



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **107509**(13) **U**

(51) МПК

C07K 1/22 (2006.01)**C07K 14/755** (2006.01)**B01D 15/08** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**(21)** Номер заявки: **u 2015 12302****(22)** Дата подання заявки: **11.12.2015****(24)** Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.06.2016****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.06.2016, Бюл.№ 11****(72)** Винахідник(и):**Шурко Наталія Олегівна (UA),
Даниш Тарас Васильович (UA),
Новак Василь Леонідович (UA)****(73)** Власник(и):**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСФУЗІЙНОЇ
МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ",
вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, 79044
(UA),
Шурко Наталія Олегівна,
вул. Коцюбинського, 12, м. Глиняни,
Львівська обл., 80720 (UA),
Даниш Тарас Васильович,
вул. Венеціанова, 15/25, м. Львів, 79000
(UA),
Новак Василь Леонідович,
вул. Антоновича, 24, м. Львів, 79013 (UA)****(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФАКТОРА VIII ЗГОРТАННЯ КРОВІ****(57)** Реферат:

Спосіб виділення фактора VIII згортання крові методом негативної афінної сорбції на макропористих кремнеземних сорбентах з лігандами - активними триазиновими барвниками. Як додаткові процедури очищення перед етапом афінної хроматографії пропонується проведення переосадження на гелі гідроксиду алюмінію, поліетиленгліколем (ПЕГ-4000), антивірусної СД-обробки та іонообмінної хроматографії на DEAE-Sephарose.

UA 107509 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології - одержання очищених білкових препаратів, а саме способу очищення фактора згортання крові VIII (FVIII) - і може бути використаний в медико-біологічній промисловості, на станціях переливання крові, а також в науково-дослідних лабораторіях.

5 Плазмові препарати FVIII отримують з плазми крові людини. Кріопреципітат був першим препаратом FVIII, отриманим з цієї сировини. Плазмові продукти, такі як свіжозаморожена плазма та кріопреципітат з низькою питомою активністю FVIII, що використовувалися на ранніх етапах лікування хворих гемофілією, втрачають актуальність на даний час [10].

10 Кріопреципітат заморожений - білковий компонент плазми крові людини, що містить не менше 70 МО FVIII (антигемофільного глобуліну - АГГ) в одній дозі - і не менше 140 МЕ в двох дозах, являє собою осад кріоглобулінів білого кольору з 30-40 мл або 65-75 мл залишкової плазми в замороженому стані, і отриманий з однієї або двох доз свіжозамороженої плазми об'ємом, відповідно, не менше 200,0 або 400,0 мл [3]. У замороженому стані - тверда маса жовтуватого кольору, а при розморожуванні і розчиненні на водяній бані при температурі 35-
15 37 °С - прозора жовтуватого кольору рідина, не містить механічних домішок. Цей компонент донорської крові заготовляють на гемокоагулянтах з карантинізованої плазми, стерильний, тестований на антитіла до HIV-1/2, вірусу гепатиту С, збудника сифілісу, поверхневого антигену вірусу гепатиту В [6].

20 Фармокологічні властивості кріопреципітату: володіє антигемораргічним ефектом при підвищених кровотечах, пов'язаних зі зниженням активності та вмісту антигемофільного глобуліну (FVIIIc), фактора фон Віллебранда (FVIIIvW), фібринстабілізуючого фактора (FXIII) і фібриногену (FI).

25 Система гемостазу у фізіологічних умовах забезпечує цілісність судинної стінки та рідкий стан крові в судинному руслі. Це складний ферментативний процес, в якому беруть участь ряд білків-протеаз, активаторів та інгібіторів процесу [1].

Гемофілія А - важкий розлад системи згортання крові, викликаний дефіцитом або повною відсутністю FVIII, що зустрічається приблизно в 1 з 5000 чоловіків і на його поширення не впливає етнічна приналежність.

30 Раніше, на початкових етапах лікування використовували переливання пацієнту цільної крові [12]. В сучасних умовах, з метою корекції дефіциту фактора або для запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А, проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів FVIII [8].

35 Препарат FVIII використовують як діагностичний для лабораторних досліджень, так і для терапевтичних цілей в медичній практиці при лікуванні хворих на гемофілію А та хворобу фон-Віллебранда.

Широке застосування препаратів FVIII у лікуванні пацієнтів, хворих на гемофілію А та хворобу фон Віллебранда, стало одним із значних успіхів в історії лікування захворювань. Таке лікування сьогодні дозволяє пацієнтам здолати негативні наслідки і запобігати кровотечам, що призводить до поліпшення якості життя [10].

