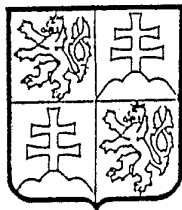


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277138

(21) Číslo přihlášky : 5435-90

(22) Přihlášeno : 06.11.90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 61 K 35/14

(40) Zveřejněno : 13.05.92

(47) Uděleno : 30.09.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(73) Majitel patentu : Masarykova nemocnice s poliklinikou III. typu, Ústí nad Labem, CS

(72) Původce vynálezu : Rahm Jan RNDr. PhMr., Ústí nad Labem, CS;
Dlouhá Jiřina, Ústí nad Labem, CS;
Chmelíková Vlasta, Ústí nad Labem, CS;
Šebesta Stanislav PharmDr., Ústí nad Labem, CS;
Procházka Vladimír RNDr. CSc., Praha, CS

(54) Název vynálezu : Způsob průmyslové výroby přenosového faktoru

(57) Anotace :

Řeší se průmyslová příprava přenosového faktoru ze zvířecí krve nebo z krevních elementů této krve, která spočívá v hemolyse erytrocytů přítomných v krvi nebo krevních elementech, v odstředění buněčných stěn erytrocytů a neporušených leukocytů na velkokapacitní průtokové odstředivce, v promytí sedimentu během odstředění a následné desintegraci leukocytů ultrazvukem nebo dekompresí v dusíku. Vzniklá suspence zbytků krevních buněk se přímo ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10.000, ultrafiltrát obsahující směs nízkomolekulárních peptidů a nukleotidů se sterilizuje pomocí sterilizační membrány a lyofilisuje nebo použije přímo jako léčivá forma. Přenosový faktor je imunomodulátor používaný při léčení vrozených nebo získaných poruch imunitního systému, bakteriálních i virových infekcí a nádorových onemocnění.

Vynález se týká způsobu průmyslové výroby přenosového faktoru z leukocytů přítomných ve zvířecí krvi nebo v krevních elementech této krve.

Přenosový faktor nebo též transfer faktor (TF), případně podle přesnější terminologie dialysovatelný leukocytární extrakt (DLE), je imunomodulační preparát, nesoucí řadu imunologických aktivit závislých i nezávislých na antigenu. Je-li připraven z leukocytů (dále Le) dárců imunisovaných příslušným antigenem, je schopen přenášet imunitní reakci na tento antigen na neodpovídajícího příjemce (TF aktivita).

Klinicky se používá k léčení vrozených nebo získaných poruch buňkami zprostředkované imunity, při různých bakteriálních nebo virových infekcích a při terapii nádorových onemocnění. Podává se ve formě injekcí nebo perorálně.

Přenosový faktor je směs nízkomolekulárních peptidů a nukleotidů, získaná extrakcí Le imunisovaných dárců nebo dárců s dobře fungujícím imunitním systémem. Kritériem koncentrace TF je jedna mezinárodní jednotka (MJ), definovaná jako extrakt obvykle z $5 \cdot 10^8$ Le. Výchozím materiálem pro přípravu je většinou lidská krev.

Nejčastější způsob přípravy TF spočívá v tom, že se bílé krvinky obsažené v buffy coatu (dále BC, což je leukocyty obohacená frakce krevních buněk získaná odstředěním krve obsahující konservační roztok) rozruší střídavým zmražením a rozmražením (J. F. Raymond se sp., Vox Sang. 29, 338, 1975; Brit. patent č. 1443948). Zbytky krevních buněk se buď odstředí při 20 000 G a supernatant se dialysuje do destilované vody, nebo se k dialyse použije přímo desintegrováný BC. Dialysu lze nahradit ultrafiltrací přes membránu s vylučovacím limitem 10 000. Dialysát nebo ultrafiltrát se většinou lyofilisuje a před použitím se rozpouští ve vodě pro injekce.

Příprava TF přes svoji jednoduchost skrývá některé technologické obtíže, které se zvýrazní při jejím převodu do produkčního měřítká.

Velká spotřeba preparátu v humánní i veterinární medicíně vyvolala na jedné straně nutnost hledat dostupnější zdroje leukocytů než je lidská krev a na straně druhé nutnost vyrovnat se s dalšími technologickými problémy, spojenými s velkokapacitní výrobou TF. Jako výchozího materiálu se začalo používat živočišné krve (prasečí - Jap. patent č. 56115-720, dále pak hovězí, koňské, kachní atd.), případně i lymfatických orgánů. Použití krve jako zdroje Le má řadu důležitých výhod, mimo jiné umožňuje imunisaci dárců. Naproti tomu mohou být lymfatické orgány kontaminovány různými toxickými látkami (např. z potravy), přecházejícími do konečného produktu.

Základním technickým problémem průmyslové výroby TF je ekonomická příprava velkého množství koncentrované suspense bílých krvinek. Přenosový faktor připravuje z buffy coatu savčí krve. BC se dá snadno získat odstředěním krve v diskontinuálních (kyveto-

vých) odstředivkách, kdy tvoří úzké rozhraní mezi vrstvami plasmy a erytrocytů (dále Ery). Kapacita rotorů těchto odstředivek je však malá, maximálně 6 litrů, což je důvodem nepoužitelnosti BC jako výchozího materiálu pro průmyslovou výrobu TF.

Stejně tak je z kapacitních i ekonomických důvodů nevyhovující izolace Le protiproudou centrifugací (elutrací), případně pomocí různých průtokových separátorů buněk používaných např. při leukaferese.

