

Даний винахід стосується способу одержання збагаченої альбуміном фракції з пониженим вмістом активатора прекалікреїну (РКА) та альбумінвмісної фракції з пониженим вмістом прекалікреїну активатора (РКА), яку одержують відповідно до способу даного винаходу.

Препарати, що містять альбумін, використовуються як розчини для інфузії пацієнтам, які потребують такого лікування. Для забезпечення найбільш фізіологічно прийнятної заміщення рідкого середовища організму пацієнтам вводять не тільки фізіологічні концентрації солей, але й альбумін як наповнювач. Альбумінові препарати можуть містити активатор прекалікреїну, наявність якого може призводити до небажаних побічних ефектів, що може бути пов'язане з дією активатора прекалікреїну на ренін-ангіотензинову систему.

Мета даного винаходу полягає у зниженні вмісту РКА у фракціях, одержаних з плазми, що містять альбумін. Інша мета даного винаходу полягає в одержанні альбумінвмісної фракції з пониженим вмістом РКА.

Ці вказані мети досягаються за допомогою способу одержання фракції, збагаченої альбуміном з пониженим вмістом активатора прекалікреїну (РКА), що включає наступні стадії:

- (a) відновлення пасти V (фракціонування за Кохом (Cohn)),
- (b) виконання стадії концентрування фракції, одержаної на стадії (a),
- (c) нагрівання фракції, одержаної на стадії (b) в діапазоні від 50°C до 70°C протягом часу, достатнього для її пастеризації, і
- (d) необов'язкове фасування одержаної фракції для використання.

Відповідно до одного із здійснень даного винаходу, після фасування виконують другу стадію пастеризації.

Стадію інкубації проводять при 50-70°C, щонайменше, протягом 5 годин, зокрема, протягом 10 годин.

Починаючи з відновлення пасти V, можна необов'язково додавати фільтрувальні присадки і проводити фільтрацію на фільтрі з розміром пор приблизно 0,2мкм. При необхідності можна регулювати значення рН. Значення рН слід встановлювати в інтервалі 7,2-7,6. Звичайно проводять ультрафільтрацію до вмісту білка 8% (мас/об.) з наступною діафільтрацією та ще однією стадією ультрафільтрації з метою концентрації білка. В результаті вказаних операцій концентрація білка складає, щонайменше, 20%. Після цього може бути здійснена ще одна стадія фільтрації, переважно з використанням мембрани з розміром пор приблизно 0,2мкм.

В систему можна додавати стабілізатори в кількості 0,08ммоль/г альбуміну, за які можна використовувати N-ацетил DL-триптофан і каприлат натрію, після чого рН знову встановлюють в інтервалі 6,7-7,3. Після досягнення сталої концентрації білка та натрію здійснюється пастеризація в об'ємі при температурі 58-65°C протягом, щонайменше, 9 годин. Після цього проводять стерилізувальну фільтрацію. Зразок витримують при 2-25 °C протягом менше 2 тижнів. Стерильну альбумінову масу піддають остаточній фільтрації і фасують. Після фасування можна проводити другу стадію пастеризації за умов, аналогічних описаним вище. Технологічна схема може бути доповнена ще однією стадією витримування в термостаті. Після візуального контролю препарат готовий до зберігання і застосування.

Спосіб даного винаходу також передбачає одержання альбумінвмісної фракції з пониженою концентрацією активатора прекалікреїну (РКА).

Вміст РКА в альбуміновій фракції даного винаходу складає менше 12МЕ/мл, переважно 10МЕ/мл згідно з аналізом відповідно до [Європейської фармакопеї, четверте видання, 2.6.15, стор.147-148].

Далі даний винахід додатково роз'яснюється за допомогою прикладів, що не обмежують галузь винаходу.