40 Способи, які використовують для отримання препаратів FVIII, є поєднанням кількох різних етапів очищення, а саме кріоосадження, осадження домішкових білків методами висолювання, а також використання різного роду хроматографій (іонообмінної, гель-проникної, афінної та ін.) [11].

45 Хроматографічні методи передбачають високу специфічність і селективність, дозволяють одержувати біологічні сполуки з адекватною чистотою і в умовах збереження біологічних особливостей. Хроматографія також стала визнаним засобом для промислового отримання терапевтичних біопрепаратів. При отриманні низки препаратів, включаючи рекомбінантні білки і глікопротеїни, обов'язково використовують одну або кілька хроматографічних стадій очищення [9].

50 Найближчим по сукупності ознак, подібним до даного винаходу є спосіб [4], який полягає в підвищенні ступеня очищення препарату кріопреципітату шляхом додаткового застосування негативною афінної сорбції на кремнеземних сорбентах з лігандами - активними барвниками триазинової групи та спосіб отримання концентрату FVIII з плазми крові людини [5].

55 Спосіб корисної моделі [5] полягає в кріоосадженні, розчиненні кріопреципітату в водному розчині гепарину та солюбілізації, сорбції факторів протромбінового комплексу гідроксидом алюмінію, видаленні домішкових білків з допомогою PEG-4000, вірусній інактивації за допомогою сольвент-детергенту, фільтрації та аніонообмінній хроматографії на EDM-TMAE Fractogel, елюції буфером, що містить NaCl, стабілізації альбуміном та ліофілізації отриманого зразка.

60 У патенті України на винахід [4] передбачено декілька стадій виробництва:

1) одержання кріопреципітату із плазми шляхом її заморожування-розморожування, відділення кріопреципітату центрифугуванням; розчинення осаду кріопреципітату у буферному розчині;

2) афінна хроматографія розчину кріопреципітату на кремнеземних макропористих сорбентах з різними лігандами - барвниками триазинового ряду (Силохром-Procion blue HB, Силохром-Procion blue MXR, Силохром-Активний яскраво-голубий K та Силохром-Активний червоний 4ЖТ).

Задачею корисної моделі є підвищення ступеня очищення та безпеки препарату кріопреципітату замороженого шляхом поєднання проведення попереднього осадження домішкових білків, сольвент-детергентної (СД) антивірусної обробки, іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та етапу негативної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з барвниками-лігандами.

Поставлена задача вирішується поетапним осадженням домішкових білків гідроксидом алюмінію, поліетиленгліколем ПЕГ-4000, СД-антивірусною обробкою та проведенням двох послідовних хроматографічних процесів: іонообмінної та негативної афінної.

Відмінність запропонованого способу від прототипу [4] полягає в удосконаленні технології одержання препарату за рахунок етапів очищення кріопреципітату (сольове та ПЕГ-фракціонування), СД-обробки та проведення іонообмінної хроматографії.

Синтез кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками здійснювали згідно роботи [7].

Кількісне визначення FVIII проводили за одностадійною уніфікованою методикою [2]. В представлених прикладах кількість білка наведена в мг, питома активність антигемофільного фактора виражена в міжнародних одиницях МО/мг білка.

Приклад 1. Кріопреципітат розморожували на водяній бані при температурі $+(35-37)^{\circ}\text{C}$, центрифугували 30 хв. при 2700 g на центрифугі фірми Eppendorf 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Осадження домішкових білків у кріосупернатанті проводили 3 %-ним гідроксидом алюмінію при кімнатній температурі, перемішуючи на магнітній мішалці протягом 15 хв. Додаткове осадження білків та ліпопротеїнів здійснювали за допомогою розчину PEG-4000 до кінцевої концентрації поліетиленгліколю 3,5 % за аналогічних умов. Центрифугували 20 хв. при 2700 g на центрифугі фірми EPPENDORF 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант піддавали СД обробці (Твін 80 1 %/три-(n-бутил)фосфат 0,1 %) при 20°C протягом 6 год. Забуферювали до pH 7,0. Кінцева концентрація складових буферу: 0,05M тріс-HCl; 0,001 M CaCl_2 ; 0,1M NaCl та 0,01 M Na_3 -цитрату. Наступним етапом проводили іонообмінну хроматографію на DEAE-Sepharose, забуферену цим же буфером. Елюцію FVIII здійснювали вихідним буфером з підвищеною іонною силою - 0,3M NaCl. Далі проводили наступний етап афінної хроматографії на сорбенті Силохром-Procion blue HB, врівноваженого 0,05 M тріс-HCl буфером, pH 7,4. Оскільки FVIII не зв'язується цим сорбентом, в проскоці відмітили зростання питомої активності в наслідок зв'язування з хроматографічною матрицею домішкових білків. В результаті чого питома активність FVIII зросла в 74 рази (від 0,087 МО/мг білка до 6,471 МО/мг білка відповідно); у порівнянні з прототипом в 47 разів (від 0,138 МО/мг білка до 6,471 МО/мг білка).

