

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3681

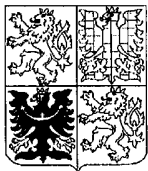
(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 01 N 1/02

A 61 L 2/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.04.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/840765**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IT98/00086**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/46073**

(71) Přihlašovatel:

SIGMA-TAU INDUSTRIE
FARMACEUTICHE RIUNITE S. P. A., Rome, IT;

(72) Původce:

Dottori Secondo, Marino, IT;

(74) Zástupce:

Vandělíková Jana Ing., Petrská 12, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Zlepšení skladování a odolnosti krevních
produktů**

(57) Anotace:

Způsob zlepšení trvanlivosti koncentrátů červených krvinek a destiček, který zahrnuje přídavek 1 mM až 10 mM L-karnitinu a jeho derivátů. Tím se umožní zvýšení životnosti konzerv koncentrátů červených krvinek a destiček nad běžnou dobu. Látky takto upravené vykazují při tranfuzi pacientovi prodloužený cirkulační poločas. Zlepšení dosažené tímto způsobem umožňuje ozařování zapečetěných kontejnerů krevních produktů až k dosažení důkladné sterilizace a zničení v nich obsažených leukocytů.

CZ 1999 - 3681 A3

- 1 -

Zlepšení skladování a odolnosti krevních produktů

Oblast vynálezu

Vynález se týká metod zlepšujících uskladnění a stabilitu včetně odolávání hemolyze a zlepšení životnosti krevních produktů včetně konzerv červených krvinek (RBC), destiček a podobně. Způsob prodloužení životnosti těchto produktů, rovněž tak jako odolávání vlivům poškozujícím jejich membránu jako je záření, je zajištěno skladováním produktů v suspenzi obsahující účinné množství L-karnitinu nebo alkanoyl-L-karnitinů.

Dosavadní stav

Trvale roste zájem jak na národních tak mezinárodních dodávkách krve. Bere se v úvahu jak integrita, tak spolehlivost současných dodávek a možnost udržování větších zásob po delší dobu. Jednou z příčin tohoto stavu je relativně krátká skladovací doba krevních produktů. Skladovací doba konzerv RBC (koncentráty červených krvinek nebo RCC), tedy běžně převažující formy krevních produktů pro transfuze a podobné úkony je omezena na 42 denní skladování. Po této době značně klesá hladina ATP ve spojení s významnou změnou hodnoty pH, která intenzivně indikuje snížení životnosti, nebo pokud životnost trvá, extrémně krátkou cirkulační dobu při infuzi. Samotnou krev není možno skladovat in vivo dostatečnou dobu. U destiček je běžná skladovací doba ještě kratší a bývá normálně 5 dnů při 22°C. Rozdíly ve skladovací stabilitě koncentrátů destiček (PC) oproti RBC závisí na probíhajících metabolických reakcích, částečně pro

přítomnost mitochondrií v PC a jejich nepřítomnost v RBC. Zatímco oba krevní produkty vykazují pokles ATP spojený s poklesem pH v závislosti na čase, doprovázený tvorbou kyseliny mléčné, je přítomnost mitochondrií v PC spíše problémem aktivace vinou glykolýzy.

Požadavky na spolehlivost a integritu dodávek krve současně vzrůstá. U krevních dodávek byly opakovaně zjištěny zvláště kontaminace bakteriemi nebo mikrobielními látkami či viry. Taková situace je velmi vážná v zemích s méně náročnými způsoby odběru a skladování. I když je možno do odebraných produktů přidávat některá činidla pro snížení kontaminace, nelze to doporučovat, protože je při transfuzi příjemce dostává. Jednou z doporučovaných alternativ je ozařování produktů po konzervování, které se obvykle provádí do pružných plastových vinylových zásobníků. Takový ozařovací postup je nevhodný pro skladování RBC a PC, protože má za důsledek sníženou funkčnost buněk.

Malý, ale stále vzrůstající podíl populace, která je příjemcem krve, je pod rizikem obecně fatální příhody známé jako s transfuzí spojená porucha z příjmu transplantátu hostitelem (Transfusion Associated Graft Versus Host Disease - TAGVHD), pro přítomnost živých allogenních leukocytů. Tento syndrom se obvykle vyskytuje u imunosupresivních pacientů například s nádorem nebo u pacientů s transplantovanou kostní dřeví, avšak může také

nastat u imunokompetentních osob omezující se na populaci s leukocytovým Locus A polymorfizmem (Human Leukocyte Locus A - HLA).

Zvláštní pozornost byla věnována hledání způsobů k prodloužení stability při skladování. Jeden takový způsob k prodloužení doby skladování PC je citován v US parentu 5,466,573. Tento patent je zaměřen na úpravu PC zdroji acetátových iontů, které působí jak jako substrát pro oxidativní fosforylaci, tak jako pufr působící proti snižování hodnoty pH způsobené produkcí kyseliny mléčné. Takováto metoda nepůsobí přímo na hemolýzu a proti rozpadu membrány. Alternativní způsob je popsán v US patentu 5,496,821. V tomto patentu se všechna krev skladuje v preparátu obsahujícím L-karnitin (LC) nebo deriváty alkanoyl-L-karnitinů. Patent však nepopisuje, jakým způsobem na krevní produkty jako je PC nebo RBC suspenze působí a týká se přinejlepším dopadu na charakteristiky LC plazmy.

Jak je už výše zmíněno, kontaminace dodávek krve mikrobielními čidly nebo viry je dalším problémem adresovaným lékařské veřejnosti. Jedním ze způsobů sterilizace produktu a pro zlepšení spolehlivosti s ohledem na kontaminaci, je ozařování krevního produktu. Obecně se doporučují hodnoty okolo 25 centigray (cG) gama záření, kterými se produkt ozáří po jeho uzavření v plastovém, skleněném nebo jiném zásobníku. Ozařování bohužel způsobuje léze buněčných membrán s hemolýzou RBC. Při

ozářování krevních produktů včetně samotné krve, konzerv RBC a PC tyto problémy přetrvávají.

