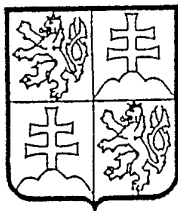


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 998

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 324-88.Q

(22) Přihlášeno : 18 01 88

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :
A 61 K 35/16

(40) Zveřejněno : 12 07 89

(47) Uděleno : 22 01 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : ÚSTAV SÉR A OČKOVACÍCH LÁTEK, s.p., PRAHA

(72) Původce vynálezu : RYBÁK MIROSLAV ing.CSc.,
LOŠTICKÝ CYRIL RNDr.CSc.,
KASAFÍREK EVŽEN ing.CSc.,
ULRYCH STANISLAV RNDr.,
SEDLMAIER OLDŘICH, PRAHA

(54) Název vynálezu : Způsob přípravy koncentrátů koagulačních
faktorů z krevní plasmy

(57) Anotace :

Řešení podle vynálezu se týká způsobu zpracování krevní plasmy nebo plasmatických frakcí na koncentráty faktorů II, IX, X a VII, a to selektivní sorpcí na ekvilibrovacím nosiči na bázi hydroxyethylmetakrylátu nebo hydroxyethylakrylátu s navázanou dietylaminoethyl- skupinou a následující selektivní desorpcí. Řešení všestranně zlepšuje a ekonomizuje společensky významnou výrobu preparátů z krevní plasmy.

Vynález se týká způsobu přípravy koncentrátů koagulačních faktorů z lidské a zvířecí krevní plasmy, nebo z jejich frakcí, tak zvaného protrombinového komplexu, což je soubor koagulačních faktorů závislých na vitamínu K, označovaných jako faktor II, VII, IX a X.

Zmíněné koagulační faktory v podobě více či méně čistých koncentrátů jsou důležitou výchozí surovinou pro přípravu intravenosních preparátů užívaných v klinické praxi u pacientů s vrozenou nebo získanou poruchou krevní srážlivosti, u akutních krvácení, při předoperační profylaxi krvácení, dále při získaném nedostatku těchto faktorů, nedostatku vitamínu K, poškození jaterního parenchymu a podobně.

Je známa příprava koncentrátů těchto faktorů s použitím sorbentů na bázi diethylamino-etyl-derivátů polysacharidů (dále DEAE-), například DEAE-Sephadexu. Použití těchto sorbentů pro zpracování krevní plasmy na koncentráty koagulačních faktorů má však několik nevýhod: polysacharidová matrice je značně náchylná k mikrobiálnímu napadení, čímž se mění fyzikálně-chemické vlastnosti sorbentu. Částice polysacharidových sorbentů špatně odolávají změnám pracovních podmínek, jako je teplota, tlak, koncentrace solí a podobně, což se projevuje negativně změnou objemu sorbentu (sloupce) se všemi dalšími nežádoucími důsledky. Snadná mikrobiální kontaminace těchto sorbentů ohrožuje nejen kvalitu připravovaných koagulačních faktorů, ale i přípravu ostatních preparátů (imunoglobulinů a albuminu) z hlediska jejich pyrogenity (produkci bakteriálních endotoxinů).

Uvedené nevýhody se podařilo odstranit vypracováním nového způsobu přípravy koncentrátů koagulačních faktorů z lidské nebo zvířecí krevní plasmy nebo z jejich frakcí, to je koagulačních faktorů II, VII, IX a X, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se výchozí surovina uvádí ve styk se sorbentem na bázi DEAE-hydroxyethylmetakrylátových nebo DEAE-hydroxyethylakrylátových polymerních nosičů, předem ekvilibrovaných puforem s hodnotou pH 7,2 až 7,6 s přísadou chloridu sodného, načež se po ukončené sorpci koagulačních faktorů odstraní nesorbované bílkoviny promytím stejným puforem s 0,2 mol/l chloridu sodného a desorpce bílkovinných podílů, obsahujících buď jednotlivě nebo ve směsi faktory II, VII, IX a X, se provádí puforem, obsahujícím chlorid sodný v koncentraci 0,3 až 2,0 mol/l.

