

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

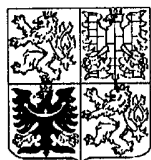
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

4356-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/673064**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/11256**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/00154**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/00
C 07 K 14/81

(71) Přihlášovatel:

ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION, Los Angeles, CA, US;

(72) Původce:

Hwang Duk Sung, South Pasadena, CA, US;

Nario Evelyn, Chino Hills, CA, US;

Lepe Mark, West Covina, CA, US;

Luz Lyndon, Huntington Park, CA, US;

Ito Hirokazu, Arcadia, CA, US;

Takechi Kazuo, Arcadia, CA, US;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob oddělování inhibitoru alfa-1-proteinasy od pastové Cohn-ovy frakce IV1 + IV4

(57) Anotace:

Způsob čištění .alfa.-1-PI nečisté proteinové frakce, obsahující .alfa.-1-PI. Tato nečistá proteinová frakce se suspenduje ve vodném roztoku s hodnotou pH 8,5. Přidáním polyethylenglykolu dojde k vysrážení .alfa.-2-proteinů. Ke kapalině nad sedlinou po vysrážení polyethylenglykolem, obsahující .alfa.-1-PI, se přidá chlorid zinečnatý, kterým se vysráží surový .alfa.-1-PI. Tento surový .alfa.-1-PI se znovu rozpustí, roztok se nanese na aniontově-výměnnou kolonu a z tohoto prostředí se získá frakce s obsahem .alfa.-1-PI. Tímto způsobem čištěný .alfa.-1-PI má čistotu asi 1,0 jednotek/opt. hustotu 280.

CZ 4356-98 A3

Způsob oddělování inhibitoru α -1-proteinasy
 od pastové Cohn-ovy frakce $IV_1 + IV_4$

Oblast techniky

Tento vynález se týká zlepšeného způsobu čistění inhibitoru α -1-proteinasy (α -antitrypsinu).

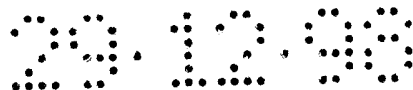
Dosavadní stav techniky

Inhibitor α -1-proteinasy (zde též α -1-PI), známý rovněž jako α -antitrypsin, je serovým glykoproteinem v mol.hmotností 52.000. Tato látka je syntetizována v játrech a je obsažena v séru v množstvích mezi 150 až 350 mg/dl), což se rovná 30 až 80 μ M při testování krevními standardy.

α -1-PI působí v plicích inhibičně na neutrofilní elastasu, serinovou proteasu, jež ve velkých množstvích může vést k destrukci alveolárních stěn. V normálních plicích představuje α -1-PI více než 90% anti-neutrofilní elastasovou ochranu v nižším dýchacím traktu.

Nedostatek α -1-PI je autosomální, zhoršující se dědičná svízeľ, ovlivňovaná celou řadou allelických variant a byla charakterizována allelickým uspořádáním označovaným jako proteasový inhibiční systém (PI). Tyto allelely byly seskupeny na základě hladin α -1-PI, jak se projevují v séru různých jednotlivců. Normální jednotlivci mají normální hladinu α -1-PI v séru (normální jednotlivci se označují jako PiMM fenotypy). Deficitní jednotlivci mají serovou hladinu α -1-PI pod 35% normálního průměru (tito jednotlivci jsou označováni jako PiZZ fenotypy). Nulí jednotlivci mají nedokazatelný obsah α -1-PI proteinu v séru (odtud označení Pi(nula)(nula) fenotypy).

Nedostatek α -1-PI je charakterizován nízkými hladinami α -1-PI v séru (méně než 35% průměrné normální hladiny) a v plicích. Tento nedostatek je u zmíněných jednotlivců spojen s vysokým rizikem vývoje panacinarní záduchy. Taková záducha převládá u jednotlivců s fenotypy PiZZ, PiZ(nula) a



PiZ(nula)(nula). Symptomy tohoto stavu se obvykle projeví u postižených jednotlivců v třetím nebo čtvrtém desetiletí jejich života.

Záducha ve spojitosti s nedostatkem α -1-PI se rozvíjí v důsledku nedostačujících koncentrací α -1-PI v nižších částech dýchacího traktu, kde je třeba inhibovat neutrofilní elastasu, vedoucí k rozrušení spojovacího tkáňového pletiva plicního parenchymu. Jednotlivci s nedostatkem α -1-PI jsou málo chráněni proti neutrofilní elastase, uvolňované neutrofilny v nižší části dýchacího traktu. Tato nerovnováha inhibitoru proteasa: proteasa u jednotlivců s nedostatkem α -1-PI se projeví chronickým poškozováním a posléze i zničením plicního parenchymu a alveolárních stěn.