Приклад 2

Кріопреципітат розморожували на водяній бані при температурі $+(35-37)^{\circ}\text{C}$, центрифугували 30 хв. при 2700 g на центрифугі фірми Eppendorf 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Осадження домішкових білків у кріосупернатанті проводили 3 %-ним гідроксидом алюмінію при кімнатній температурі, перемішуючи на магнітній мішалці протягом 15 хв. Додаткове осадження білків та ліпопротеїнів здійснювали за допомогою розчину PEG-4000 до кінцевої концентрації поліетиленгліколю 3,5 % за аналогічних умов. Центрифугували 20 хв. при 2700 g на центрифугі фірми EPPENDORF 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант піддавали СД обробці (Твін 80 1 %/три-(n-бутил)фосфат 0,1 %) при 20°C протягом 6 год. Забуферювали до pH 7,0. Кінцева концентрація складових буферу: 0,05M тріс-HCl; 0,001 M CaCl_2 ; 0,1M NaCl та 0,01 M Na_3 -цитрату. Наступним етапом проводили іонообмінну хроматографію на DEAE-Sepharose, забуферену цим же буфером. Елюцію FVIII здійснювали вихідним буфером з підвищеною іонною силою - 0,3M NaCl. Наступний етап афінної хроматографії проводили на сорбенті Силохром-Активний яскраво-голубий K, врівноваженого 0,05 M тріс-HCl буфером, pH 7,4. В проскоці відмітили зростання питомої активності в наслідок зв'язування з хроматографічною матрицею домішкових білків. В результаті чого питома активність зросла в 77 раз (від 0,087 МО/мг білка до 6,7568 МО/мг білка відповідно), у порівнянні з прототипом приблизно в 50 разів (від 0,137 МО/мг білка до 6,7568 МО/мг білка).

Приклад 3

Кріопреципнат розморожували на водяній бані при температурі $+(35-37)^{\circ}\text{C}$, центрифугували 30 хв. при 2700 g на центрифугі фірми Eppendorf 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Осадження домішкових білків у кріосупернатанті проводили 3 %-ним гідроксидом алюмінію при кімнатній температурі, перемішуючи на магнітній мішалці протягом 15 хв. Додаткове осадження білків та ліпопротеїнів здійснювали за допомогою розчину PEG-4000 до кінцевої концентрації поліетиленгліколю 3,5 % за аналогічних умов. Центрифугували 20 хв. при 2700 g на центрифугі фірми EPPENDORF 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант піддавали СД обробці (Твін 80 1 %/три-(*n*-бутил)фосфат 0,1 %) при 20°C протягом 6 год. Забуферювали до pH 7,0. Кінцева концентрація складових буферу: 0,05M тріс-HCl; 0,001 M CaCl_2 ; 0,1M NaCl та 0,01 M Na_3 -цитрату. Наступним етапом проводили іонообмінну хроматографію на DEAE-Sepharose, забуферену цим же буфером. Елюцію FVIII здійснювали вихідним буфером з підвищеною іонною силою - 0,3M NaCl. Далі проводили наступний етап афінної хроматографії на сорбенті Силохром-Активний червоний 4ЖТ, зрівноваженого 0,05 M тріс-HCl буфером, pH 7,4. Питома активність зросла в 75 раз (від 0,087 МО/мг білка до 6,5517 МО/мг білка відповідно), у порівнянні з прототипом в 52 рази (від 0,125 МО/мг білка до 6,5517 МО/мг білка).

Приклад 4

Кріопреципнат розморожували на водяній бані при температурі $+(35-37)^{\circ}\text{C}$, центрифугували 30 хв. при 2700 g на центрифугі фірми Eppendorf 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Осадження домішкових білків у кріосупернатанті проводили 3 %-ним гідроксидом алюмінію при кімнатній температурі, перемішуючи на магнітній мішалці протягом 15 хв. Додаткове осадження білків та ліпопротеїнів здійснювали за допомогою розчину PEG-4000 до кінцевої концентрації поліетиленгліколю 3,5 % за аналогічних умов. Центрифугували 20 хв. при 2700 g на центрифугі фірми EPPENDORF 5702R при $+8^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант піддавали СД обробці (Твін 80 1 %/три-(*n*-бутил)фосфат 0,1 %) при 20°C протягом 6 год. Забуферювали до pH 7,0. Кінцева концентрація складових буферу: 0,05M тріс-HCl; 0,001 M CaCl_2 ; 0,1M NaCl та 0,01 M Na_3 -цитрату. Наступним етапом проводили іонообмінну хроматографію на DEAE-Sepharose, забуферену цим же буфером. Елюцію FVIII здійснювали вихідним буфером з підвищеною іонною силою - 0,3M NaCl. Далі проводили наступний етап афінної хроматографії на сорбенті Силохром-Procion blue MXR, врівноваженого 0,05 M тріс-HCl буфером, pH 7,4. Питома активність зросла в 86 раз (від 0,087 МО/мг білка до 7,5862 МО/мг білка відповідно) у порівнянні з прототипом в 64 рази (від 0,118 МО/мг білка до 7,5862 МО/мг білка).

З наведених даних видно, що ступінь очищення кріопреципнату, який характеризується підвищенням його питомої активності, вищий у пропонувананих способах як мінімум в 50 раз.

Таким чином, проведення додаткових етапів очищення кріопреципнату, СД-обробки та іонообмінної хроматографії перед процедурою негативної афінної сорбції покращує аналітичні показники та безпеку кінцевого продукту - діагностичного чи лікувального препарату FVIII.

Джерела інформації:

1. Виговська Я. І. Гемораргічні захворювання / Виговська Я. І. // Медична література. - Львів: ВАН "Біблос", 1998. - 240 с.
2. Козлов А. А. Метод определения активности фактора VIII в плазме крови человека и в антигемофильных препаратах / Козлов А. А. // Весник службы крови. - 2006. - № 3. - С. 35-40.
3. Методические рекомендации "Заготовка и использование криопреципитата замороженного", Киев - 2006.
4. Патент на винахід № 94299, Україна, МПК C07 1/22, C07K 14/755. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л., ДУ ІПКТМ НАМН; Заявка № 2906990; Заявл. 03.07.2009; Опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8 від 26.04.2011.
5. Патент на изобретение № (11)2445947, Россия, МПК C2(13), A61K38/37, A61K35/16. Способ получения концентрата фактора VIII из плазмы крови человека / Воробьев А. И., Берковский А. Л., Юрьев А. С. Заявка № 2010116125/15; Заявл. 26.04.2010; Опубл. 10.11.2011.
6. Приказ МЗ Украины № 211 от 09.03.2010 г. "Порядок контроля за соблюдением показателей безопасности и качества донорской крови и ее компонентов".
7. Синтез кремнеземных сорбентов із лігандами - активними барвниками тріазинового ряду / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, Н. А. Дульцева, Н. О. Шурко // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2008. - В. 47. - С. 63-69.
8. Шурко И. О. Препараты фактора згортання крові VIII та способи їх отримання / Шурко Н. О., Вороняк М. І., Даниш Т. В. // Біологічні студії. - 2014. - Т. 8 (№ 1) - С. 197-204.
9. Burnouf, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends / Burnouf T. // Journal of Chromatography B. - 1995. - Vol. 664. - P. 3-15.

10. De Waure C Gestione terapeutica dell'emofilia A / De Waure C., Cadeddu C., Gualano M.-R. // Italian Journal of Public Health, 2011; 8(2): 17-30.

11. Pat. 6831159US. Method for purifying factor VIII/vWF company by cation-exchange chromatography / M. Fischer, B. Schonberger, T. Urban et al. // Appl. № 09/367.459; Filed: 08.05.2000; Publ. 14.12.2004.

12. Ro Sen, S. Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates / Ro Sen S., Casoni Chiarion M. // Chromogenix-monograph series-2000. - 34 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб виділення фактора VIII згортання крові методом негативної афінної сорбції на макропористих кремнеземних сорбентах з лігандами - активними триазиновими барвниками, який **відрізняється** тим, що як додаткові процедури очищення перед етапом афінної хроматографії пропонується проведення переосадження на гелі гідроксиду алюмінію, поліетиленгліколем (ПЕГ-4000), антивірусної СД-обробки та іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose.

15

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601