Sorbenty na bázi syntetické matrice DEAE-hydroxyethylmetakrylátů a DEAE-hydroxyethylakrylátů, což jsou známé, komerčně dostupné výrobky československé provenience (DEAE-Spheron, LACHEMA Brno a Separon HEMA DEAE, TESSEK, Praha) používané při realizaci způsobu podle vynálezu, shora popsané nedostatky sorbentů na bázi DEAE-polysacharidů nemají. Syntetická matrice není napadána mikrobiální florou, nemění své vlastnosti při změně fyzikálně-chemických podmínek, sorbenty jsou velmi trvanlivé a mohou být používány po dlouhou dobu beze změny sorpčních vlastností. Při přípravě koncentrátů koagulačních faktorů je v jistých případech účelné přidávat do plasmy a použitých pufrů inhibitory proteináz k zabránění autoaktivace, jako například benzamidin. Autoaktivaci koagulačních faktorů lze též snížit provedením procesu separace při teplotě $+4^{\circ}$ až $+10^{\circ}$ C. Separaci lze provádět na sloupci v chromatografickém uspořádání nebo vsádkově v nádobě. Při vsádkovém způsobu lze s výhodou využít rychlé sedimentace částic o velikosti 80 až 300 μ m na místě obvykle používané centrifugace. Volba velikosti částic sorbentu se řídí technickými parametry zařízení, které je pro separaci k dispozici. Výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti těchto sorbentů podstatně zlepšují možnost komplexního zpracování lidské nebo zvířecí krevní plasmy na požadované produkty. Odolnost sorbentů proti vysokým tlakům dovoluje pracovat rychle a standardně, s možností přesné reprodukce pracovních postupů a s možností automatizace celého separačního procesu. Charakter nosiče umožňuje uskutečnit průtok tekutin tlakově, dodržovat časový limit jednotlivých operací a optimalizovat jejich průběh. Pokud jsou koagulační faktory připraveny jako koncentráty jednotlivých faktorů ve více nebo i méně purifikovaném stavu, lze je po stabilizaci (například sacharidy) za určitých podmínek pasteurizovat za účelem inaktivace eventuelně přítomných virů infekční hepatitidy nebo virů HIV. Způsob podle vynálezu tedy podstatně zdokonaluje a ekonomizuje společensky důležitou výrobu významných krevních derivátů a tím přispívá ke zlepšení léčebné a preventivní péče. Funkčně čisté koncentráty mají použití v diagnostice. Koncentráty faktorů II+X lze

využít k průkazu a kvantitativnímu stanovení faktoru VII v krevní plasmě a tělních tekutinách. Totožnost separovaných koagulačních faktorů lze prokazovat funkčními, to je koagulačními a enzymatickými, testy nebo testy na principu reakce antigen-protilátka.

V následujících příkladech provedení je uvedeno pro ilustraci několik možností zpracování krevní plasmy nebo plasmatických frakcí způsobem podle vynálezu. Tyto příklady však vynález pouze ilustrují, ale nijak neomezují na podmínky v nich uvedené.

Příklad 1

Příprava koncentráту koagulačních faktorů II, VII, IX a X

Jako zdroje koagulačních faktorů je použito lidské normální plasmy (nativní čerstvé plasmy nebo tak zvané K-plasmy, to je plasmy zbavené kryoprecipitátu) s kontrolovaným pH $7,4 \pm 0,1$. 100 ml plasmy se přivede do styku s DEAE-hydroxyethylmetakrylátovým gelem na sloupci, který byl ekvilibrován výchozím pufrům pH 7,4 (0,01 mol/l terciární citrát sodný obsahující 0,1 mol/l chlorid sodný). Zrnění sorbentu 100 μm . Po sorpci koagulačních faktorů jsou nesorbované a slabě vázané bílkoviny odstraněny promytím výchozím pufrům s koncentrací 0,2 mol/l chloridu sodného. Desorpce všech ostatních bílkovin, které po promytí zůstaly ve vazbě s iontoměničem, je provedena jednorázovým zvýšením koncentrace chloridu sodného v pufru na 1,0 až 2,0 mol/l. V získaném eluátu jsou lokalizovány všechny faktory tak zvaného protrombinového komplexu: faktor II, VII, IX, X a protein C. Frakce je dále zpracována na roztok vhodný k substituční terapii. Pomocí sorbentu průměrným obsahem DEAE-skupin (1,2 až 1,3 mekvivalentů/g) a velikostí částic 80 až 100 μm je uvedeným postupem separováno z normální lidské plasmy 60 až 90 % faktorů "protrombinového komplexu". Tyto faktory představují hlavní bílkovinný podíl získaného koncentrátu.

Regenerace sorbentu je provedena intensivním promytím sorbentu citrátovým pufrům obsahujícím 2,0 mol/l chloridu sodného, pak destilovanou vodou a pufrům, který je výchozí při dalším použití ionexu.