Jednotlivci s vážným nedostatkem α -1-PI se vyznačují typicky hladinami α -1-PI v endogenním séru pod 50 mg/dl, to dle stanovení standardizovanými postupy. Jednotlivci s tak nízkými sérovými hladinami α -1-PI mají vyšší riziko, než je 80%, že se u nich během doby života projeví záducha. Odhaduje se, že v USA nejméně 40.000 pacientů, nebo jinak 2% ze všech, trpících záduchou, jsou postiženi tímto neduhem v důsledku defektu v genu s kodováním α -1-PI. Nedostatek α -1-PI představuje jednu z nejběžnějších a smrtelných nemocí Kavkazánů ve Spoj. Státech a Evropě.

Léčení pacientů s nedostatkem α -1-PI směřuje k nahrazení nebo zvýšení hladiny α -1-PI v séru. Zvýší-li se hladina α -1-PI v séru, lze předpokládat, že v důsledku toho se zvýší koncentrace v plicích, čímž se upraví nerovnováha neutrofilní elastasa: α -1-PI v plicích a předejde se destrukci plicní tkáně, nebo se tento pochod zpomalí. Studie při sledování normální a α -1-PI deficitní populace vedly k názoru, že minimální ochranná hladina α -1-PI v séru odpovídá 80 mg/dl nebo jinak 11 μ M (asi 57 mg/dl), to při použití čistých standardů. V důsledku toho je nejúčinnější léčba α -1-PI-deficitních pacientů zaměřena na zajištění či dosažení minimální ochranné hladiny α -1-PI v séru, protože α -1-PI v séru je zdrojem alveolární α -1-PI.

Přípravky s obsahem Δ -1-PI pro terapii jsou dostupné od let 1980. Nejvyšší využití je směřováno na terapii zmnožení (nahrazení) kongenitálního nedostatku Δ -1-PI. Poločas života lidského Δ -1-PI in vivo odpovídá 4,38 dnům se standardizovanou úchylkou 1,27 dnů. Běžně doporučená dávka 60 mg Δ -1-PI/kg tělesné hmotnosti týdně upraví nízkou hladinu Δ -1-PI v séru nad ochrannou hladinu 11 μ M nebo 80 mg/dl.

Dříve byl Δ -1-PI čistěn různými postupy. Jeden z nich kombinuje chromatografování na aniontově-výměnném chromatografickém prostředí s následujícím PEG⁺ srážením. Jiné způsoby čistění využívají PEG srážení s následnou aniontově-výměnnou chromatografií, nebo několikanásobné PEG vysrážení s následnou aniontově-výměnnou chromatografií. Jinak byly použity kombinace PEG srážení, jeden či více stupňů aniontově-výměnné chromatografie a stupeň kovově-chemátové chromatografie.

A ještě další způsoby využívají techniku dělení fází k vyčistění Δ -1-PI. Specifické aktivity 1,26 jedn./mg byly oznámeny pro čistěný Δ -1-PI.

Podstata vynálezu

Vynález se řízen na zlepšený způsob čistění Δ -1-PI; záleží v použití nečisté proteinové frakce, s výhodou Cohn-ovy frakce IV₁ + IV₄ ve formě pasty, jež obsahuje Δ -1-PI. Nečistá proteinová frakce se suspenduje ve studené vodě nebo v roztoku solanky za hodnoty pH asi 6 k rozpuštění rozpustných proteinů, čítaje v to albumin, α -2-globulin (α -2-makroglobulin a hatoglobulin) a β -globulin (transferrin). Suspenze se potom filtruje, aby se tak získaly nerozpustné proteiny s obsahem Δ -1-PI a ty se promyjí vodou (nebo roztokem solanky). Frakce promytých nerozpustných proteinů se znovu suspenduje ve vodě (nebo v roztoku solanky), hodnota pH se upraví asi na 8,5 a přidáním PEG se vysráží α -2-globulin. Kapalina nad sedlinou se odlije a přidáním chloridu zinečnatého se vysrá-

⁺/PEG = polyethylenglykol 3350

ží surový α -1-PI. Tato surová látka se znovu rozpustí v pufru sodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny a viry se deaktivují přidáním Tween-u 80 a tri-n-butylesteru kyseliny fosforečné (TNBP). S výhodou se přidá některý ze sacharidů, jako je sacharosa, maltosa, glukosa a pod., aby se stabilizoval α -1-PI v průběhu deaktivace virů a zvýšil se pak výtěžek.