Předmětem práce odborníků v tomto oboru zůstává tedy vyvinutí metody umožňující rozšíření doby životnosti a poločasu oběhu RBC a PC při transfuzi nad běžný rámec. Cílem odborníků navíc zůstává nalezení způsobu jakým se má provádět sterilizace krevních produktů včetně samotné krve, konzerv RBC a PC ozařováním bez podstatného poškození, lézí a hemolýzy.

Podstata vynálezu

Předkladatel po rozsáhlém výzkumu zjistil, že poškození membrány způsobené RBC a PC při skladování nebo při ozařování se může podstatně odstranit nebo potlačit suspendováním krevních produktů do běžného ochranného roztoku jako je AS-3, kde ochranný roztok dále obsahuje L-karnitin nebo deriváty alkanoyl-L-karnitinu v koncentraci 0,25 až 50 mM nebo vyšší. Předkladatelův objev spočívá v poznání, že podstatný rozklad krevních produktů, který je běžně spojen s poklesem hodnoty ATP a pH, má spojitost s poškozením membrány a hemolýzou. Odolnost a rekonstrukci membrány lze podle vynálezce výzkumu ovlivnit recyklací lipidů, částečně L-karnitinem, irreverzibilní absorbcí na RBC a podobné krevní produkty.

Přehled obrázků

Obrázek 1. Hodnoty průměrné životnosti 42 dnů skladovaného RBC po infuzi v závislosti na dárci kontrolního vzorku a vzorku skladovaného s LC. Šipky ukazují na střední hodnotu SD kontrolního vzorku a RBC skladovaných v LC. Na horní části diagramu je také přesně vypočítaná hodnota p.

Obrázek 2. Obsah karnitinu v červených krvinkách v týdnech časových intervalech skladování. Obsah karnitinu byl sledován podle popisu v odstavci Použité materiály a metody. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů provedených duplikátně. Odchylky mezi pokusy nebyly větší než 7%. Prázdná kolečka platí pro RBC skladované se samotným AS-3, plná kolečka platí pro RBC skladované v AS-3 s přidaným LC (5 mM).

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález používá L-karnitin a jeho alkanoylderiváty jako činidla podporující odolnost a rekonstrukci buněčné membrány a k potlačení hemolýzy v krevních produktech. Alkanoyl-L-karnitiny jsou acetyl-, butyryl-, isobutyryl-, valeryl- isovaleryl- a zvláště propionyl-L-karnitin. Pokud se zde odkazuje na LC, jedná se vždy obecně o tuto skupinu L-karnitinů. Namísto L-karnitinu mohou být použity popsané alkanoyl-L-karnitiny a jejich farmaceuticky přijatelné sole.

Přídavek LC ke krevním produktům včetně RBC a PC vyžaduje, aby byl LC přítomen v účinném množství k udržení odolnosti a funkce a k potlačení hemolýzy. Provedený výzkum včetně příkladů uváděných dále ukazuje na oblast minimální účinnosti na produkt pro většinu dárců v

koncentraci mezi 0,25 mM až 0,5 mM. Horní limit je praktičtější než fyziologický. Koncentrace 50 mM nebo vyšší je dobře tolerována. Hodnoty jsou v souladu s toxikologickými hodnotami a osmoticky přijatelné. Přednost se dává koncentracím 1 až 30 mM. Pro obor 1 až 10 mM nebo vyšší je vhodná oblast 4 až 6 mM, s možností značných rozdílů. Účinek tohoto vynálezu včetně prodloužení životnosti a prodloužení oběhového poločasu během transfuze může být silně závislý na dárci. Obecně řečeno, účinná koncentrace LC je 0,5 až 50 mM. Lékař v terénu může požadovat rozšíření této oblasti v obou směrech v závislosti na příslušném dárci. Takové rozšíření nevyžaduje zvláštní zkoumání.

LC je shodný s konvenčními podpůrnými roztoky (stabilizačními roztoky), které se připravují zvláště k zajištění pufování. Obvykle používané roztoky obsahují ACED (kyselina citronová - citrát sodný - dextroza), CPD (citrát - fosfát - dextroza) a jejich modifikace včetně CPD2/A-3 a odpovídající přípravky. Přípravek typicky obsahuje cukry jako je glukóza nebo manitol, nejméně jednu fosforečnanovou sůl, citrát a další sole pro dosažení rovnováhy. LC je normálně rozpustný a může se k těmto přípravkům volně přidávat v požadovaném množství.

Vhodné roztoky jsou popsány v US patentu 5,496,821 zde uvedeného jako odkaz. Lze používat i jiné, než běžně používané roztoky, včetně umělé plazmy a dalších fyziologicky přijatelných roztoků, pokud obsahují LC podle předkládaného vynálezu. Důležitou podpůrnou složkou roztoku je LC.

Příklady provedení

Schopnost LC, pokud je obsažen v suspenzi krevních produktů jako je např. RBC a PC, prodloužit životnost a tím i skladovatelnost a cirkulační dobu při transfuzi příjemci, je dále uvedena jako příklad na pokusech in vitro a in vivo. Pokusy využívají LC, avšak lze použít i další alkanoyl-L-karnitiny. Zvláštní důležitost dále uvedené demonstrace je ve zlepšení odolnosti (včetně rekonstrukce) buněčné membrány a potlačení hemolýzy.

Použité materiály a metody

Popis studie I:

Hodnocení kvality skladovaných RBC s LC a bez něj in vivo a in vitro.

Pokusné subjekty. Předmětnou populací výzkumu byly muži a ženy. ve věku od 18 do 65 let bez mentální nebo tělesné nedostatečnosti, neužívající léčiva, která by mohla ovlivňovat životnost RBC. Jedinci byli vybíráni tak, aby splňovali běžná allogenní dárcovská kritéria podle seznamu Kódů federálního registru (Code of Federal Register), kapitola 2, normy Americké asociace krevních bank (American Association of Blood

Banks) a Předpisů pro zacházení s krví (Blood Services Directives) Amerického národního červeného kříže. Studie byla schválena Institutional Review Board of Medical College of Hampton Roads a tyto subjekty k tomu daly před započítím studie souhlas.

Každý dárce šel na dva odběry s přestávkou 72 dnů mezi nimi a při prvním odběru byl zařazen buď do testované skupiny nebo kontrolní skupiny.