Příklad 2

Příprava koncentrátu faktorů II+X, vedle faktoru IX a vedle faktoru VII

100 ml lidské plasmy je pasážováno přes sloupec DEAE-hydroxyethylmetakrylátu za stejných podmínek jako v příkladu 1. Po vymytí balastních bílkovin citrátovým pufrům pH 7,4 s obsahem 0,2 mol/l chloridu sodného je eluce provedena solným gradientem od 0,2 do 0,8 mol/l chloridu sodného v pufru pH 7,4 za kontroly bílkovin vytékajících ze sloupce registračním fotometrem při vlnové délce 280 nm. Při koncentraci chloridu sodného 0,3 až 0,4 mol/l je ze sloupce eluována frakce obsahující faktor IX, při koncentraci 0,45 až 0,55 mol/l vytéká ze sloupce roztok obsahující veškerý podíl faktorů II a X a při koncentraci chloridu sodného 0,7 až 0,8 mol/l vytéká podíl obsahující funkčně čistý faktor VII. Pro některé účely je vhodné spojit frakce s obsahem faktoru IX a II+X v jediný podíl. V tomto případě je výhodné eluci provést stupňovitým způsobem. Při koncentraci chloridu sodného 0,5 mol/l je získána frakce obsahující faktory IX, II a X, zvýšením koncentrace chloridu sodného na 0,8 mol/l je eluována frakce s lokalizovaným faktorem VII. Ve všech případech se proces odehrává v citrátovém pufru pH 7,4. Získaný koncentrát faktorů IX, II a X je prostý faktoru VII a koncentrát faktoru VII je prostý ostatních faktorů protrombinového komplexu. Kvantitativní poměry jsou obdobné jako v příkladu 1.

Příklad 3

Příprava koncentrátu protrombinu (faktoru II) z promývacího roztoku (0,4 mol/l acetát sodný pH 7,4) získaného při separaci antitrombinu III (čs. AO 263 615) z lidské plasmy.

Odpadová frakce získaná při separaci antitrombinu III na heparin-hydroxyethylmetakrylátu obsahuje vedle menšího množství koagulačních faktorů IX, X a proteinu C značně protrombinu, který lze separovat způsobem podle vynálezu.

100 ml promývacího pufru je naředěno destilovanou vodou na dvojnásobný objem a filtrováno přes sloupec DEAE- hydroxyethylmetakrylátu ekvilibrovaného 0,2 mol/l acetátem sodným pH 7,4 velikosti 1,5 x 20 cm. Po sorpci a promytí sloupce 0,2 mol/l acetátovým pufrům je eluce provedena chloridem sodným podle příkladu 1 a 2.

Příklad 4

Příprava koagulačních faktorů protrombinového komplexu z etanolové frakce III

Jako výchozí surovina slouží etanolová frakce III získaná při frakcionaci lidské krevní plasmy etanolem obsahující protrombin vedle menšího množství faktoru IX, X a VII. 100 g této frakce v podobě vlhké sraženiny je suspendováno v 1 litru citrátového pufru pH 7,4 (0,01 mol/l) s obsahem 0,1 mol/l chloridu sodného. Po 2 h míchání při 0 až 4 °C je suspenze centrifugována a supernatant je po případné filtraci zpracován podle příkladu 1 nebo 2.

Příklad 5

Příprava koagulačních faktorů protrombinového komplexu z hovězí plasmy

Postupuje se podle příkladu 2 s tím, že jako výchozí surovina je použita hovězí plasma získaná z krve odebrané do 3,8 % hmot. citrátu sodného v poměru 1 : 9. Získaný koncentrát faktoru II+X slouží jako reagens k průkazu faktoru VII v plasmě a tělních tekutinách lidí a skotu, což umožňuje průkaz mastitidy skotu analýzou mléka.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy koncentrátů koagulačních faktorů z lidské nebo zvířecí krevní plasmy nebo z jejich frakcí, to je koagulačních faktorů II, VII, IX a X, vyznačující se tím, že se výchozí surovina uvádí ve styk se sorbentem na bázi diethylaminoethylhydroxymetakrylátových nebo diethylaminoethyl-hydroxyethylakrylátových polymerních iontoměničů, předem ekvilibrovaných pufrům s hodnotou pH 7,2 až 7,6 s přísadou chloridu sodného, načež se po ukončené sorpci koagulačních faktorů odstraní balastní bílkoviny promytím stejným pufrům s 0,2 mol/l chloridu sodného a desorpce bílkovinných podílů, obsahujících faktory II, VII, IX a X se provádí elucí pufrům, obsahujícím chlorid sodný v koncentraci 0,3 až 2,0 mol/l.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako pufru s hodnotou pH 7,2 až 7,6 používá citrátového pufru, obsahujícího 0,01 mol/l terciárního citrátu sodného a 0,1 mol/l chloridu sodného.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako pufru s hodnotu pH 7,2 až 7,6 používá 0,2 mol/l roztoku acetátu sodného.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se výchozí surovina uvádí ve styk se sorbentem průtokově nebo vsádkově.
5. Způsob podle bodu 1 až 4, vyznačující se tím, že se do výchozí suroviny a pufru přidává inhibitor proteinázové aktivity koagulačních faktorů.
6. Způsob podle bodu 1 až 5, vyznačující se tím, že se proces provádí při teplotě +2 až +4 °C.