Takto zpracovaný roztok se nanese na aniontově-výměnné prostředí k oddělení α -1-PI od dalších zbývajících proteinů. Frakce, obsahující α -1-PI se oddělí a zpravidla se upraví přidáním bentonitu, aby se tak odstranily jakékoli apolipo-proteiny, jsou-li přítomny. Takto vzniklý čistěný roztok α -1-PI se dále zahustí.

Tímto způsobem vyčištěný α -1-PI má specifickou účinnost nad 1,0 /jedm./OD₂₈₀. Tímto postupem lze dosáhnout výtěžku nad asi 1,0 jedn/g pasty, s výhodou pak nad asi 1,3, jedn/g pasty.

Použitím postupu dle tohoto vynálezu se zlepší kvalita i výtěžek α -1-PI. Dále pak se tímto postupem zkrátí doba čistění ve srovnání s jinými způsoby.

Podrobný popis

Způsob zahrnuje jedinečnou kombinaci stupňů čistění za dosažení vysokého výtěžku a vysoké specifické aktivity α -1-PI přípravku.

Čistění α -1-PI vychází z nečisté proteinové frakce. Touto nečistou proteinovou frakcí může být plazma, dále α -1-PI získaný jakoukoli rekombinantní metodou či jakýkoli jiný zdroj, obsahující α -1-PI protein. Při výhodném provedení je výchozí frakcí Cohn-ova frakce IV₁ + IV₄ ve formě pasty; její příprava je na tomto úseku velmi dobře známa.

Počáteční zpracování pastovité frakce IV₁ + IV₄

Pastovitá frakce IV₁ + IV₄ (nebo jiná nečistá proteinová frakce) se suspenduje v 5 ± 2 dílech vody nebo roztoku solanky (tj. asi 0,05 až asi 0,15 M chloridu sodného na 1 díl

frakce, tedy $IV_1 + IV_4$) za teploty pod asi 15°C a za hodnoty pH asi $6,0 \pm 0,2$, a to nejméně asi na hodinu. Rozpustné proteiny, zahrnující albumin, α -2-globulin a β -globulin, se potom oddělí od nerozpustných proteinů, obsahujících i inhibitor α -1-proteinasy, filtrací za tlaku, odstředěním a pod. Zbytek se promyje za teploty pod 15°C asi pětinasobnými podíly vody nebo roztoku solanky (se zřetelem na objem původní pasty) za hodnoty pH $6 \pm 0,2$, aby se tak odstranily jakékoli zbytky rozpustných proteinů, zachycené fyzikálně v nerozpustné pastě.

Bylo zjištěno, že suspendováním pastovité frakce $IV_1 + IV_4$ ve vodě nebo v roztoku solanky za hodnoty pH $6,0 \pm 0,2$ s následujícím promýváním vodou se odstraní takřka všechny albuminy a vysráží se většina z α -2- a β -proteinů z frakcí $IV_1 + IV_4$.

Srážení použitím PEG

Nerozpustné proteinové zbytky se znovu suspendují v asi 5 ± 2 objemech vody za hodnoty pH $8,5 \pm 0,5$ na objem zbytku za teploty od asi $15^\circ \text{C} \pm 5^\circ \text{C}$, s výhodou po dobu asi 6 hodin, ačkoliv se mohou využít kratší či delší časy. Kratší doby výhodné nejsou, protože výtěžek se vylepšuje, jak se doba zpracování prodlužuje. Jako optimální kombinace doby a výtěžku při postupu se ukazuje být 6 hodin. Potom se přidá pevný Tris do konečné koncentrace $10 \pm 5 \text{ mM}$, a přidá se také pevný chlorid sodný do konečné koncentrace $150 \pm 20 \text{ mM}$, hodnota pH se upraví na 8,0. Posléze se přidá polyethylenglykol 3350 (PEG) do konečné koncentrace $15 \pm 5\%$ hmotn. a reakční směs se míchá asi hodinu za teploty $15 \pm 5^\circ \text{C}$. Přidáním PEG se vysráží α -2-globulin.

Sraženina, jež se vyloučí po přidání PEG, se odsáhne za tlaku, filtrační tlakové zařízení se promyje před filtrací i potom použitím roztoku s obsahem $150 \pm 25 \text{ mM}$ chloridu sodného + 5% hmotn. PEG, to za hodnoty pH $8,0 \pm 0,5$. Potom lze také sraženinu získat odstředěním.