Systém skladování krve. Normalizovaný systém CP2D/AS-3 (Miles, Inc.)

Byly použity polyvinylchloridové (PVC) plastové sáčky s plastifikátorem diethyl-n-hexylftalátem (DEHP). Na každou zkoušební jednotku bylo do zásobníku obsahujícího additivní roztok AS-3 přidáno 245 mg LC (v 1,1 ml čistého bezpyrogenního roztoku ve sterilizované skleněné lahvi) tak, aby byla konečná koncentrace 5 mM. Do kontrolní jednotky bylo k roztoku AS-3 přidáno 1,1 ml 0,9% NaCl za stejných podmínek. Přídavek LC nebo solného roztoku do sáčků byl proveden injektáží vzorkovací spojkou pomocí injekční stříkačky. Bylo to provedeno laminárním prouděním pod UV lampou.

Odběr a zpracování. Byly použity standardní metody odběru ze žíly a bylo odebráno přibližně 450 ± 50 ml krve. Krevní jednotka byla před zpracováním uchovávána 4 až 8 hodin při laboratorní teplotě. Jednotka byla za standardních podmínek zcentrifugována, po centrifugaci

plazmatický supernatant oddělen a sedimentový koláč RBC resuspendován ve standardním roztoku AS-3 (kontrolní zkouška) nebo v L-karnitinu obsahujícím roztok AS-3 (zkouška). Jednotky - konzervy se suspendovanými RBC byly uskladněny při 4°C po dobu 42 dní.

Měření in vitro: Měření byla provedena se vzorky RBC před (0 den) a po skladování (42 den) včetně stanovení hodnoty ATP, celkového hemoglobinu a hemoglobinu v supernatantu, hematokrytu (Htc), počtu RBC, WBC a destiček, osmotické fragility RBC, morfologie RBC, hodnoty laktátu a glukózy a hladiny draslíku v supernatantu. To bylo provedeno za použití standardních postupů již dříve popsanych Heatonem, et al., Vox Sang, 57, 37-42, 1989.

Posttransfuzní měření in vivo. Po 42 denním skladování byl odebrán vzorek a skladované buňky označeny Cr za použití standardních metod. Současně pro stanovení množství RBC byl odebrán čerstvý vzorek od dárce pro označení RBC ^{99}Tc . Po označení byly uskladněné buňky o 15 μCi označené ^{51}Cr a 15 μCi označené ^{99}Tc smíseny a infuze provedena společně. Vzorky krve (5 ml) byly odebírány po infuzi v různých časových intervalech až do 35 dne a vypočítána 24 hodinová obnova a životnost v %. Procentní hodnota 24 hodinové obnovy byla stanovena za použití jednoduché značkovací metody, při použití logaritmicko-lineární regrese úrovně radioaktivity vzorků odebíraných v 5., 7,5., 10. a

15. minutě ke stanovení nulové časové úrovně nebo podvojně značkovací metody používající hmotu dárcovy RBC ke stanovení ^{99}Tc .

Cirkulační životnost přeživších RBC použitých pro transfuzi a označených Cr byla stanovena ve vzorcích odebíraných po 24 hodinách a potom dvakrát týdně po dobu 5 týdnů. Úroveň radioaktivity byla korigována na konstantní 1% eluci denně. Hodnoty byly vyneseny jako lineární funkce v závislosti na dnech po transfuzi jako proměnná (osa X) a korigované pulzy Cr jako závislá proměnná (osa Y). Životnost byla potom brána jako průsečík vnesené křivky s osou X.

Statistická analýza. S hodnotami ze zkoušek jednotek in vivo a in vitro byl proveden párový t-test nebo rutinní neparametrická statistická analýza ke stanovení, zda se objevily statisticky významné rozdíly (1-tail) ve středních hodnotách mezi zkouškou a kontrolním vzorkem. Byla zjištěna statistická významnost pro hodnotu p menší než 0,05.

Popis studie II

Studie absorpce LC erythrocyty a recyklace lipidů při uskladnění až do 42 dnů

Chemikalie. Bovinní sérumalbumin bez esenciálních mastných kyselin (BSA) byl získán od SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo., USA.

[1- ^{14}C]kyselina palmitová (58 Ci.mol $^{-1}$) byla získána od New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., USA. Tenkovrstvé chromatografické desky Whatman LK6 (silikagel) (20x20 cm) s předem preparovanou vrstvou byly získány od Carlo Erba, Milano, Itálie. Všechna další činidla byla čistoty reagent grade.

Zkouška červených krvinek na karnitin. Vzorky krve byly odebrány ze skladované konzervy RCC, jednou promyty 4 objemy studeného 0,9% roztoku NaCl. Potom byl RBC resuspendován v 0,9% NaCl na konečný 50% hematokryt a deproteinován kyselinou chloristou podle popisu v publikaci Cooper, et al., Biochem. Biophys. Acta, 959, 100-105, 1988. Alikvotní podíly výsledného extraktu byly analyzovány na volný LC radiochemickou zkouškou podle Pace, et al., Clin. Chem., 24, 32-35, 1978.

Výsledky

Studie I

Charakteristiky konzerv RCC upravené AS-3 před uskladněním

Vlastnosti produktů RCC upravené AS-3 byly sledovány v průběhu zpracování všech krevních konzerv. Mezi charakteristikami zkoušených a kontrolních konzerv RBC s AS-3 nebyly zjištěny žádné rozdíly v hodnotách jako je objem, Htc a počet WBC, a vlastnostech RBC in vitro jako je úroveň ATP, hemoglobin a koncentrace draslíku v supernatantu a osmotická fragilita (tabulka 1).

Charakteristiky konzerv RBC po 42 denním uskladnění

Metabolické. Množství spotřebované glukózy a vytvořeného laktátu během 42 dnů uskladnění bylo u zkoušených i kontrolních konzerv podobné (tabulka 2). Jak se očekávalo, byla zjištěna vysoká nepřímá závislost mezi těmito dvěma parametry glykolýzy ($r = 0,76$). Nižší hodnoty hemolýzy a vyšší koncentrace ATP byly v porovnání s kontrolními vzorky zjištěny u konzerv RBC uskladněných s karnitinem. Jak ukazuje obrázek

1, byly tyto vyšší hodnoty ATP pozorovány ve všech případech kromě jednoho páru ($p < 0,01$).