Isolace Le sedimentací krevních buněk za přídavku polyelektrolytů, která by se snadno dala převést do většího měřítka, vede k malým výtěžkům Le, nehledě na to, že přítomnost zbytků vysokomolekulárních koagulantů Ery v suspensi komplikuje následnou ultrafiltraci.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob průmyslové výroby přenosového faktoru ze zvířecí krve nebo z krevních elementů této krve, jehož podstata spočívá v tom, že se Ery přítomné v krvi nebo v krevních elementech hemolysují v hypotonickém prostředí, leukocyty a zbytky erytrocytů se odstředí v průtokové odstředivce, načež se Le v sedimentu po promytí destilovanou vodou desintegrují ve vodě, poté se vzniklá suspence ultrafiltruje a po sterilisaci průchodem přes sterilizační membránu se ultrafiltrát lyofilisuje nebo použije přímo jako léčivá forma.

Způsobem podle vynálezu se leukocyty desintegrují ultrazvukem nebo dekompresí v dusíku a vzniklá suspence se ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10 000.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se Ery ze zvířecí krve nebo z jejích elementů hemolysují v hypotonickém prostředí destilované vody. Le se odstředí v průtokové odstředivce, přičemž extrakt hemolysovaných Ery, především hemoglobin, odchází z odstředivky jako lehká fáze a sediment tvoří Le se zbytky Ery. Sediment se za chodu odstředivky promyje destilovanou vodou a Le se ve vodné suspensi desintegrují ultrazvukem nebo dekompresí v dusíku. Suspence rozrušených krevních buněk se ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10 000. Ultrafiltrát se sterilisuje membránovou filtrací a lyofilisuje, nebo použije přímo jako léčivá forma.

Způsob podle vynálezu má tyto výhody:

1. Hemolysou Ery v krvi nebo v krevních elementech vznikne dvousložkový systém, představovaný na jedné straně neporušenými Le a zbytky Ery, na druhé straně kapalinou tvořenou extraktem z Ery. Tento dvousložkový systém umožňuje průmyslovou izolaci Le jejich odstředěním na velkokapacitních průmyslových odstředivkách.
2. Lze připravit velká kvanta dostatečně koncentrované suspence promytých leukocytů, takže výsledný produkt obsahuje značné množství biologicky účinných látek - peptidů a nukleotidů - v malém objemu. Příznivým důsledkem této skutečnosti je snadná lyofilisace konečného produktu.

3. Sedimentované Le se při desintegraci pravidelně rozptýlí v celém objemu extrakční kapaliny, čímž je umožněna jejich dokonalá extrakce.
4. Suspensi rozrušených Le a Ery lze přímo, bez dalších úprav, ultrafiltrovat přes membránu s vylučovacím limitem 10 000. Není tedy nutná ani dialýsa, ani filtrace nebo odstředění stěn krevních buněk.

Způsob podle vynálezu je blíže objasněn příklady provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Objem 10 l prasečí krve konservovaný přídatkem 1 500 ml konservačního roztoku ACD (roztok 42,67 g citronanu sodného, 14,93 g kyseliny citronové a 40,00 g glukosy v redestilované vodě o výsledném objemu 1 000 ml) se zředí 190 l destilované vody a odstředí v průtokové odstředivce při zrychlení 1 500 G a průtoku 100 l/hod. Sediment se promyje za chodu odstředivky celkem 20 l destilované vody při stejném průtoku. Získá se 1 200 ml sedimentu, který se suspenduje v 1 200 ml vody a desintegruje ultrazvukem tak dlouho, až suspence při mikroskopické kontrole neobsahuje neporušené leukocyty. Suspence, tvořená stěnami krevních buněk v extraktu leukocytů, se přímo, bez dalších úprav, ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10 000. Ultrafiltrát se sterilisuje filtrací přes sterilizační membránu. Získá se 2 350 ml sterilního ultrafiltrátu, který obsahuje celkově 400 mg nukleotidů a 1 120 mg peptidů.

Výtěžek je 170 MJ přenosového faktoru.

Příklad 2

Objem 5 l krevních elementů, získaných odstředěním konservované prasečí krve v průtokové odstředivce, se zředí přídatkem 45 l destilované vody a vzniklá suspence leukocytů se odstředí v průtokové odstředivce za stejných podmínek jako v příkladu 1. Sedimentované leukocyty a zbytky erytrocytů se promyjí za chodu odstředivky celkem 10 l destilované vody. Získá se 1 080 ml sedimentu, který se suspenduje v 1 080 ml vody a desintegruje dekompresí v dusíku za mikroskopické kontroly jako v příkladu 1. Vzniklá suspence stěn krevních buněk se ultrafiltruje popsáním způsobem a získá se 2 100 ml sterilního ultrafiltrátu, který se lyofilisuje.

Výtěžek je 1 324 mg lyofilisátu, odpovídajícího 158 MJ přenosového faktoru.

Obsah nukleotidů je 331 mg, peptidů 993 mg.

Obsah peptidů a nukleotidů v TF se stanoví spektrofotometricky v UV oblasti v rozmezí 200 až 300 nm. Kvalitativní složení přípravku se kontroluje gelovou filtrací na dextranovém gelu, např. typu Sephadex G-25.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob průmyslové výroby přenosového faktoru, vyznačující se tím, že se erytrocyty ve zvířecí krvi nebo v krevních elementech této krve hemolysují v hypotonickém prostředí, načež se neporušené leukocyty se zbytky erytrocytů odstředí v průtokové odstředivce, leukocyty přítomné v sedimentu se po jeho promytí desintegrují ve vodě, vzniklá suspense se ultrafiltruje, poté se ultrafiltrát sterilisuje pomocí sterilizační membrány a sterilní ultrafiltrát se lyofilisuje nebo použije přímo jako léková forma.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se leukocyty desintegrují ultrazvukem nebo dekompresí v dusíku.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že se desintegrací vzniklá suspense ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10 000.

Konec dokumentu