Sražení chloridem zinečnatým

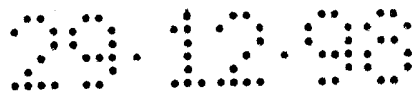
Do kapaliny nad sraženinou po přidání PEG se přidá chlorid zinečnatý (100 ± 10 mM) až do konečné koncentrace 6 ± 5 mM a hodnota pH roztoku se upraví na $7,5 \pm 0,5$. Roztok se ochladí na teplotu $5 \pm 5^\circ$ C, míchá se nejméně hodinu; chlorid zinečnatý vysráží surový Δ -1-PI, ten se oddělí filtrací, s výhodou použitím ProstackTM filtrací, jak je to popisováno například v "Prostack Open-Channel Modules", Millipore Corporation, na což se zde odkazuje, nebo odstředěním a filtrát se odebere. Koncentrovanou suspenzi nebo sraženinu lze pro dslší upotřebění zmrazit.

Virové deaktivování zpracováním bez rozpouštědla

Surový Δ -1-PI se znovu rozpustí v asi 50 mM roztoku sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové použitím filtrace Prostack a recirkulace. Sacharid, s výhodou sacharosa, se přidá v množství asi $15 \pm 5\%$ hmotn. (nebo asi $0,25 \pm 0,05$ trisodné soli kyseliny citronové), jakož i stabilizátor během virové deaktivace. Roztok se míchá za teploty $15 \pm 5^\circ$ C, až se sacharosa rozpustí.

Roztok, obsahující Δ -1-PI se z hlediska viru deaktivuje působením rozpouštědla povahy detergentu. K roztoku Δ -1-PI se přidá roztok $10 \pm 1\%$ hmotn/obj polysorbitalu 80 a $3 \pm 0,3\%$ hmotn tri-n-butylesteru kyseliny fosforečné, a to až do konečné koncentrace $1,0 \pm 0,5\%$ hmotn/obj. polysorbitalu-80 a $0,3 \pm 0,15\%$ hmotn. tri-n-butylesteru kyseliny fosforečné. Dále se roztok inkubuje za teploty $27^\circ \pm 3^\circ$ C, pH $8 \pm 0,5$ po dobu nejméně 6 hodin, aby se tím deaktivoval jakýkoli virus, přítomný v Δ -1-PI.

Bylo nalezeno, že za přítomnosti sacharidu, například sacharosy jako stabilizátoru během virové deaktivace při použití způsobu rozpouštědlo/detergent se zvyšuje výtěžek Δ -1-PI v jednotkách ve srovnání s kontrolním pokusem, t.j. za virové deaktivace roztoku Δ -1-PI rozpouštědlem/detergentem bez sacharidu jako stabilizátoru. Zvýšení výtěžku činí s výhodou nejméně 10%, s výhodou nejméně 20% a nejvýhodněji nejméně 30%.



Po inkubování se upravený roztok α -1-PI ochladí na 0° až -10°C , hodnota pH pak na $8,0 \pm 0,1$.

Aniontově-výměnná chromatografie

Získaný roztok se potom zředí asi jedním objemem vody na objem získaného roztoku, zředěný roztok se dále nanese na předem rovnovážně upravené chromatografické prostředí QAE nebo na jiné podobné aniontově-výměnné prostředí, jež váže α -1-PI, což dovoluje oddělení této látky od jiných proteinů. Přitom lze použít buď chromatografování dávek nebo sloupcovou chromatografii. Jakmile se α -1-PI naváže adsorpcí na prostředí, promyje se toto pufrům obsahujícím 20 ± 10 mM chloridu sodného a $20 \pm$ mM prim. fosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) za pH hodnoty 8 ± 1 , aby se tak odstranily nena- vázané podíly, čítaje v to β -proteiny. Potom se eluuje z aniontově-výměnného chromatografického prostředí α -1-PI eluováním promývací kapalinou, obsahující 100 ± 50 mM chloridu sodného a 20 ± 10 mM fosforečnanu sodného za pH 8 ± 1 . Eluát s obsahem α -1-PI se jímá pro další zpracovávání.

Po odstranění α -1-PI se aniontově-výměnné prostředí vyčistí promytím následujícími složkami takto:
vodný roztok, obsahující $2 \pm 0,2$ mM chloridu sodného a 20 ± 10 mM fosforečnanu sodného, pH 8 ± 1 ,
vodou, určenou k injikování,
vodným roztokem, obsahujícím 50 mM hydroxidu sodného a potom znovu vodou, určenou k injikování. Chromatografické prostředí se potom uchovává v $2 \pm 0,2$ M roztoku chloridu sodného, 20 ± 10 mM roztoku fosforečnanu sodného, pH 8 ± 1 .