Membrána. Procentní hemolýza na konci doby uskladnění byla nižší u konzerv s L-karnitinem, jak to ukazuje obrázek 2. Na druhé straně nebyly zjištěny žádné významné rozdíly co se týká koncentrace draslíku v supernatantu, osmotické šokové odezvě a morfologickém zlomku, které byly na konci 42 denního uskladnění v očekávaném rozmezí.

Post transfuzní životnost. Střední 24 hodinová procentní obnova kontrolní konzervy byla podobná jako u předchozího zjištění. Střední procentní obnova červených krvinek uskladněných s karnitinem však byla vyšší než u kontrolních uskladněných buněk ($p < 0,05$). Po infuzi byla střední cirkulační životnost buněk navíc vyšší u buněk uskladněných s karnitinem (obrázek 1). Hmotnosti dárců RBC, jak bylo později zjištěno na dvou případech, byly velmi blízké ($r = 0,98$) a statisticky se nelišily.

Korelační studie. Jak bylo očekáváno, 24 hodinová procentní obnova ukazuje na značný vztah s úrovněmi ATP ($r = 0,63$) a dalšími měřeními integrity membrány RBC jako je hemolýza ($r = 0,57$), osmotická fragilita ($r = 0,71$) a morfologický zlomek ($r = 0,59$). Procento hemolýzy má u konzerv RBC značný vztah k úrovni ATP ($r = 0,83$) a také k počtu WBC ($r = 0,83$). Cirkulační životnost RBC nevykazuje žádnou zvláštní závislost na žádném parametru in vitro.

Studie II

Absorbce karnitinu v uskladněných RBC

RBC uskladněné v samotném mediu AS-3 nevykazují během skladování žádnou významnou ztrátu obsahu LC (obrázek 2). To je v souladu se zjištěními Coopera, et al., supra, ukazujíc, že lidské červené krvinky volně nevyměňují LC s plazmou nebo isoosmotickým puřrem. Pokud byly červené krvinky uskladněny s AS-3 doplněným LC, bylo detekováno vyšší množství intracelulárního LC než v případě samotného AS-3 (obrázek 2). Obsah LC se zvyšuje lineárně s časem skladování a ve 42. dnu dosahuje čtyřnásobku.

Diskuze

Konzervy zkoušených RBC in vitro a in vivo na konci skladování po 42 dnech vykazují značné rozdíly mezi RBC uskladněnými s karnitinem v porovnání s kontrolními uskladněnými RBC. Rozdílné vlastnosti RBC in vitro odrážejí metabolickou a membránovou integritu jako je obsah ATP a procento hemolýzy, a rovněž tak životnost buněk (24 hodinová procentní obnova a cirkulační životnost) RBC uskladněných s karnitinem a zjištěná přímým měřením, byla značně vyšší. Prodloužení střední doby života přežívajících RBC cirkulujících 24 hodin po infuzi je zajímavé. Toto zjištění se může vztahovat k irreverzibilní absorpci LC během uskladnění a jde o bezprecedentní a neočekávaný objev. Hodnoty různých vlastností RBC získané kontrolními studiemi byly podle očekávání a nelišily se od předchozích studií. V době odběru krve nebyly u konzerv nebo

charakteristik konzerv RBC zjištěny žádné rozdíly mezi testovanými a kontrolními vzorky. Jak je znázorněno na obrázku 1 - 3, úroveň ATP v RBC, procento hemolýzy a cirkulační životnost byly silně závislé na dárci a jelikož byla studie prováděna tak, že se vytvořily náhodné páry pěti zkušebních a pěti kontrolních vzorků, a to jak pro první, tak druhý případ, je nepravděpodobné, že by zjištěné rozdíly mohly způsobit chyby v provedení. Je tedy zřejmé, že pozorované rozdíly této studie byly způsobeny přidavkem L-karnitinu k testovaným konzervám. Možnost, že zvýšená životnost odráží sníženou eluci Cr nelze vyloučit, ale není konzistentní se zlepšenými hodnotami uskladněných červených krvinek in vitro, která je v souladu se zjištěnou životností in vivo.

Mnohá zkoumání zjistila, že L-karnitin a jeho acylestery mají cytoprotektivní a stabilizační vliv na membránu různých buněk včetně červených krvinek. Viz např. Snyder, et al., Arch. Biochem. Biophys., 276, 132 - 138, 1990. V této studii bylo zjištěno, že L-karnitin byl během uskladnění RBC irreverzibilně absorbován. Přesto, že povaha tohoto jevu není zcela jasná, lze vyloučit účast specifického nosiče absorbujícího L-karnitin. Pokud je nám známo, jediný známý nosič L-karnitinu působí v buněčných systémech, kde je intracelulární koncentrace L-karnitinu mnohonásobně vyšší než se normálně vyskytuje v extracelulárním prostředí. Koncentrace L-karnitinu v červených krvinkách je podobná jako v plazmě. Tak bez ohledu na nízkou teplotu, vyčerpání ATP a

další metabolické změny nastávající během uskladnění, kdy jsou červené krvinky uskladněny v mediu obsahujícím relativně vysoká množství exogenního L-karnitinu, zdá se, že se ustaví jednosměrná absorpce L-karnitinu buňkami. V tomto oboru se zatím nic podobného nevyskytlo.

