybraného ze skupiny, zahrnující z anionických tenzidů

sulfatovaný oxyethylovaný alkylfenol, sulfatovaný laurylétheralkohol, dodecylbenzensulfonát sodný, 2-sulfoethyloleát sodný, N-methyl-N-oleylethanolsulfonát sodný, dodecylsulfát sodný, cholát sodný, deoxycholát sodný, dodecylsulfonát sodný a dodecyl-N-sarconisát sodný ; z kationických tenzidů dodecyldimethylbenzylamoniumchlorid, oxyethylované aminy, cetyltriethylamoniumbromid, tetradecylamoniumbromid, dodecylpyrimidiniumchlorid a hexadecyltrimethylamoniumchlorid ; z amfolytických tenzidů dodecyl-β-alanin, kyselinu N-dodecylaminoethansulfonovou, palmitoyllysolecitin a dodecyl-N-betain, a z neionických tenzidů kondenzáty ethylenoxidu a propylenoxidu, oxyethylovaný alkylfenol, parciální estery mastných kyselin C_{12-22} a hexitol anhydridů, polyoxyethylované deriváty parciálních esterů, získaných adicí polyoxyethylenových řetězců na neesterifikované hydroxyly, polyoxyethylenové parciální estery mastných kyselin a polyoxyethylenové ethery mastných alkoholů, aniontovýměnné chromatografii,

- ~~navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je maximálně o 20 % nižší než při aniontovýměnné chromatografii,~~ navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je maximálně o 20 % nižší než při chromatografii,
- v eluátu, obsahujícím faktor IX, se inaktivují eventuálně přítomná infekční agens a
- hydrofobní chromatografií se oddělí faktor IX .

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, za přítomnosti plazmazymogenu nebo na vitaminu K závislého proteinu. Toto je překvapující, neboť uvedené proteiny mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Tato selektivní adsorpční schopnost faktoru IX může být použita k získání faktoru IX.

Eluce se provádí, jak je to běžné u hydrofobní chromatogafie, při nižších vodivostech než adsorpce. Výhodně se eluce provádí při vodivosti, která je maximálně o 20 % nižší.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Z 10 litrů lidské krevní plazmy se získá metodou podle Brummelhuise /Methods of Plasma Protein Fractionation, ed. JM Curling, str. 117, Acad. Prass. 1980/ prothrombinový komplex /krevní srážecí faktory II, VII, IX a X/ adsorpcí na DEAE-Sephadexu. Po ml prothrombinového komplexu /3669 m.j. faktoru II, 2858 m.j. faktoru IX a 2734 m.j. faktoru X/ 1000 mM NaCl, 15 mM citrát sodný, PH 7/, přičemž vodivost je v rozmezí 60 - 120mA.

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.

P ř í k l a d 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 1,4M 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.

P ř í k l a d 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 Y /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 promytí impregnované-

ho 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.

P ř í k l a d 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 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. Faktor X byl stopový.

P ř í k l a d 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 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.

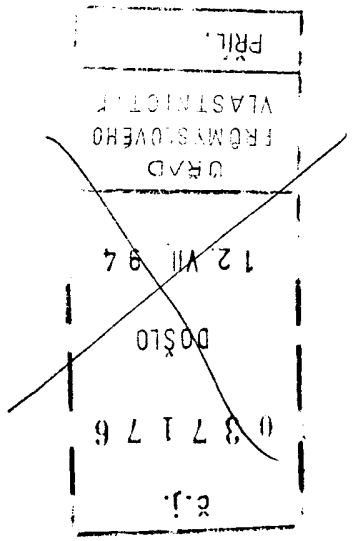
P ř í k l a d 5

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

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

Tímto způsobem získaný přípravek faktoru IX se může zpracovat pomocí klasických metod na farmaceutický preparát faktoru IX , který je oproti známým preparátům podstatně zlepšený.

Získaný přípravek faktoru IX se po eluci na Octyl--Sepharose-CL-4B dialyzuje proti pufru, obsahujícímu 10 mM TRIS a 150 mM NaCl, nastaví se na 50 E faktor IX/ml, smísí se s heparinem a lyofilizuje se. Lyofilizovaný preparát je stabilní při skladování a může se kdykoli pomocí vody pro injekce rekonstruovat na farmaceutický preparát faktoru IX, schopný okamžité aplikace.,



JUDr. Miloš VEČEŘA
advokát
120 00 PRAHA 2, Hálkova 2

1547-94

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob izolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu, obsahujícího srážecí faktor IX, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- plazma nebo frakce plazmy, obsahující faktor IX, podrobí aniontovýměnné chromatografii,
- navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je maximálně o 20 % nižší než při chromatografii,
- eluovaný faktor IX se podrobí za přítomnosti detergentu, vybraného ze skupiny, zahrnující z anionických tenzidů sulfatovaný oxyethylovaný alkylfenol, sulfatovaný lauryletheralkohol, dodecylbenzensulfonát sodný, 2-sulfoethyloleát sodný, N-methyl-N-oleylethanolsulfonát sodný, dodecylsulfát sodný, cholát sodný, deoxycholát sodný, dodecylsulfonát sodný a dodecyl-N-sarconisát sodný ; z kationických tenzidů dodecyldimethylbenzylamoniumchlorid, oxyethylované aminy, cetyltriethylamoniumbromid, tetradecylamoniumbromid, dodecylpyrimidiniumchlorid a hexadecyltrimethylamoniumchlorid ; z amfolytických tenzidů dodecyl-β-alanin, kyselinu N-dodecylaminoethansulfonovou, palmitoyllysolecitin a dodecyl-N-betain, a z neionických tenzidů kondenzáty ethylenoxidu a propylenoxidu, oxyethylovaný alkylfenol, parciální estery mastných kyselin C_{12-22} a hexitol anhydridů, polyoxyethylované deriváty parciálních esterů, získaných adicí polyoxyethylenových řetězců na neesterifikované hydroxyly, polyoxyethylenové parciální estery mastných kyselin a polyoxyethylenové ethery mastných alkoholů, aniontovýměnné chromatografii,

~~- aniontovýměnné chromatografii,~~

~~- navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je~~

- navázaný faktor IX se eluuje při vodivosti, která je maximálně o 20% nižší než při chromatografii,

~~maximálně o 20 % nižší než při chromatografii~~,

- v eluátu, obsahujícím faktor IX, se inaktivují eventuelně přítomná infekční agens a
- hydrofobní chromatografií se oddělí faktor IX .

JUDr. Miloš Všetečka

Za správnost

1547-94

ANOTACE

Název vynálezu : Způsob isolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu.

Řešení se týká způsobu isolace srážecího faktoru IX pro výrobu farmaceutického preparátu, obsahujícího srážecí faktor IX, jehož podstata spočívá v tom, že se
-plazma nebo frakce plazmy, obsahující faktor IX, podrobí aniontovýměnné chromatografii,
-navázaný faktor IX se eluuje,
-eluovaný faktor IX se podrobí za přítomnosti detergentu aniontovýměnné chromatografii,
-navázaný faktor IX se eluuje,
-v eluátu, obsahujícím faktor IX, se inaktivují popřípadě přítomná infekční agens a
-hydrofobní chromatografií se oddělí faktor IX a tento se zpracuje na farmaceutický preparát.