



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 17.VII.1965 (P 110 086)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.IX.1967

Kl. 30 h, 2/04

MKP A 61 k

23/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: dr Sław Polak, dr Jerzy Rybczyński, dr Marian Limański, mgr. Anna Krahelska, Krystyna Piskurek, Kazimierz Budziński

Właściciel patentu: Wojewódzka Stacja Krwiodawstwa w Katowicach, Katowice (Polska)

Sposób otrzymywania czystego środka antyhemofilowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania czystego środka antyhemofilowego znanego w skrócie jako AHF.

Przy schorzeniach hemofilii stosuje się środek antyhemofilowy otrzymywany z ludzkiej krwi. Środek ten przy stosowaniu dożylnym powoduje uzupełnienie czynnika VIII niezbędnego do zahamowania krwawienia powstałego w wyniku hemofilii.

Dotychczas środek ten otrzymywano w czystej postaci zwłaszcza sposobem Cohn'a, Hoorweg'a i Blomback'a. Sposoby te polegały na ekstrakcji osocza różnymi roztworami buforowymi w układach otwartych. Według sposobu Cohn'a stosuje się na przykład alkohol etylowy do otrzymania szeregu frakcji osocza oznaczonych od I—VI. Jest to jednak sposób bardzo kłopotliwy wymagający stosowania specjalnej drogiej aparatury chłodniczej a nawet chłodzonych pomieszczeń produkcyjnych. Według innych sposobów, do frakcjonowania próbowano stosować poza alkoholem etylowym również alkohol metylowy, eter etylowy, elektroforezę preparatywną na bibule. Wszystkie te sposoby uniemożliwiają prowadzenie procesu w warunkach aseptycznych i uniemożliwiają otrzymanie czystego preparatu, co wyklucza zastosowanie tych preparatów do celów leczniczych zwłaszcza do stosowania dożylnego. Poza tym sposoby te pozwalają na otrzymanie z osocza ludzkiego tylko jednego preparatu na przykład środka antyhe-

2

filowego, albo tylko fibrynogenu, przy czym pozostała z procesu reszta stanowi zawsze nieużyteczny odpad.

Wychodząc z założenia, że surowcem do produkcji tych środków jest drogie ludzkie osocze, brak możliwości wykorzystania w całości tego surowca do produkcji preparatów osoczowo-pochodnych jest poważną wspólną wadą wszystkich znanych dotychczas sposobów.

Powyższe znane sposoby wymagają poza tym stosowania drogich i skomplikowanych odczynników i aparatury, co uniemożliwia podjęcie produkcji tych środków na skalę umożliwiającą zaspokojenie potrzeb lecznictwa.

Oprócz powyższych trudności i wad wynikających z prowadzenia skomplikowanego procesu, czysty środek antyhemofilowy wyprodukowany jednym ze znanych sposobów wykazuje jeszcze tę poważną wadę, że wymaga przestrzegania specjalnych warunków podczas przechowywania (np. temperatury około — 20°) od chwili wyprodukowania do chwili zastosowania w lecznictwie.

Z powyższych powodów w lecznictwie powszechnie stosuje się tak zwaną I frakcję Cohn'a otrzymaną z krwi ludzkiej, która zawiera zarówno czynnik antyhemofilowy, jak również fibrynogen stosowany przy afibrynogenemii. I frakcję Cohn'a można uzyskać w sposób stosunkowo łatwy i tani, nie znane są jednak sposoby równoczesnego wy-

odrębnienia z niej AHF i fibrynogenu bez zniszczenia jednego ze składników.

Sposób według wynalazku, umożliwia otrzymanie z I frakcji Cohn'a w sposób tani i powszechnie dostępny czysty środek antyhemofilowy i jednocześnie pełnowartościowy osad z którego można otrzymać czysty fibrynogen. Poza tym sposób według wynalazku nie wymaga stosowania kosztownej i skomplikowanej aparatury, gdyż jest stosunkowo prosty i umożliwia wykonanie wszystkich czynności w jednym układzie zamkniętym, gwarantującym utrzymanie bezwzględnych warunków aseptycznych.

Sposób według wynalazku polega na termicznej obróbce I frakcji Cohn'a, w wyniku czego uzyskuje się wyodrębnienie fazy stałej z której otrzymuje się przy dalszej obróbce czysty fibrynogen, oraz fazy ciekłej z której następnie otrzymuje się czysty środek antyhemofilowy AHF.

Sposobem według wynalazku czysty środek antyhemofilowy AHF otrzymuje się następująco: osad I frakcji Cohn'a rozpuszcza się w czasie 1—2 minut w temperaturze 30°C w roztworze wodnym zawierającym 0,9% NaCl i 1% glukozy wziętym w ilości odpowiadającej 1/5 objętości osocza wyjściowego, po czym otrzymany roztwór poddaje się inkubacji w temperaturze 0°C w czasie 45 minut, a następnie poddaje się odwirowaniu w temperaturze 0°C przez 15 minut. Ta część procesu przy ścisłym zachowaniu temperatur i czasu trwania odbywa się w jednym zamkniętym naczyniu gwarantującym bezwzględne warunki aseptyczne. Po odwirowaniu roztworu, zawieszinę sączy się w temperaturze 0°C. Przesącz poddaje się szybkiemu zamrożeniu do -40°C oraz liofilizowaniu. Otrzymany produkt jest czystym środkiem antyhemofilowym, który gwarantuje szybki efekt leczniczy. Z pozostałego po odwirowaniu osadu, po dalszej obróbce można uzyskać cenny lek znany pod nazwą fibrynogenu.

Przykład. Materiałem wyjściowym jest krew konserwowana pobierana na płyn konserwujący ACD — B. Zaraz po pobraniu, krew wiruje się w temperaturze +4°C przez okres 15 minut i przy 2000 obrotach na minutę i odprowadza w warunkach jałowych osocze, które poddaje się powtór-nemu wirowaniu przez 10—15 minut w temperaturze 0°C. Otrzymane osocze w ilości 400—450 ml ochładza się natychmiast do temperatury 0°C. Po

tym osocze stale i powoli mieszając zadaje się alkoholem etylowym uprzednio sączonym przez filtr Seitza oraz wymrożonym do temperatury -20°C w ilości 9 ml na 100 ml osocza otrzymując końcowe stężenie 8% objętościowych alkoholu.

Całość odstawia się na okres 24 godzin w temperaturze -3°C. Po 24 godzinnym okresie przechowywania w tej temperaturze, całość poddaje się wirowaniu przez okres 10 minut przy 2000 obrotach na minutę w temperaturze -3°C, otrzymując w ten sposób osad pierwszej frakcji Cohn'a zawierający środek antyhemofilowy AHF oraz fibrynogen jak i supernatant (S) z którego można otrzymać przy dalszej obróbce trombinę to jest środek hemostatyczny do stosowania zewnętrznego. Otrzymany osad I frakcji Cohn'a najpierw rozpuszcza się w temperaturze +30°C w ciągu 1—2 minut w wodnym roztworze zawierającym 0,9% NaCl i 1% glukozy wziętym w ilości 1/5 osocza wyjściowego. Otrzymany lekko opalizujący roztwór (AHF + fibrynogen) jako materiał wyjściowy do dalszego frakcjonowania termicznego, poddaje się najpierw inkubacji w temperaturze 0°C przez okres 45 minut, a następnie odwirowaniu w temperaturze 0°C przez 15 minut i przy 1800—2000 obrotach na minutę, po czym sączeniu w temperaturze 0°C przez zestawy silikonowe. Przesącz poddaje się natychmiast zamrożeniu do temperatury -40°C i liofilizowaniu, w wyniku czego otrzymuje się czysty środek antyhemofilowy AHF.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania czystego środka antyhemofilowego (AHF) z osadu I frakcji Cohn'a uzyskiwanego przez frakcjonowanie osocza **znamienny tym**, że osad I frakcji Cohn'a rozpuszcza się w czasie 1—2 minut w temperaturze 30° w roztworze wodnym zawierającym 0,9% NaCl i 1% glukozy wziętym w ilości odpowiadającej 1/5 objętości osocza wyjściowego, po czym otrzymany roztwór poddaje się inkubacji w temperaturze 0°C przez okres 45 minut, a następnie odwirowaniu w temperaturze 0°C przez 15 minut, po czym po oddzieleniu osadu pozostałą ciecz stanowiącą środek antyhemofilowy poddaje się szybkiemu zamrożeniu do temperatury -40° oraz liofilizowaniu.