Zpracovávání eluátu s obsahem α -1-PI

Eluáty obsahující α -1-PI se spojí a přidáním 0,1 až 1,0% (hmotn/hmotn) bentonitu se hodinovým či delším působením odstraní či sníží množství apolipo-proteinů na méně než asi 0,01 mg/ml spolipo proteinu A a méně než asi 0,01 mg/ml apolipo proteinu B. Bentonit se potom odfiltruje, s výhodou použi-

tím filtrace Cuno, například jak je to popisováno v "Zeta Plus C Series Filter Medium", Cuno Inc, na což se zde pro úplnost odkazuje. Získaný roztok se potom koncentruje použitím ultrafiltrační membrány, až se aktivita α -1-PI rovná nejméně 1,0 jedn./ml. Koncentrovaný filtrát se dále filtruje 0,45 mikronovým filtrem se zřetelem na odstranění jakýchkoli pevných podílů, potom se α -1-PI filtruje použitím "Planova" k odstranění viru, sterilně se filtruje 0,22 mikronovým filtrem k rozdělení do drobných ampulek a pro uskladnění se lyofilizuje. Uskládňuje se tak α -1-PI za teploty 2 - 8°C.

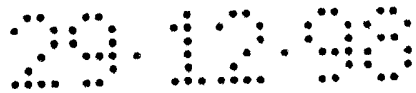
Lyofilizovaný α -1-PI se může pak znovu rozpustit ve sterilní vodě při podávání pacientovi.

Testy aktivity α -1-PI

Chromogenní test se může využít k zjištění aktivity α -1-PI v rekonstituovaném α -1-PI. Test využívá trypsinem sensitivní chromogenní substrát, ze kterého se uvolňuje p-nitroanilin za přítomnosti trypsinu (Sigma Chemical Co., Sr.Louis, Missouri). Uvolněný p-nitranilin se zjistí za vlnové délky 405 nm. α -1-PI inhibuje uvolnění p-nitranilinu ze substrátu. Aktivita α -1-PI v produktu se stanoví porovnáním se standardizovanou křivkou aktivity α -1-PI. Chromogenní test rekonstituovaného lyofilizovaného α -1-PI, připraveného ve shodě s právě zde výše popisovaným postupem prokazuje specifickou aktivitu nejméně asi 1,0 jedn/OD₂₈₀.

Podávání

Pacientovi lze podávat α -1-PI infuzemi rychlostí asi 0,08 ml/kg tělesné hmotnosti za minutu po prvních 10 minut, Neztěžuje-li si pacient na cokoli, lze rychlost podávání zvyšovat, jak je to tolerováno, a pokud je to tolerováno, pak další následné infuze témuž pacientovi mohou být zvýšeny. Dojde-li k opaku, sníží se rychlost nebo se infuze přeruší, až symptomy zmizí. Pak lze infuzi obnovit za rychlosti, jež je pacientem tolerována.



Mají-li se podávat vysoké dávky, pak lze několik ampulek α -1-PI spéjit do prázdného, sterilního i.v. infuzního kontejneru za užití aseptického postupu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

600 g pasty frakce $IV_1 + IV_4$ z Cohn-ova frakcionačního schématu se suspenduje v 1800 ml vody za teploty 5°C a hodnoty pH 6,0 bez jakékoli titrace po dobu hodiny. Po skončeném suspendování se suspenze filtruje za tlaku 10 CP filtrem (Cuno). Filtrát se shromáždí, testuje a změří se specifická aktivita α -1-PI a optická hustota při 280 nm ($OD_{280 \text{ nm}}$). Pasta zbylá v tlakovém filtru se promyje použitím 600 ml vody při 5°C , filtrát se jímá a tento postup se opakuje ještě čtyřikrát. Všechny filtráty se testují za změření specifické aktivity i optické hustoty. Hmotnost výsledné pasty: 350 g. Specifická aktivita a optická hustota všech procesních vzorků je popsána v následující tabulce I.

T a b u l k a I

Aktivita α -1-PI a opt.hustota (280 nm) frakcí vymytých vodou

Vzorek promytí	Objem (mL)	α -1-PI (u/mL)	α -1-PI celkově (u)	Opt.hustota 280 nm	Spec.aktivita (u/OD)
0	1450	0,06	87	22,2	0,003
1	600	0,1	60	29,9	0,003
2	600	0,08	48	25,5	0,003
3	600	0,04	24	13,0	0,003
4	600	0	0	4,8	0
5	600	0	0	3,0	0

U = unit, jednotek

Příklad 2

350 g výsledné pasty z příkladu 1 se znovu suspenduje v

1050 ml vody za hodnoty pH 8,5 za teploty 18° C po dobu 6 hodin. Přidá se pevný Tris do koncové koncentrace 10 mM a pevný chlorid sodný do koncové koncentrace 150 mM za úpravy pH na hodnotu 8,0. Polyethylenglykol (PEG 3350) se dále přidá do koncové koncentrace 15% (hmotn), vše se míchá hodinu při 18° C, vzniklá sraženina se odstraní tlakovým filtrem s 10 CP filtrem pro získání kapaliny nad sedlinou. Pasta v tlakovém filtru se potom promývá roztokem s obsahem 15% (hmotn) polyethylenglykolu PEG-3350, 10 mM Tris a 150 mM chloridu sodného. Filtrát a podíl z filtrování se spojí. Výsledek je shrnut v tabulce 2.