Приклади

Приклад 1:

Пасту V суспендували протягом більше 6 годин при температурі -2±2°C у 1,6-кратній масі води для ін'єкцій. В продукт додавали фільтрувальні присадки, і одержаний препарат перемішували протягом 30 хвилин. Об'ємний фільтр попередньо промивали водою для ін'єкцій і потім 10% (об/об) етанолом. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Після цього фільтр промивали 10% розчином етанолу у воді для ін'єкцій. За допомогою 3М розчину гідроксиду натрію встановлювали значення рН, що дорівнювало 7,4±0,2.

Концентрацію білка, що дорівнювала 8%, одержували в результаті ультрафільтрації через мембрани з межею відсікання за молекулярною масою 10кДальтон. Концентрат піддавали діафільтрації з використанням ≥3-кратної кількості 0,5М розчину хлористого натрію з подальшою діафільтрацією з використанням ≤3-кратної кількості води для ін'єкцій. Після діафільтрації розчин альбуміну концентрували до вмісту білка близько 22% в результаті ультрафільтрації при ≤+15°C. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Об'ємний фільтр піддавали попередній промивці водою для ін'єкцій.

Після цього 0,0106г каприлової кислоти/г білка і 0,0182г N-ацетил-DL-триптофану/г білка розчиняли у 10% (мас/об.) розчині гідроксиду натрію і при повільному перемішуванні одержаний розчин додавали в розчин альбуміну. Значення рН розчину встановлювали дорівнюючим 7,0±0,3. Концентрацію білка в альбуміновому розчині встановлювали дорівнюючою 200±10г/л в результаті додання води для ін'єкцій. Концентрацію натрію встановлювали доданням хлористого натрію на значенні 150±7,5ммоль/л. Одержаний розчин перемішували при 58-65°C протягом, щонайменше, 9 годин. Альбуміновий розчин піддавали стерилізувальній фільтрації через мембранний фільтр, призначений для стерилізації з номінальним розміром пор 0,2мкм. Тест на цілісність стерилізувального фільтра проводили до та після використання за методикою, рекомендованою в документації виробника. Стерильно відфільтрований альбумін зберігають при температурі в інтервалі 2-25°C протягом не більше 2 тижнів. В асептичних умовах, з використанням фінішного 0,2мкм стерилізувального фільтра, стерильним розчином заповнювали депірогенні флакони для інфузії, які закривали стерилізованими каучуковими пробками і герметизували алюмінієвими ковпачками. Стерилізувальний фільтр тестували на цілісність до та після використання флаконів, дотримуючись методики, рекомендованої виробником. Обсяг заповнення флаконів контролювали у процесі заповнення.

Пастеризацію проводили відповідно до Європейської фармакопеї. Контейнери з готовим препаратом витримували у термостаті відповідно до вимог Європейської фармакопеї. Після термостатування всі флакони піддавали візуальному дослідженню на наявність домішок, каламутність, наявність дефектів флаконів та ковпачків. Препарати з дефектами відбраковували. Всі флакони зберігали при 2-25°C.

Приклад 2:

Пасту V суспендували протягом більше 6 годин при температурі $-2\pm 2^{\circ}\text{C}$ у 1,6-кратній масі води для ін'єкцій. В продукт додавали фільтрувальні засоби, і одержаний препарат перемішували протягом 30 хвилин. Об'ємний фільтр попередньо промивали водою для ін'єкцій і потім 10% розчином етанолу. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Після цього фільтр промивали 10% розчином етанолу у воді для ін'єкцій. Значення рН встановлювали дорівнюючим $7,4\pm 0,2$ за допомогою 3М розчину гідроксиду натрію. Концентрацію білка, що дорівнювала 8%, одержували в результаті ультрафільтрації через мембрани з межею відсікання 10кДальтон. Концентрат піддавали діафільтрації з використанням ≥ 3 -кратної кількості 0,5М розчину хлористого натрію і подальшої діафільтрації з використанням ≤ 3 -кратної кількості води для ін'єкцій. Після діафільтрації розчин альбуміну концентрували до вмісту білка близько 26% в результаті ультрафільтрації при температурі $< +15^{\circ}\text{C}$. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Об'ємний фільтр піддавали попередній промивці водою для ін'єкцій. Після цього 0,0106г каприлової кислоти/г білка і 0,0182г N-ацетил-DL-триптофану/г білка розчиняли в 10% розчині гідроксиду натрію і при повільному перемішуванні одержаний розчин додавали в розчин альбуміну. Значення рН розчину встановлювали дорівнюючим $7,0\pm 0,3$. Концентрацію білка в альбуміновому розчині встановлювали дорівнюючою $250\pm 12\text{г/л}$ доданням води для ін'єкцій. Концентрацію натрію встановлювали дорівнюючою $150\pm 7,5\text{ммоль/л}$ доданням хлористого натрію. Одержаний розчин перемішували при $58-65^{\circ}\text{C}$ протягом, щонайменше, 9 годин. Альбуміновий розчин піддавали стерилізувальній фільтрації через мембранний фільтр призначений для стерилізації з номінальним розміром пор 0,2мкм. Тест на цілісність стерилізувального фільтра проводили до та після використання, за методикою, рекомендованою в документації виробника. Стерильно відфільтрований альбумін зберігають при температурі в інтервалі 2-25°C протягом не більше 2 тижнів. В асептичних умовах, з використанням фінішного 0,2мкм стерилізувального фільтра, стерильним розчином заповнювали депірогенні флакони для інфузії, які закривали стерилізованими каучуковими пробками і герметизували алюмінієвими ковпачками. Стерилізувальний фільтр тестували на цілісність до та після використання, додержуючись методики, рекомендованої виробником. Обсяг заповнення флаконів контролювали у процесі заповнення. Пастеризацію проводили відповідно до Європейської фармакопеї. Контейнери з готовим препаратом витримували у термостаті відповідно до вимог Європейської фармакопеї. Після термостатування всі флакони піддавали візуальному дослідженню на наявність домішок, каламутність, наявність дефектів флаконів та ковпачків. Препарати з дефектами відбраковували. Всі ампули зберігали при 2-25°C.

Приклад 3:

Пасту V суспендували протягом більше 6 годин при температурі $-2\pm 2^{\circ}\text{C}$ у 1,6-кратній масі води для ін'єкцій. В продукт додавали фільтрувальні присадки і одержаний препарат перемішували протягом 30 хвилин. Об'ємний фільтр попередньо промивали водою для ін'єкцій і потім 10% розчином етанолу. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Після цього фільтр промивали 10% розчином етанолу у воді для ін'єкцій. За допомогою 3М розчину гідроксиду натрію встановлювали значення рН $7,4\pm 0,2$. Концентрацію білка, що дорівнювала 8%, одержували в результаті ультрафільтрації через мембрани з межею відсікання 10кДальтон. Концентрат піддавали діафільтрації з використанням > 3 -кратної кількості 0,5М розчину хлористого натрію і подальшої діафільтрації з використанням < 3 -кратної кількості води для ін'єкцій. Після діафільтрації розчин альбуміну концентрували до вмісту білка близько 22% в результаті ультрафільтрації при температурі нижче $+15^{\circ}\text{C}$. Одержаний розчин просвітляли пропусканням через об'ємний фільтр і через 0,2мкм мембранний фільтр. Об'ємний фільтр піддавали попередній промивці водою для ін'єкцій. Після цього 0,0106г каприлової кислоти/г білка і 0,0182г N-ацетил-DL-триптофану/г білка розчиняли в 10% розчині гідроксиду натрію і при повільному перемішуванні одержаний розчин додавали в розчин альбуміну. Значення рН розчину встановлювали дорівнюючим $7,0\pm 0,3$. Концентрацію білка в альбуміновому розчині встановлювали дорівнюючою $200\pm 10\text{г/л}$ доданням води для ін'єкцій. Концентрацію натрію встановлювали дорівнюючою $150\pm 7,5\text{ммоль/л}$ доданням хлористого натрію. Одержаний розчин перемішували при $58-65^{\circ}\text{C}$ протягом, щонайменше, 10 годин. Альбуміновий розчин піддавали стерилізувальній фільтрації через мембранний фільтр, призначений для стерилізації, з номінальним розміром пор 0,2мкм. Тест на цілісність стерилізувального фільтра проводили до та після використання за методикою, рекомендованою в документації виробника. Стерильно відфільтрований альбумін зберігають при температурі в інтервалі 2-25°C протягом не більше 2 тижнів. Концентрацію білка в альбуміновому розчині, що дорівнювала $50\pm 2,5\text{г/л}$, встановлювали доданням води для ін'єкцій. Значення рН системи встановлювали дорівнюючим $7,0\pm 0,3$. Вміст натрію встановлювали дорівнюючим $150\pm 7,5\text{ммоль/л}$ в результаті додання хлористого натрію. Альбуміновий розчин зберігали при температурі 2-25°C протягом не більше 24 годин до заповнення флаконів. В асептичних умовах, з використанням фінішного 0,2мкм стерилізувального фільтра, стерильним розчином заповнювали депірогенні флакони для інфузії, які закривали стерилізованими каучуковими пробками і герметизували алюмінієвими ковпачками. Стерилізувальний фільтр тестували на цілісність до та після використання, додержуючись методики, рекомендованої виробником. Обсяг заповнення флаконів контролювали у процесі заповнення. Пастеризацію проводили відповідно до Європейської фармакопеї. Контейнери з готовим препаратом витримували у термостаті відповідно до вимог Європейської фармакопеї. Після термостатування всі флакони піддавали візуальному дослідженню на наявність домішок, каламутність, наявність дефектів ампул та ковпачків. Препарати з дефектами відбраковували. Всі флакони зберігали при 2-25°C.

Активатор прекалікреїну

Активатор прекалікреїну (РКА), що ініціює перетворення прекалікреїну в калікреїн, може бути

проаналізований на його здатність до розщеплювання хромофорної групи синтетичного пептидного субстрату, в результаті чого можна спектрофотометрично виміряти швидкість розщеплення і розрахувати концентрацію РКА шляхом порівняння з еталонною кривою, відкаліброваною у Міжнародних одиницях активності.

Міжнародна одиниця являє собою активність певної кількості Міжнародного Стандарту, що складається з ліофілізованого активатора прекалікреїну. Еквівалент Міжнародного Стандарту у Міжнародних одиницях активності встановлений Всесвітньою Організацією Охорони здоров'я.

Приготування прекалікреїнового субстрату

Щоб уникнути коагуляційної активації, кров або плазма, що використовується для одержання прекалікреїну, повинна контактувати тільки з пластиком або скляними поверхнями, обробленими силіконом. 9 об'ємів людської крові домішують до 1 об'єму розчину антикоагулянта (ACD, CPD або 38г/л цитрату натрію), в який доданий бромід гексадиметрину в кількості 1мг/мл. Одержану суміш центрифугують протягом 5 хвилин при 3600×g. Плазму відокремлюють і центрифугують протягом 20 хвилин при 6000×g з метою осадження тромбоцитів. Плазму, збіднену тромбоцитами, відокремлюють і протягом 20 годин піддають діалізу з використанням 10 об'ємів буфера А. Діалізовану плазму пропускають через хроматографічну колонку, що містить систему агароза-DEAE для іонообмінної хроматографії, зрівноважену буфером А, і має обсяг, дорівнюючий подвійному обсягу плазми. Колонку елюють буфером А зі швидкістю 20мл/см²/год. Збирають фракції елюату і реєструють оптичне поглинання при довжині хвилі 280нм (2.2.25). Об'єднують фракції, що містять перший білковий пік, причому обсяг пулу складає 1,2 обсягу плазми, збідненої тромбоцитами.

Об'єднаний субстрат тестують на відсутність калікреїнової активності, змішуючи 1 частину з 20 частинами попередньо нагрітого розчину хромогенного субстрату, що використовується в аналізі, і одержану суміш термостатують при 37°C протягом 2 хвилин. Субстрат придатний для подальшого використання, якщо збільшення оптичного поглинання не перевищує 0,001 за хвилину. До об'єднаного субстрату додають розчин хлористого натрію з концентрацією 7г/л і одержану систему фільтрують з використанням мембранного фільтра (пористість 0,45мкм). Фільтрат заморожують порціями і зберігають при -25°C; субстрат можна сушити виморожуванням перед зберіганням.

Всі операції, починаючи з хроматографії і до заморожування порцій, слід завершувати за один робочий день.

Аналіз

Аналіз більш прийнятно проводити з використанням автоматизованого аналізатора ферментів при 37°C, використовуючи такі обсяги, концентрацію субстратів і часи термостатування, які забезпечують лінійність швидкості реакції, щонайменше, до концентрування 35МЕ/мл. Стандарти, зразки і прекалікреїновий субстрат при необхідності можна розбавляти буфером В.

Розбавлені стандарти або зразки культивують протягом 10 хвилин за присутності прекалікреїнового субстрату, при цьому обсяг нерозбавленого зразка не повинен перевищувати 1/10 загального обсягу інкубаційної суміші з метою уникнення помилок, викликаних зміною іонної сили і значенням рН інкубаційної суміші. Суміш або її частину інкубують за присутності, щонайменше, дорівнюючого обсягу розчину придатного синтетичного хромогенного субстрату у буфері В, що має відому специфічність до калікреїну (наприклад, N-бензоїл-L-пролін-L-фенілаланіл-L-аргінін-4-нітроанлід ацетат R або D-пролін-L-фенілаланіл-L-аргінін-4-нітроанлід-дигідрохлорид R). В часовому інтервалі від 2 до 10 хвилин реєструють швидкість зміни оптичного поглинання за хвилину при довжині хвилі, специфічної для субстрату, що використовується. Для кожної суміші зразків або стандартів готують контрольний зразок, використовуючи буфер В замість прекалікреїнового субстрату.

Корегують величину ΔA/хв, віднімаючи значення, одержане для контрольного зразка. Будують калібрувальну криву з використанням одержаних значень для еталонного препарату і відповідних концентрацій; одержану криву використовують для визначення РКА активності досліджуваного препарату.

Буфер А

Трис (гідроксиметил)амінометан 6,055г

Хлористий натрій 1,17г

Бромід гексадиметрину 50мг

Азид натрію 0,100г

Вказані інгредієнти розчиняють у воді, за допомогою 2М хлористоводневої кислоти встановлюють значення рН 8,0 і систему розбавляють водою до обсягу 1000мл.

Буфер В

Трис (гідроксиметил)амінометан 6,055г

Хлористий натрій 8,77г

Вказані інгредієнти розчиняють у воді, за допомогою 2М хлористоводневої кислоти встановлюють значення рН 8,0 і систему розбавляють водою до обсягу 1000мл.

Технологічна стадія	Величина РКА (згідно з винаходом)	Величина РКА (порівняльний приклад)
Після IPBP* і стерилізувальної фільтрації	3МЕ/мл	п.а.**
Після пастеризації в кінцевому резервуарі	<2МЕ/мл	5МЕ/мл
Після інкубації	4МЕ/мл	18МЕ/мл

Технологічна стадія	Величина РКА (згідно з винаходом)	Величина РКА (порівняльний приклад)
Після IPBP* і стерилізувальної фільтрації	<2МЕ/мл	п.а.**
Після пастеризації в кінцевому резервуарі	<2МЕ/мл	2МЕ/мл
Після інкубації	3МЕ/мл	12МЕ/мл

Технологічна стадія	Величина РКА (згідно з виходом)	Величина РКА (порівняльний приклад)
Після ІРВР* і стерилізувальної фільтрації	<2МЕ/мл	п.а.**
Після пастеризації в кінцевому резервуарі	<2МЕ/мл	5МЕ/мл
Після інкубації	2МЕ/мл	20МЕ/мл

*ІРВР у процесі пастеризації в масі

** п.а. не застосовувалося.