

Изобретение касается способа получения фракции, содержащей вирусоинактивированный фактор УТЛ, посредством хроматографических методов, а также фракции, содержащей фактор YIII, получаемой по способу согласно изобретению.

Фактор YIII является жизненно важным веществом, который играет значительную роль в свертывании крови. Так, нарушения в свертывании крови поддаются терапевтическому действию путем приема фактора YIII. Поэтому существует большая потребность в препаратах фактора YIII, годных к употреблению. Было достаточно попыток, чтобы выделить фактор YIII в существенно обогащенной форме из естественных источников. Так, уже известны хроматографические методы для промывки фактора YIII из криопреципитата. Последний является фракцией, которая может быть получена путем обработки плазмы холодом. Публикация EP 367 840 B1 касается хроматографического метода для выделения фактора YIII из плазмы крови без предшествующей рипреципитации. При этом фракция, содержащая фактор YIII, выделяется посредством хроматографического разделения на гидрофильном хроматографическом материале, который модифицирован ионообменными группами. Публикация EP 0 238 701 касается способа получения высокоочищенного инфекционного антигемофильного фактора, причем криопреципитатом являются предварительно обработанные фракции, которые посредством осаждения этанола освобождаются от фибриногена, глобулина, альбуминов и других создающих помехи составных частей. В европейской патентной заявке 88 108 458,6 описывается осуществление после вирусоинактивации криопреципитатной фракции хроматографического разделения с помощью ионообменных веществ. В публикации EP 0 173 242 A описан способ хроматографического получения препаратов фактора YIII на анионообменных материалах, которые базируются исключительно на углеводах. При этом углеводная матрица модифицирована диэтиламиноэтиловыми (DEAE) группами. В качестве подходящих описываются прежде всего DEAE-сефарозе, а также DEAE-целлюлоза. В GB-A-1,178,958 описывается промывка фактора YIII с помощью ECTEOLA-целлюлозных колонок. Модифицированная целлюлоза содержит базовые заместители, которые вводились посредством реакции эпихлоргидрина и триэтаноламина. Названный уровень техники использовали разделение хроматографическим способом в форме Batch-метода или хроматографию на колонке. Этими способами достигают действительно хороших результатов, однако по-прежнему желательным остается повышение выхода биологически ценного фактора YIII как по экономическим, так и этическим причинам.

В основу настоящего изобретения поставлена задача разработки способа, который позволит на основе существующего уровня техники усовершенствовать процесс получения фактора YIII в отношении выхода и биологической активности.

Поставленная образом задача решается посредством способа, при котором на основе криопреципитата или плазмы крови, в данном случае на основе обработки гидроокисью алюминия, после растворения криопреципитата осуществляется операция разделения путем мембранной хроматографии.

Способ согласно изобретению может также осуществляться с использованием торгового криопреципитата или плазмы крови. Предпочтительно для предварительного концентрирования фактора YIII размороженный криопреципитат для последующей предварительной промывки пробы обрабатывается гидроокисью алюминия.

Предпочтительно перед собственно хроматографической промывкой на материалах, которые размещены в или на мембранах, проводят вирусоинактивацию. При этом вирусоинактивация осуществляется по методу, который описывается в EP 131 740 A1, путем обработки биосовместимыми органическими растворителями (детергентами), Triton X - 100/TNBP, предпочтительно Tween /TNBP (три-г-бутилфосфат). Хороших результатов достигают также при использовании хлората натрия/TNBP. Предпочтительно используемые количества - до 15 вес. % детергента. Вирусоинактивацию можно также осуществить после разделения путем мембранной хроматографии.

Операция разделения хроматографическим способом для промывки фактора YIII в пробе может осуществляться на основных материалах, модифицированных ионообменными группами, прежде всего, анионитами, или на материалах, модифицированных иммуносродственными лигандами. При этом решающим является то, что названные материалы размещены в мембранах. Предпочтительно мембраны состоят из основного материала; такого как модифицированная целлюлоза или искусственное волокно. Прежде всего подходят мембраны, а также компактные диски из пористых полиглицидилметакрилатов и/или из других пористых гидрофильных полимеров с подобной структурой, как и из гидрофиллизованного полистирола.

В первом случае пригодная для разделения мембрана состоит или из тонких уложенных стопой друг на друга пленок из целлюлозы или искусственных волокон или во втором случае из компактных дисков из силикагеля или полимеров-носителей. Основные материалы мембран или дисков снабжены соответствующими анионообменными группами или иммуносродственными лигандами. В качестве ионообменных групп рассматриваются, прежде всего, анионообменные группы, такие как четверичные амины или диэтиламиноэтиловые группы. В качестве катионитов рассматриваются, как правило, слабо- и сильнокислые катиониты, такие как материалы, которые модифицированы группами сульфокислота или фосфорной кислоты.

Ионообменные группы могут быть не связаны или связаны посредством так называемого промежуточного слоя или наполнителя с волокнами основного материала. Материалы, снабженные наполнителем, называются также как материалы "щупальца". В DE 42 04 694 перечислены соответствующие наполнители и лиганды. В качестве наполнителя может также служить, например, глюкозаминный радикал. Также с мембранами из пористого полиглицидилметакрилата или других упомянутых материалов могут быть связаны анионообменные группы, как DEAE или четверичные амины. При этом связь анионообменных групп осуществляется или непосредственно с материалом, образующим мембрану, или равным образом через наполнитель, например, глюкозаминный радикал.

В другом варианте способа согласно изобретению применяется мембранная хроматография по иммунному сродству с иммобилизованными веществами, которые имеют высокое сродство к фактору YIII. Прежде всего для этого рассматриваются моноклональные и/или поликлональные антитела или фрагменты антител, связывающие фактор YIII, (мембранная хроматография по иммунному сродству). Антитела имеют предпочтительно органическое или минеральное происхождение.

Вещества со сродством к фактору YIII иммобилизуются на носителях посредством химически активных групп. Предпочтительно активная группа связывается не непосредственно с материалом-носителем, а с концом наполнителя. Иммобилизация вещества для фактора YIII осуществляется путем связывания с активными группами, как тозил, трезил, гидрацид и другие. Соответствующие способы известны из T.M. Phillips "Affinity chromatography" в публикации "Chromatography" (E. Heftmann, ed.), 5th ed. Elsevier, Amsterdam 1992.

Антитела могут также предварительно адсорбироваться на мембранах лигандами протеина A или протеина G.

Путем последующего ковалентного сшивания можно воспрепятствовать элюированию антител (обескровление колонок). Для сшивания антител на мембранах протеина А или протеина G может быть применен способ, подобный тому, как при пустых носителях. Преимущество иммобилизации на протеине А или протеине G состоит в том, что антитела иммобилизуются исключительно на постоянном сегменте молекулы (F). В этом случае антигенно-связывающая часть (F) остается свободной и не встречает препятствия в своем взаимодействии с фактором YIII.

В другом предпочтительном варианте осуществления для отделения фактора YIII используются материалы, которые могут обеспечить гидрофобное взаимодействие. В качестве гидрофобных материалов используются нециклические и/или циклические алкиловые цепи, например, алкиловые цепи C1 до C18, а также ароматические вещества. В качестве гидрофобных подготавливающих взаимодействие материалов рассматриваются также предпочтительно материалы со ступенчатой гидрофобностью. Гидрофобность можно сделать ступенчатой путем введения полярных, как полярно-протонных или полярно-а- протонных групп, как гидроксо-, amino-, циано-группы. Предпочтительно это согласовывают, принимая во внимание соответствующие условия разделения.

Вirusинактивацию можно также осуществить путем тепловой обработки. При этом предпочтительно после первой мембранной хроматографии элюированная проба, содержащая фактор YIII, подвергается операции пастеризации. Соответствующий способ предлагается в Р 43 18 435.9. При этом фракции, которые обогащены фактором YIII, в присутствии стабилизаторов приводятся в состояние контакта с ди- или триалкилфосфатами и в данном случае со смачивающими агентами и одновременно или последовательно подвергаются обработке при высокой температуре в диапазоне от 55 до 67°C° продолжительностью от 5 до 30 часов. Может быть выгодным применить комбинацию обоих способов virusинактивации - обработкой детергентом и теплом.

Для удаления химикатов, используемых при операции пастеризации, можно также присоединить вторую мембранную хроматографию. Предпочтительно отделение добавленных стабилизаторов осуществляется с помощью соединений DEAE или четверичных соединений аммония, которые размещены над наполнителем на поверхности хроматографического материала-носителя, от модифицированной мембраны. Равным образом соответствующие лиганды можно разместить без наполнителя на поверхности материала-носителя. Стабилизаторы не замедляются этим анионитным материалом при выбранных условиях, в то время как фактор YIII адсорбируется на хроматографическом материале.

После этого фактор YIII элюируется посредством системы ВОДНЫХ растворителей, солевые концентрации которых ступенчато повышаются.

Фракция, содержащая полученный таким путем фактор YIII, разливается в концентрированном виде посредством традиционных способов и в данном случае лиофилизируется.

Предпочтительно фактор YIII в первой ступени разделения путем мембранной хроматографии наносится из раствора невысокой ионной силы. Предпочтительно водная система имеет ионную силу, которая соответствует от 0 до 150mM раствора хлорида натрия. При таких величинах ионной силы фактор YIII еще адсорбируется на хроматографическом материале, в то время как более слабо связывающие примеси посредством промывания водными системами с такими же величинами ионной силы могут вымываться.

Промывку адсорбированного материала можно выполнить по другому варианту осуществления способа согласно изобретению посредством водной системы с ионной силой, которая соответствует от 200 до 400mM раствора хлорида натрия. Десорпция фактора YIII и элюирование этой фракции осуществляется в этом случае посредством водной системы с ионной силой, которая соответствует от 500 до 1500mM раствора хлорида натрия. При этом водородный показатель pH выдерживается в диапазоне от 4 до 9. Если проводится катионная хроматография, то она осуществляется предпочтительно при водородном показателе менее 6, тогда как анионитную хроматографию лучше проводить при более высоком водородном показателе, превышающем значение 6.

Если промывка фактора YIII осуществляется посредством мембранной хроматографии по иммунному средству, то в отличие от вышеназванного метода, в котором используются анионитные материалы, элюирование проводится хаотропными реактивами или высококонцентрированными солевыми растворами. Элюирование осуществляется предпочтительно при таких концентрациях хаотропных реагентов или солей, которые достаточны, чтобы ослабить связь между веществом с высоким сродством к фактору YIII и самим фактором YIII. При этом концентрация вышеназванных веществ в соответствующих системах элюирования зависит от силы сродства фактора YIII и соответствующего связующего компонента. Предпочтительно используются антитела с не слишком высоким сродством в качестве иммуносродственных лигандов. Вследствие этого можно осуществить элюирование водными растворами невысокой денатурирующей силы. Предпочтительно используются водные растворы с концентрацией от 1 до 6M мочевины, прежде всего от 2 до 4M мочевины, или соответственно высококонцентрированные солевые растворы для элюирования фактора YIII из иммуносродственной мембраны.

При хроматографии гидрофобного взаимодействия проба наносится в водном растворе очень высокой ионной силы, как например, высококонцентрированный сульфат аммония (с концентрацией до 4M) или хлорид натрия (с концентрацией до 5M). Элюирование осуществляется прежде всего ступенчато или непрерывно посредством солевых растворов низкой ионной силы. В качестве растворов с низкой ионной силой для элюирования проб при мембранной хроматографии гидрофобного взаимодействия можно также применять водный раствор с органическими растворителями, прежде всего разбавленный спиртовой раствор.

Способ согласно изобретению обеспечивает чрезвычайно быструю и несложную промывку фактора YIII и наряду с высокой чистотой отличается высоким выходом продукта. Кроме того, удельная активность полученного таким путем фактора YIII весьма высока, что объяснимо невысоким денатурированием активного фактора при использовании способа согласно изобретению. Таким образом, предметом изобретения является также фракция фактора YIII, которая может быть получена посредством способа согласно изобретению.