T a b u l k a 2

PEG-3350 srážení					
Vzorek	Objem (mL)	Δ-1-PI (u/mL)	Δ-1-PI (celkově) (u)	Opt.hustota 280 nm	Spec.akt. (u/OD)
pův.	1400	1,063	1488	13,32	0,0798
PEG-filt-rát	2465	0,513	1265	2,16	0,2375

Příklad 3

K získanému filtrátu PEG-3350 z příkladu 2 se přidává chlorid zinečnatý do koncové koncentrace 2 mM, hodnota pH se upraví na 7,5, teplota se sníží na 5° C k vysrážení surového Δ-1-PI. Po hodinovém míchání se surový Δ-1-PI odfiltruje (Prostak) a získaná suspenze se znovu rozpustí v roztoku sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

T a b u l k a 3

Srážení chloridem zinečnatým					
Vzorek	Objem (ml)	Δ-1-PI (u/ml)	Δ-1-PI(celkově) (u)	Opt.hustota 280 nm	Spec.akt. (u/OD)
Prostak filtrát	2200	0,0159	35	0,15	0,106
po NaEDTA	264	4,305	1065	13,72	0,3138

Příklad 4 Sacharosa v množství 16,7 % (hmotn) se přidá k roztoku po rozpuštění působením sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (příklad 3) a vše se míchá za teploty 18° C, až se sacharosa zcela rozpustí. K tomuto roztoku se, přidá polysorbát-80 do konečné koncentrace 1,0% a tri-n-bůtylester kyseliny fosforečné do konečné koncentrace 0,3%. Roztok se dále inkubuje za teploty 27,5° C nejméně po 6 hodin pro deaktivování jakéhokoli možného viru, znečišťujícího zachycením v lipidu. Po skončeném inkubování se roztok ochladí na 5° C, hodnota pH se upraví na 8,0 a pro kontrolu se výše uvedený postup opakuje, aniž se přidá sacharosa. Stabilita Δ -1-PI během působení rozpouštědla-detergentu (SD) za přítomnosti 16,7% sacharosy a bez sacharosy (kontrolní pokus) je vyjádřena v následující tabulce 4.

T a b u l k a 4

Stabilita Δ -1-PI během reakce s rozpouštědlem-detergentem za přítomnosti sacharosy

Vzorek	Objem (ml)	Δ -1-PI (u/ml)	Δ -1-PI (celkově) (u)	% Δ -1-PI z NaEDTA
SD- Δ 1-PI	311	3,35	1042	97,8
kontrola	293	2,13	624	58,6

Příklad 5

K získanému roztoku Δ -1-PI v rozpouštědle-detergentu z příkladu 4 se přidá 311 g destilované vody ke snížení iontového zatížení před nanesením na QAE kolonu. Roztok se nanese na 300 ml předem upravené QAE iontoměničové kolony s průtokem 12 ml/min. Kolona se promyje použitím 6 ml fosfátového pufru s obsahem solanky (20 mM chloridu sodného, 20 mM prům.fosforečnanu sodného NaH_2PO_4 , pH 8,0). Dále se získá Δ -1-PI eluováním za použití 1,8 L fosfátového pufru s obsahem solanky (100mM chloridu sodného, 20 mM uvedeného fosfátu,

pH 8,0).

Iontoměničové prostředí se promyje postupně použitím: 2 M roztok chloridu sodného, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500mM roztoku hydroxidu sodného a destilovanou vodou. Chromatografické prostředí se uchovává v 2 M roztoku chloridu sodného, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0. Spojené frakce s obsahem Δ -1-PI se teatují, výsledky viz následující tabulce 5.