Na podstatu účinku L-karnitinu na uskladněné RBC lze nahlížet jako na biofyzikální nebo metabolickou intervenci membrány. Posttransfuzní přežití uskladněných červenýchrvinek má vztah k integritě membránových funkcí, jak to vyplývá z významné korelace mezi životností in vivo opětně infuzovaných červenýchrvinek, tak z měření poměru mezi povrchem a objemem. Hlavním účastníkem výstavby membrány a její funkce je cytoskeletonová síť (Marchesi, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1, 531 - 536, 1985) - supramolekulární proteinová organizace ležící pod vnitřním listem (hemileaflet) membrány RBC. Wolfe, et al. v průzkumné studii o složení a funkci cytoskeletálního membránového proteinu uskladněných buněk zjistili, že jedinou relevantní změnou bylo snížení schopnosti spektrinu asociovat se s aktinem a to ať už v přítomnosti nebo nepřítomnosti proteinu 4.1 (Wolfe, et al., *J. Clin. Invest.*, 78, 1681 - 1686, 1986). Ukázali jsme, že L-karnitin ovlivňuje deformabilitu proteinu 4.1 membrány RBC obsahující uvolněné stínové (ghosts) látky podrobené zvýšené stříhové zátěži. Arduini, et al., *Life Sci.*, 47, 2395 - 2400, 1990. L-karnitin může uplatňovat stabilizační vliv na membránu přes interakci spektrinu s jednou

nebo více cytoskeletálními složkami. Poslední studie interakce spektrinu a aktinu v červených krvinkách Butterfielda a Rangachariho, *Life Sci.*, 52, 297 - 303, 1992 ukázaly metodou elektronové paramagnetické rezonance, že L-karnitin značně snižuje segmentový pohyb označených spinových poloh spektrinu.

Vedle potenciální biofyzikální činnosti popsané výše, může být navíc pozorované zlepšení u buněk červených krvinek uskladněných s LC výsledkem příznivého metabolického procesu. Deacylačně-reacylační cyklus membránových fosfolipidů vyžaduje běžně ATP nebo regeneraci acyl-CoA. Acylový zbytek acyl-CoA je potom převeden na lysofosfolipidy lysofosfolipid acyl-CoA transferázou. Během oxidativního čelenžování probíhá navíc proces rekonstrukce fosfolipidů RBC membrány stejnou metabolickou cestou. Poslední zjištění ukázala, že CPT ovlivňuje reacylační proces membránových fosfolipidů v buňkách červených krvinek a neuronálních buňkách modulací velikosti acyl-CoA poolu mezi aktivačním stupněm mastné kyseliny a jejím přenosem do lysofosfolipidů. Arduini, et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 12673 - 12681, 1992. Studie pulse-chase a vyčerpání ATP navíc ukázaly, že acylkarnitinový pool červených krvinek slouží jako rezervoár aktivovaných acylových skupin a nikoliv ATP. Arduini, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187, 353 - 358, 1994.

Vyšší 24 hodinové procento obnovy a cirkulační životnost představují zlepšení přibližně 15% v měřítku potence (množství transfuzních

cirkulujících RBC dostupných pro příjemce krát průměrná životnost). Tento vzestup potence je možno klinicky přeložit jako snížení transfuzních požadavků u pacientů vyžadujících chronické transfuze jako je tomu u thalassemiků nebo u pacientů s poruchami tvorby kostní dřeně. Je také alternativně možné prodloužení skladovatelnosti uskladněných kapalných RBC.

Naše zjištění předpokládají, že přítomnost L-karnitinu v ochranném mediu během uskladnění RBC může být úsporná pro činnost ATP poolu využívajícího recyklace fosfolipidů k rekonstrukci membrány. Tento příznivý metabolický proces spojený s možnou prospěšnou biofyzikální činností tak může vysvětlit snížení hemolýzy, vyšší hladinu ATP a zlepšenou obnovu a přežívání červených krvinek uskladněných s LC in vivo.

Ozařování

Problém kontaminace krevních produktů včetně krve, RBC, PC a podobných bakteriemi nebo dalšími mikrobiálními činidly nebo viry je možno podstatně snížit ozařováním. Úroveň ozáření nutná k sterilizaci a důkladné 100 % mortalitě výše uvedených kontaminantů byla dostatečně probádána.

Důležitější je, že leukocity mohou být podobně ozařováním zničeny. Lze používat různé způsoby ozařování včetně gama záření (Kobalt GG,

van de Graafův akcelerátor), UV záření, ozařování (infra?)červeným ozařováním, atd. Dostatečnou dávkou je ekvivalent 20 až 50 cG gama záření.

Celosvětově se ročně při transfuzní podpoře různých kategorií pacientů odebere a použije mezi 60 a 80 miliony transfuzních konzerv. V méně vyvinutých zemích je poměr odběrů na 1000 obyvatel nižší a většina krevních transfuzí se provádí u porodnických a pediatrických případů, zvláště při malárii a s ní spojenou anemií. Ve vyspělých zemích je počet odběrů na 1000 obyvatel 50 až 10 krát vyšší a většina transfuzí se využívá pro pacienty při chirurgických zákrocích (50 %) nebo pro pacienty s nádory ve spojení s anemií, transplantací kostní dřeně a s nemaligním gastrointestinálním krvácením (obrázek 1). Existuje mnoho potenciálních nepříznivých účinků spojených s transfuzemi allogenní krve. Jednou ze zvláštních komplikací nepříznivě spojenou s krevní transfuzí je vzácná a obvykle fatální entita spojená s transfuzí známá jako porucha z příjmu transplantátu hostitelem (graft versus host disease - TA-GVHD), což je komplikace způsobená allogenními imunocyty.

Onemocnění TA-GVHD je vzácnou komplikací krevní transfuze vyskytující se potenciálně u dvou typů příjemců krevní transfuze. TA-GVHD má mortalitu dosahující až 100 % a prevencí je pouze účinný včasný zákrok. Prvním typem jsou imunokompromisní pacienti jako jsou pacienti po transplantaci kostní dřeně nebo jiných orgánů, s Hodgkinsovou chorobou nebo vrozenou nedostatečností imunitního systému. Druhým typem jsou

neimunokompromisní pacienti, u nichž existuje příbuznost HLA mezi dárce a příjemcem. To se často vyskytuje u dárce z blízkého příbuzenstva nebo u populace s omezenějším HLA polymorfizmem jako tomu je v Japonsku nebo Izraeli. Na základě tohoto zjištění je univerzální praktikou ozařování krevních produktů gama zářením o střední dávce přibližně 25 centigray (cG) za účelem odbourání replikační schopnosti životaschopných imunocytů. Je však nutno poznamenat, že TA-GVHD je spojena s čerstvými buněčnými produkty, tj. obecně čerstvějšími než 15 dnů. K předcházení této komplikaci však přesto není „stárnutí“ krve přijatou praxí. Přestože jsou imunocyty součástí populace s allogenními leukocyty, není stupeň leukodeplece dosahovaný běžně filtrací do třetí generace dostatečnou zárukou pro prevenci této komplikace. Gama záření zůstává proto až dosud jediným přijatelným profylaktickým zákrokem.