T a b u l k a 5

QAE-iontová chromatografie

Vzorek	Objem (ml)	Δ -1PI (u/ml)	Δ -1PI (celkově) (u)	Opt.hustota 280 nm	Spec.akt. (u/OD)
Eluát	1500	0,62	930	0,58	1,058

Příklad 6

Ke spojenému eluátu z příkladu 5 se přidá 3,0 g depyrogenovaného bentonitu a vše se míchá hodinu při 20° C. Bentonit se odstraní filtrací (Cuno), filtrát se zahustí ultrafiltrací. Koncentrát se filtruje (Planova) a dále v seriích sterilně. Filtrát se rozdělí do ampulek s lyofilizováním při skladování. Všechny procesní vzorky byly testovány, výsledky v tabulce 6:

T a b u l k a 6

Vzorek	Objem (ml)	Δ -1PI (u/ml)	Δ -1PI (celkově) (u)	Opt.hustota 280 nm	Spec.akt. (u/OD)
Filtrát (Cuno)	1710	0,52	885	0,385	1,351
Koncentrát	75	11,6	870	8,092	1,434
Konečný vzorek	92	0,4	865	6,225	1,510

Vynález není jakkoli omezován specifickými příklady provedení. Odborníkům jsou jasné možné variace materiálů, stupňů, procesních parametrů, lišících se od zde popisovaných provedení, aniž by se přitom odbočilo z rozsahu vynálezu. Není tedy vynález jakkoli omezován předloženými příklady, viz také přiložené nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob čistění α -1-PI, vyznačující se tím, že zahrnuje tyto stupně:

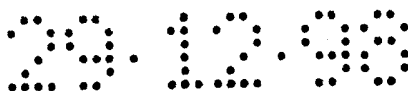
použije se nečistá proteinová frakce obsahující α -1-PI, tato frakce obsahující α -1-PI se suspenduje ve vodném roztoku o hodnotě pH asi 6 po dobu dostačující k tomu, aby se rozpustily rozpustné proteiny, suspenze se filtruje a zachytí se nerozpustné proteiny, k resuspendovaným nerozpustným proteinům se přidá polyethylenglykol PEG 3350 k vysrážení α -2-globulinu, oddělí se kapalina nad sedimentem po tomto srážení polyethylenglykolem PEG 3350, přičemž kapalina nad sedimentem obsahuje α -1-PI, k této kapalině se přidá chlorid zinečnatý k vysrážení surového α -1-PI, oddělí se surový α -1-PI, získaný surový α -1-PI se rozpustí, rozpouštěný surový α -1-PI se nanese na iontoměničové aniontové prostředí, a z tohoto aniontově-výměnného prostředí se izoluje frakce, obsahující vyčistěný α -1-PI.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se nečistá proteinová frakce obsahující α -1-PI, suspenduje v asi 3 až asi 7 objemech vodného roztoku na každí díl nečisté proteinové frakce, obsahující α -1-PI.

3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se vodný roztok volí ze skupiny, kterou tvoří voda a roztoky obsahující chlorid sodný v koncentraci od asi 0,05 do asi 0,15 M.

4. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se hodnota pH vodného roztoku, obsahujícího nerozpustný protein, upraví na hodnotu asi 8,5.

5. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že



se polyethylenglykol PEG přidává do koncentrace 10% až asi 20% zmoth/hmotn.

6. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se hodnota pH kapaliny nad sedlinou po vysrážení polyethylenglykolem upraví asi na 7,5.

7. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se přidává chlorid zinečnatý do koncentrace od asi 1 do asi 11 mM.

8. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se dále zpracovává surový α -LPI, získaný po srážení chloridem zinečnatým, aby se deaktivovaly jakékoli virové nečistoty.

9. Způsob podle nároku 8, vyznačující se tím, že se na surový α -LPI působí rozpouštědlem a detergentem.

10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že se na surový α -LPI působí tri-n-butylesterem kyseliny fosforečné a polysorbátem 80.

11. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že se na surový α -LPI působí tri-n-butylesterem kyseliny fosforečné v množství 0,15 až 0,45% (hmotn/obj) a polysorbátem 80 v množství 0,5 až 1,5% (hmotn/obj).

12. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se přidává bentonit do eluátu, obsahujícího inhibitor α -L-proteinasy.

13. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že vyčistěný α -L-PI má specifickou aktivitu asi 1,0 jedn/OD₂₈₀.

14. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že vyčistěný α -LPI se získá ve výtěžku nejméně asi 1 jedn. na gram pastovité frakce IV₁ + IV₄.