Potíž s ozařováním červených krvinek spočívá zvláště v potenciálním poškození buněčné membrány. Je jasné, že ozařování touto dávkou způsobuje ztráty potence přibližně 7 až 8 %, jak bylo zjištěno měřením poklesu ATP v červených krvinkách in vitro, zvýšenou hemolýzu a zvýšený obsah draslíku v supernatantu. Tyto změny jsou konzistentní s efektem poškození membrány. Tyto změny in vitro jsou při ozařování gama zářením spojeny se snížením 24 hodinové obnovy červených

krvinek. Co se týká produktů s krevními destičkami, byly také uveřejněny zprávy o ztrátě jejich životnosti.

Značný počet důkazů ukazuje, že gama záření způsobuje tvorbu aktivovaných kyslíkových produktů jako je atomární kyslík, hydroxylový radikál a peroxidový aniont. Tyto radikály způsobují intracelulární poškození DNK, čímž zabraňují replikaci buněk nezbytných při TA-GVHD. Ty samé kyslíkové radikály však mohou oxidovat membránové lipidy červených krvinek a možná i membrány destiček, včetně membránových lézí, které snižují kvalitu (potenci) buněčného produktu.

Je známo, že L-karnitin hraje klíčovou roli při transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem mitochondriální membránou. Dědičné poruchy, u kterých jde o poruchu karnitinového systému při transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, mají za následek značné poškození funkce kosterního svalstva. V poslední době se projevil velký zájem o úlohu L-karnitinu v membráně červených krvinek. Překvapujícím bylo, že červené krvinky postrádají mitochondrie a značnou kuriozitou je přítomnost L-karnitinu a karnitin palmitoyl transferázy, enzymu zúčastňujícího se reverzibilní acylace L-karnitinu. Zpočátku nebylo jasné, jakou to může v červených krvinkách hrát úlohu. Červené krvinky mohou být podrobeny během svého dlouhého životního cyklu in vivo oxidační zátěži a

rekonstrukce oxidovaných membránových lipidů včetně L-karnitinu může být důležitá pro normální přežití červených krvinek.

Rychlý časový vzestup hladiny acylovaného karnitinu, kdy vzrůstá dostupnost ATP, může působit jako rezervoár aktivovaných mastných kyselin, které mohou být následně použity pro rekonstrukční mechanismy pro poškozené oxidované membránové lipidy. Takové vysvětlení dobře objasňuje snížení hemolýzy pozorované během uskladnění výše uvedených červených krvinek in vitro a navíc může vysvětlovat zlepšení obnovy a přežívání pozorovaná in vivo. Častým výsledkem přidavku L-karnitinu je přibližně 17 % zvýšení potence.

L-karnitin nebo výše uvedené alkanoyl-L-karnitiny mohou být použity k odstranění nebo prevenci membránových lézí způsobených ozařováním. To nastává pro schopnost červených krvinek uskladněných s karnitinem rekonstruovat oxidované membránové lipidy in vitro.

K omezení citlivosti krevních produktů (RCC, PC a podobných) k membránovým lézím a hemolýze, mohou být krevní produkty nejprve suspendovány v roztoku obsahujícím L-karnitin nebo výše uvedené alkanoyl-L-karnitiny v množství 0,25 mM až 50 mM. Odolnosti buněčné membrány a potlačení hemolýzy je dosaženo v dostatečném stupni, aby mohl být produkt ozařován za účelem sterilizace a následně mu byla prodloužena skladovací doba a poločas cirkulace během transfuze. Lze tak dosáhnout životnosti řádu běžné životnosti pomocí látek, které mohou být s jistotou považovány za sterilní a s nepravděpodobnou možností

zavlečení TA-GVHD, vlivem ozáření po zapečetění suspenze krevního produktu. Je nutno zdůraznit, že termín krevní produkt v tomto smyslu je nutno interpretovat širěji a zahrnuje krev, krevní plazmu, RCC, PC, směsi a podobně.

K potvrzení faktu, že přídavek L-karnitinu k přípravkům s červenými krvinkami, které se mají ozařovat gama zářením k jejich sterilizaci nebo odbourání imunocytů s následným skladováním zlepšujícím přežívání červených krvinek, byly provedeny dále uvedené zkoušky.

Materiály a metody

Systém skladování krve. Byly použity standardní čtyřhrané krevní kontejnery CP2D/AS-1 (Baxter, Inc.) Do každého sáčku testované konzervy obsahující aditivní roztok AS-1 bylo přidáno 245 mg komplexní sole L-karnitinu (LC) rozpuštěné v 1,1 ml čistého apyrogenního fyziologického roztoku k docílení konečné koncentrace 5 mM. Do kontrolních konzerv bylo přidáno k roztoku AS-1 1,1 ml fyziologického roztoku za stejných podmínek.

Odběr a zpracování. Bylo použito standardní metody odběru ze žíly s odběrem přibližně 450 ± 50 ml krve. Krevní konzerva byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu 4 až 8 hodin. Dále byla tato dávka za standardních podmínek zcentrifugována (viz: Heaton, W.A., et al., Vox sanguinis, 57, 37 - 42, 1989) a po zcentrifugování supernatantová plazma odstraněna a sedimentační koláč červených krvinek (RBC)

resuspendován ve standardním roztoku AS-1 (kontrolní) nebo v LC obsahujícím roztok AS-1 (zkouška).

Skladovací podmínky konzerv RBC a ozařování gama zářením. Konzervy se suspendovanými RBC (kontrolní i zkušební) byly uskladněny při 1 až 6°C po dobu 14 dnů a potom ozářeny dávkou 25 cG gama záření. Po tom následovalo uskladnění konzerv RBC při 1 až 6°C až do 42. dne.

Měření in vitro. Měření na vzorcích byla prováděna před (0. den) a po (42. den) skladování včetně stanovení hemoglobinového supernatantu a středního objemu částic (MCV). To bylo provedeno standardními postupy popsány v publikaci Heatona, et al., supra.

Statistická analýza. Velikost vzorku je odvozena od předchozích hodnot týkajících se variací v hemoglobinu supernatantu. Celkově bylo použito 94 konzerv RBC, po 47 v každé řadě (kontrolní a zkoušené). Analýza rozložení dat pro plazmový hemoglobin ukazuje značnou asymetrii a velkou šířku pásma hodnot (8 až 10). Proto byla data analyzována neparametrickými testy na medián softwarovým programem (Epistat, Richardson, TX).

Výsledky

Po zpracování všech krevních konzerv byly vlastnosti konzerv RBC před uskladněním podle předpokladů. V supernatantovém hemoglobinu a MCH nebyly zjištěny žádné odchylky mezi kontrolními konzervami a konzervami RBC obsahujícími LC (tabulka A). Na konci skladování (42. den) vykazovaly vzorky RBC ozářené gama zářením značné rozdíly mezi

kontrolními konzervami a konzervami obsahujícími LC (viz hodnoty p v tabulce A). U zkušebních vzorků v porovnání s kontrolními konzervami RBC byla pozorována zvláště nižší hemolýza. Hodnota MCV konzerv RBC obsahujících LC byla nižší než u kontrolních.

Výše uvedené zkoušky ukazují, že produkty červených krvinek před skladováním ozářené zářením gama jsou chráněny před poškozením přidavkem L-karnitinu k těmto červeným krvinkám.

Tabulka A

	0. DEN			42. DEN		
	kontrolní	L- karnitin	p	kontrolní	L- karnitin	p
MCV (fl)	91,2	90,7	0,46	100,2	97,5	0,006
Plasmatický Hb mg.dl ⁻¹	11,8	11,5	0,58	495	382	0,05

Předložený vynález byl popsán jak v obecné formě, tak s odkazy na specifické příklady. Odchyly odborníky napadnou bez zkoušení výzkumného rázu. Zvláště lze alternativně upravovat stabilizační přípravky, ochranné přípravky krevních produktů, inhibitory a podobně bez výzkumných zkoušek. Od dárce k dárci a od příjemce k příjemci se navíc budou měnit specifické koncentrace, životnosti a cirkulační poločas. Takovéto odchyly zůstávají v rozsahu vynálezu, pokud to není specificky vyloučeno zněním patentových nároků dále uvedených.

Tabulka 1. Charakteristiky koncentrátů červených krvinek před uskladněním.

	Kontrolní	Zkouška (L-karnitin)
Objem konzervy (ml)	305 ± 38	295 ± 41
Uni: He (Jo)	60 ± 3	60 ± 3
WBC (x 10 ⁹)	2,6 ± 1,1	2,4 ± 1,1
ATP (μmol.g ⁻¹ Hb)	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,4
Hb v supernatantu (mg.dl ⁻¹)	34 ± 15	26 ± 8
K ⁺ v supernatantu (mekv.l ⁻¹)	23 ± 0,2	2,2 ± 0,3
Osmotická fragilita (%)	50 ± 4	49 ± 4

Tabulka 2. Charakteristiky koncentrátů červených krvinek po uskladnění (42 dnů).

	Kontrolní	Zkouška (L-karnitin)
Parametry in vitro		
Glukoza (mg.dl ⁻¹)	208 ± 33	193 ± 40
Laktát (mg.dl ⁻¹)	201 ± 27	199 ± 37
pH	6,33 ± 0,03	6,32 ± 0,04
ATP (μmol.g ⁻¹ Hb)	3,01 ± 0,42	3,24 ± 0,38*
Hemolýza (%)	0,47 ± 0,41	0,30 ± 0,22*
K ⁺ v supernatantu (mekv.l ⁻¹)	61 ± 4	60 ± 3
Osmotická fragilita (%)	51 ± 3	50 ± 4
Morfologický zlomek	69 ± 8	68 ± 15
Parametry in vivo		
24 hodinová obnova (jednou značené)	81,1 ± 6,2	84,0 ± 4,4
24 hodinová obnova (dvojnásobně značené)	80,1 ± 6,0	83,9 ± 5,0*
Objem RBC (ml)	1634 ± 510	1591 ± 534
Životnost (dnů)	85,9 ± 14,3	96,1 ± 11,2*

* (p < 0,05)

Patentové nároky

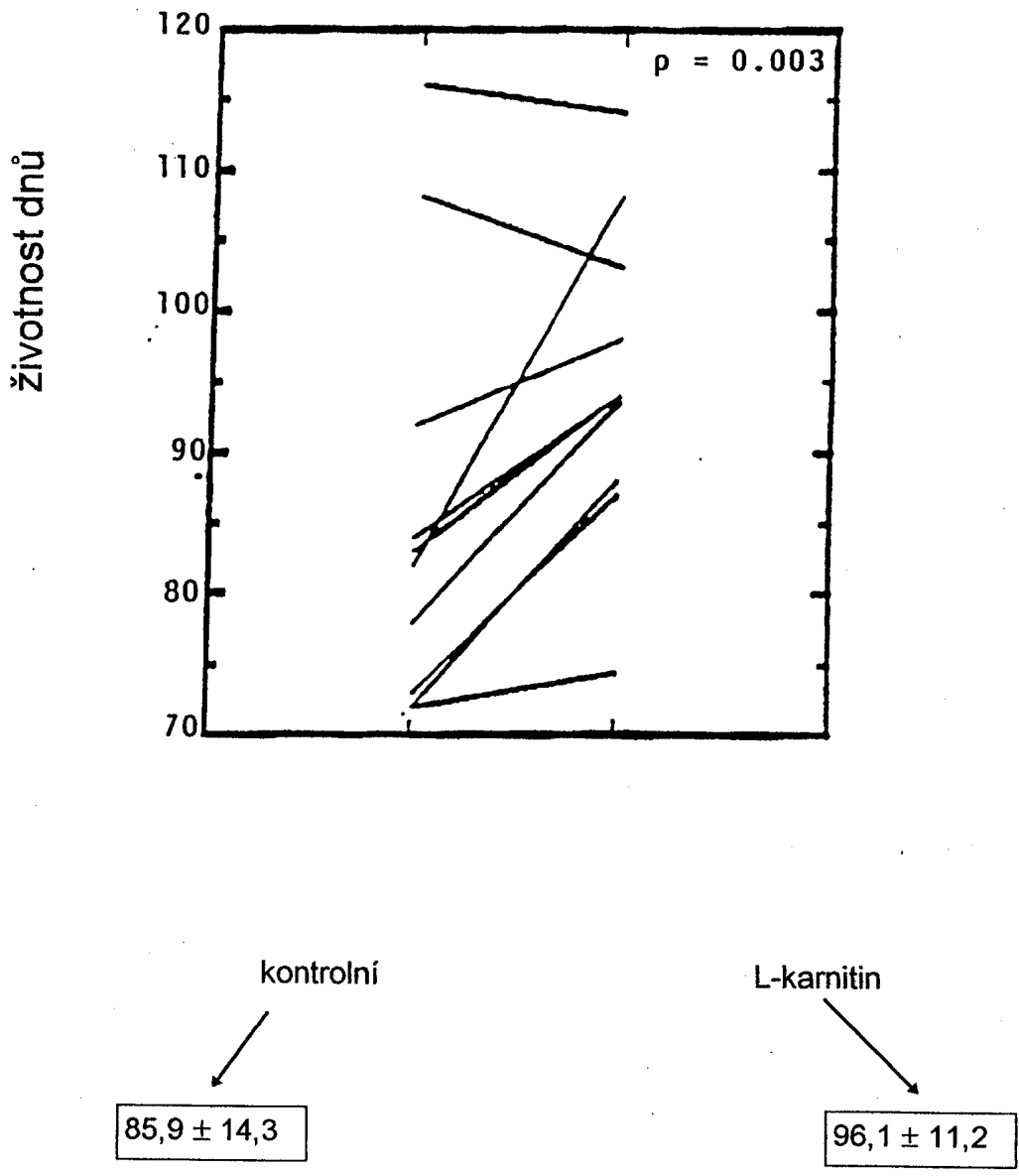
1. Způsob zlepšení odolnosti membrány a potlačení hemolýzy při uskladnění koncentrátů červených krvinek (RBC) nebo destiček (PC) vyznačující se tím, že se koncentrát červených krvinek (RBC) nebo destiček (PC) suspenduje v podpůrném roztoku, podpůrný roztok obsahuje karnitinový produkt vybíraný ze skupiny sestávající z L-karnitinu, alkanoyl-L-karnitinů nebo jejich farmakologicky přijatelných solí a jejich směsí v účinném množství potřebném pro zlepšení odolnosti membrány jmenovaných RBC nebo destiček a tím k potlačení hemolýzy, v porovnání s identickými podpůrnými roztoky bez jmenovaného L-karnitinu, alkanoyl-L-karnitinů nebo jejich farmakologicky přijatelných solí a jejich směsí.
2. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že L-karnitin, alkanoyl-L-karnitin a jejich směsi jsou přítomny v množství 0,25 až 50 mM.
3. Způsob podle nároku 2 vyznačující se tím, že jmenovaný L-karnitin, alkanoyl-L-karnitin a jejich směsi jsou přítomny v množství 1 až 20 mM.
4. Zapečetěné kontejnery RBC v podpůrném roztoku, vyznačující se tím, že jmenovaný podpůrný roztok obsahuje L-karnitin, alkanoyl-L-karnitin a jejich směsí v množství 0,25 až 50 mM.
5. Zapečetěný kontejner PC ve stabilizačním roztoku, vyznačující se tím, že stabilizační roztok obsahuje L-karnitin, alkanoyl-L-karnitiny a jejich směsí v množství 0,25 až 50 mM.

6. Zapečetěný kontejner podle nároku 4 vyznačující se tím, že jmenovaný kontejner se po zapečetění ozařuje za účelem důkladné sterilizace a zničení v něm obsažených leukocytů.
7. Kontejner podle nároku 5 vyznačující se tím, že se jmenovaný kontejner po zapečetění ozařuje za účelem důkladné sterilizace a zničení v něm obsažených leukocytů.
8. Způsob důkladné sterilizace krevních produktů vybíraných ze skupiny sestávající z krve, plazmy, RBC, PC a jejich směsí obsahujících jmenované suspendované krevní produkty v podpurném roztoku, vyznačující se tím, že podpurný roztok obsahující LC v množství 0,25 až 50 mM se po zapečetění těchto produktů v kontejneru ozařuje.
9. Způsob úpravy krevních produktů vybíraných se skupiny sestávající z krve, plazmy, RBC, PC a jejich směsí za účelem potlačení v nich obsažených leukocytů, vyznačující se tím, že se ozařují v podpurném roztoku obsahujícím LC v množství 0,25 mM až 50 mM tak, aby se důkladně zničily leukocyty ve jmenovaném vzorku při potlačení poškození membrán řečených krevních produktů.
10. Způsob zlepšení odolnosti membrány a potlačení hemolýzy při uskladnění červených krvinek (RBC) nebo koncentrátů destiček (PC) s jejich předchozím ozařováním za účelem zničení v nich obsažených imunocytů vyznačující se tím, že se RBC nebo PC suspendují v podpurném roztoku, který obsahuje karnitinové produkty

vybírané ze skupiny sestávající z L-karnitinu, alkanoyl-L-karnitinu a jejich směsí v takovém účinném množství, aby se zlepšila schopnost jmenovaných RBC nebo PC udržet odolnost membrány jmenovaných RBC nebo destiček a tím potlačit hemolýzu v porovnání s identickými podpůrnými roztoky neobsahujícími jmenovaný L-karnitin, alkanoyl-L-karnitiny a jejich směsí.

11. Způsob podle nároků 1, 2, 3, 8, 9 a 10 vyznačující se tím, že alkanoyl L-karnitin se vybírá ze skupiny sestávající z acetyl-, propionyl-, butyryl-, isobutyryl-, valeryl- a isovaleryl-L-karnitinu.
12. Zapečetěný kontejner podle nároků 4 až 7 vyznačující se tím, že alkanoyl-L-karnitin se vybírá ze skupiny sestávající z acetyl-, propionyl-, butyryl-, isobutyryl-, valeryl- a isovaleryl-L-karnitinu.

Obrázek 1



Obrázek 2.