15. Způsob čištění α -LPI, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně
přípravu nečisté proteinové frakce s obsahem α -LPI,

suspendování nečisté proteinové frakce s obsahem λ -LPI ve vodném roztoku za hodnoty pH asi 6 po dobu dostačující k rozpuštění rozpustných proteinů,

filtrování suspenze s izolováním nerozpustných proteinů, obsahujících α -LPI,

resuspendování proteinů ve vodném roztoku o hodnotě pH asi 8,5,

přidání polyethylenglykolu k vodnému roztoku, obsahujícímu resuspendovaný nerozpustný protein na koncentraci od asi 10% do asi 20% hmotn/hmotn k vysrážení λ -2-globulinů,

oddělení kapaliny nad sedlinou po srážení polyethylenglykolem s tím, že tato kapalina obsahuje α -LPI,

úpravu pH této kapaliny nad sedlinou na asi 7,5,

přidání chloridu zinečnatého k této kapalině k vysrážení surového α -LPI,

oddělení surového α -LPI filtrací (Prostak) s novým rozpuštěním surového α -LPI ve vodném roztoku,

působením rozpouštědla a detergentu na znovu rozpuštěný α -LPI pro deaktivování jakéhokoli virového znečistění,

nanesení surového α -LPI po použití rozpouštědla a detergentu na aniontově-výměnné prostředí,

izolování frakce s obsahem λ -LPI z aniontově-výměnného prostředí,

smíchání frakce s obsahem λ -LPI s bentonitem k adsorbování apolipoproteinu, a

získání roztoku s obsahem vyčistěného λ -LPI.

16. Způsob podle nároku 15, vyznačující se tím, že dále obsahuje úpravu izolované frakce z předpředposledního stupně ultrafiltrací roztoku obsahujícího vyčistěný λ -LPI.

17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že dále obsahuje lyofilizování ultrafiltrovaného roztoku, obsahujícího vyčistěný λ -LPI.

18. Způsob podle nároku 15, vyznačující se tím, že vyčistěný α -LPI má specifickou aktivitu asi 10 jedn/spec. hustota OD_{280} .

19. Způsob podle nároku 15, vyznačující se tím, že vyčistěný α -LPI se získá ve výtěžku nejméně 1,0 jedn. na g pastovité frakce $IV_1 + IV_4$.

20. Způsob čistění α -LPI, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně

obstarání nečisté proteinové frakce s obsahem α -LPI, suspendování nečisté proteinové frakce ve vodném roztoku za teploty a hodnoty pH, solubilizující albumin, α -2-protein a β -proteiny bez solubilizování α -LPI,

oddělení nerozpustných proteinů, čítaje v to α -LPI, ze solubilizovaných proteinů,

resuspendování nerozpustných proteinů ve vodném roztoku a přidání polyethylenglykolu k roztoku, když se teplota a hodnota pH roztoku i koncentrace polyethylenglykolu volí tak, že se vysrážejí α -2-proteiny aniž se vysráží α -LPI,

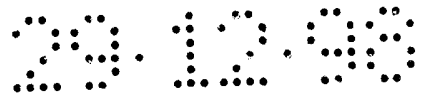
oddělí se kapalina nad sedimentem ze srážení polyethylenglykolem a přidá se chlorid zinečnatý, přičemž se teplota a hodnota pH roztoku a koncentrace chloridu zinečnatého zvolí tak, že se vysráží surový α -LPI,

izoluje se vysrážený surový α -LPI a rozpustí se ve vodném roztoku,

nanese se vodný roztok s obsahem surového α -LPI na aniontově-výměnné prostředí, a

izoluje se frakce, obsahující vyčistěný α -LPI z aniontově-výměnného prostředí.

21. Způsob zvyšování výtěžku v jednotkách proteinu z proteinového roztoku po virové desaktivaci působením rozpouštědla-detergentu, vyznačující se tím, že se přidá do proteinového roztoku sacharid v množství dostačujícím ke zvýšení výtěžku proteinu po virové desaktivaci rozpouštědlem-detergentem.



22. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že proteinem je α -LPI.

23. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že se sacharid přidává do roztoku proteinu v množství od asi 10% do asi 20% hmotn./hmotn.

24. Způsob podle nároku 21, vyznačující se tím, že se jako sacharid použije sacharosa.

25. Způsob odstraňování apolipoproteinu z roztoku proteinů, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně:

přidání bentonitu do roztoku proteinu,

ponechání bentonitu ve styku s roztokem proteinu po dobu dostačující k tomu, aby bentonit adsorboval apolipoproteiny, a odstraní se bentonit z roztoku proteinů.

26. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že dobou styku bentonitu s roztokem proteinů je nejméně jedna hodina.

27. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že množství přidaného bentonitu činí od asi 0,1 do asi 1,0% hmotn./hmotn.

28. Způsob podle nároku 25, vyznačující se tím, že množství kteréhokoli z apolipoproteinu A a apolipoproteinu B, zbylé po odstranění bentonitu z proteinového roztoku činí pod asi 0,01 mg/ml.

JEDNOTLIVÝ
ADVOKÁT

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI

120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika