



(12)

BREVET DE INVENTIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 148929

(22) Data de depozit: 09.12.91

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
29.03.96 BOPI nr. 3/96(45) Data eliberării și eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.(61) Perfecționare la brevet:
Nr.(62) Divizată din cererea:
Nr.(86) Cerere internațională PCT:
Nr.(87) Publicare internațională:
Nr.(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0239859 A₁

(71) Solicitant: OCTAPHARMA A.G., Glarus, CH

(73) Titular: (71)

(72) Inventatori: Horst Schwinn, Dieter Wolter, DE

Mandatar: Cabinet Enpora - Pop, București, RO

(54) Procedeu pentru prepararea plasmelor sanguine, neinfecțioase

(57) **Rezumat:** Procedul conform invenției constă în aceea că plasma sanguină, congelată, se dezgheață la 20 ... 30°C, se aduce la pH = 7,0 ... 7,4 și se tratează cu amestec de tri-N-butilfosfat:triton:apă, se adaugă 10%, din volum, lipide compatibile biologic alese dintre ulei de soia și/sau ulei de ricin, se centrifughează, se filtrează

prin materiale hidrofobe, micronizate și apoi se cromatografiază cu fază inversată, pe un derivat de octadecil C₁₈ cu verificarea pH-ului care trebuie să fie 7,0 ... 7,4, se filtrează steril și apoi se liofilizează în mod cunoscut.

Revendicări: 1

RO 110678 B1



Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru prepararea plasmelor sanguine neinfecțioase, folosită în medicina umană și având o multitudine de indicații.

Este cunoscut că plasma sanguină este obținută, prin separarea celulelor sanguine, din masa de sânge, care a fost preluată de la donatori. Pentru a evita infecțiile pacienților, cu agenți patogeni, cum ar fi virusul de hepatită și HIV, plasma a fost obținută de la donatori individuali, care au putut fi considerați ca fiind sănătoși din punct de vedere al absenței virusurilor, și în urma unei perioade de observație de lungă durată. Un amestec de plasmă de la mai mulți donatori a fost exclus.

Dezavantajul acestui procedeu este cheltuiala enormă, ce trebuie făcută, ca urmare a preparatelor individuale. Un mod de lucru continuu nu este posibil cu tehnicile de lucru, din prezent. În acest mod condiționat de aceasta, intră în considerație un dezavantaj suplimentar. Este posibilă doar cu o cheltuielă mare, aproape prohibitivă, să se obțină preparate de plasmă, care să fie standardizate. În situația că este condiționat prin pregătirea singulară, acesta variază, de exemplu, prin conținutul de proteine din fracțiunea donată. De aceea, este necesar să se ia în considerație, la întrebuițarea plasmelor preparate prin prelucrarea singulară, de fiecare dată, conținutul actual de proteine, al șarjei respective.

Este posibil să se inactiveze virusurile prin adaosuri de substanțe chimice. O mare problemă o pune îndepărtarea mediilor utilizate pentru inactivarea agenților infecțioși. Conform unor procedee cunoscute din stadiul tehnicii, se utilizează pentru inactivarea virusurilor, substanțe care sunt detergente. O problemă mare constă, însă, în a extrage acești detergenți, după o inactivare reușită a virusurilor din plasmă. S-a încercat ca preparatele tratate cu detergenți să fie eliberate de aceștia, cu ajutorul unei cromatografii hidrofobe, cu inversare materială de faze.

Este cunoscut un procedeu pentru purificarea plasmelor din sânge, ce constă în extracția acesteia, cu un ulei natural de plante, cum ar fi uleiul de soia. Astfel, acest procedeu prevede aducerea materialelor biologice, care conțin produse chimice solubile în lipide, în

contact cu o cantitate suficientă de ulei mineral, care este extras dintr-o plantă sau animal sau cu un compus sintetic similar, după care se agită amestecul rezultat, când se separă o fază superioară și o fază inferioară, urmând sedimentarea și decantarea fazei superioare. Metoda este utilă pentru obținerea unei plasmă biologice, care este lipsită de virus.

Problema tehnică, care stă la baza acestei invenții, este găsirea unui procedeu continuu, pentru obținerea unor plasmă de sânge neinfecțioase. Problemele ce rezultă din aceasta se referă, printre altele, la un mod de lucru sigur pentru îndepărtarea detergenților care inactivează virusurile. Pentru aceasta, este de dorit, ca, încă de la prepararea lor, să se obțină asemenea preparate de plasmă cu un conținut de proteină, standardizat.

Se mai cunoaște un procedeu pentru îndepărtarea detergenților din plasma sanguină, prin cromatografiere hidrofobă, cu inversiune de faze, folosind o rețea de silicagel stratificată cu octadecil.

O altă problemă tehnică rezultă din faptul că substanțele purtătoare, alcătuite din silicat, folosite la cromatografiere cu inversare de faze, în timpul procesului de extracție, pierd, într-o mică măsură, stratificația lor. Părțile mici de silicat, nestratificate, astfel rezultate, activează totuși factorii de coagulare prezenți în plasma sanguină și conduc la perturbarea nedorită a acestora.

Procedeul conform invenției constă în aceea că plasma sanguină congelată se dezgheață la 20 ... 30°C, se aduce la pH 7,0 ... 7,4 și se tratează cu amestec de Tri-N-butilfosfat:Triton: apă, se adaugă 10%, din volum, lipide compatibile, biologic alese dintre ulei de soia și/sau ulei de ricin, se centrifughează, se filtrează prin materiale hidrofobe micronizate și apoi se cromatografiază cu fază inversată, pe un derivat de octadecil C₁₈ cu verificarea pH-ului care trebuie să fie 7,0 ... 7,4, se filtrează steril și apoi se liofilizează, în mod cunoscut.

Ca urmare, problemele tehnice care stau la baza invenției sunt rezolvate cu ajutorul unui procedeu combinat, pentru prepararea plasmelor sanguine, neinfecțioase, în care plasma este tratată cu tenside neionice, se adaugă lipide compatibile biologic înainte de separarea stratului de lipide, se separă faza de lipide și

tensidul neionic se îndepărtează, prin extracție în fază solidă, pe materiale hidrofobe.

Plasma sanguină poate proveni atât din preparate de plasmă proaspătă, cât și din fracțiuni congelate la temperaturi foarte scăzute. În acest caz, plasma congelată este dezghețată într-o baie de apă. Îndată ce s-a atins o anumită temperatură, care este de preferință 25°C, plasma este filtrată (dacă este cazul) și se controlează pH-ul soluției. Operația de dezghețare este condusă, de preferință, la o temperatură de 25°C, după care plasma este filtrată, iar operația de dezghețare se face pe o perioadă de timp de 1 ... 2 h, la un pH, de preferință, de 7,0 ... 7,4. Plasma sanguină, astfel obținută, este tratată, în continuare, cu un amestec de tenside neionice și apă distilată, la o temperatură de până la 20 ... 40°C, de preferință 30°C. Ca tenside neionice, intră în considerație în mod special Tri-N-butilfosfat (TNBF) și/sau Triton X - 100. Este avantajos să se trateze amestecul sub o ușoară agitare a amestecului, pe o anumită perioadă de timp și la o anumită temperatură ridicată. Înainte de faza de centrifugare, fracțiunea de lipide este îmbogățită cu alte lipide compatibile din punct de vedere biologic, cum ar fi, de exemplu, uleiurile obținute din plante și, în mod special, uleiul de soia și/sau uleiul de ricin. În faza următoare, fracțiunea de lipide este îndepărtată prin centrifugare. Este, însă, de asemenea, posibil ca fracția lipidică să fie separată de plasma sanguină, prin filtrare pe un filtru hidrofob. Într-o formă de execuție preferată, a procedurii ce face obiectul prezentei invenții, se adaugă circa 10% ulei obținut din plante. După centrifugare, se separă straturile de lipide și de plasmă. Preferabil, aceasta se poate realiza cu ajutorul unui sifon sau a unei centrifuge cu funcționare continuă și cu separare automată a fazelor. Stratul de plasmă este colectat, în timp ce stratul lipidic se îndepărtează din amestec. Apoi, dacă este cazul, urmează o fază de filtrare, în care restul de detergenți neionici, tratați, se îndepărtează din plasmă prin extracție în fază solidă. De preferință, materialul hidrofob pentru extracția în fază solidă, este materialul cunoscut din cromatografia cu inversiune de fază. Pentru aceasta, se folosește, de preferință, materiale

purătoare stratificate ca C₁₈, care își găsesc utilizarea, de asemenea, în cromatografia lichidă la presiuni ridicate. Ca material purtător, este utilizat printre altele, silicagelul care are totuși dezavantajul că întrerupe activarea factorilor în plasma sanguină, în lipsa unei stratificări, și astfel să conducă la distrugerea acestor factori. Acest efect nedorit poate fi preîntâmpinat, prin alegerea unor materiale purtătoare, care să corespundă scopului, cum ar fi, de exemplu, Sephacryl, Superose sau Fractogel^(R), TSK. Într-o fază de execuție, preferabilă, extracția în fază solidă poate fi realizată sub forma unei cromatografii. Raportul dintre volumul stratului și volumul plasmăi ce se prelucurează este de preferință 1:6 până la 1:20, și în mod preferabil în raportul de 1:10. După faza de extracție, dacă este cazul, se face un control al valorii pH-ului, și aceasta va fi ajustată la un pH de 7,0 până la 7,4. Urmează, apoi, o fază de filtrare solidă. În cazul în care se dorește, plasma sanguină este congelată și uscată, în prezența unui material ajutător de liofilizare, obișnuit și cunoscut, cum ar fi, de exemplu, lizina sau glicina.

Avantajul procedurii care face obiectul prezentei invenții este că permite să se renunțe la o prelucrare singulară, obișnuită, a plasmăi. Procedul este ușor de realizat la scară industrială și, în mod special, se poate realiza un mod de lucru continuu. Un avantaj suplimentar al procedurii ce face obiectul prezentei invenții, constă în aceea că, pe baza procedurii de fază continuă, condițiile pot fi astfel alese, încât produsul final să posede, de fiecare dată, concentrații de proteine identice sau cel puțin foarte asemănătoare. Acest fapt conduce la aplicarea clinică a preparatelor de plasmă sanguină, fără a pune probleme, în special, în cazul dozelor multiple, întrucât cantitatea de proteine schimbătoare, care rezultă la preparatele singulare, lipsește.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției: o cantitate de 20 l de plasmă sanguină (80 x 250 ml) este dezghețată în baia de apă, la o temperatură de 25°C și pe o perioadă de timp de 1,5 h. Dacă se dorește, după dezghețare, plasma este filtrată pe filtre de gaze sau pe cartușe filtrante, după care plasma se toarnă într-un vas de oțel inoxidabil, de 50 l, la temperatura de 30°C. Pentru

operația de agitare, se folosește un agitator cu alic. Valoarea pH-ului plasmăi deghețate se va controla mereu și se va stabili la o valoare de 7,0 până la 7,4, utilizând un acid clorhidric 0,5 N. Se prepară un amestec de TNBF, Triton X-100 și apă distilată, în limite de asociere, de preferință, de 0,5 până la 2: 0,5 până la 2: 2 până la 4. Pentru valorile arătate mai sus, s-au utilizat în mod special (preferențial) 200 ml TNBF, 200 ml Triton X-100 și 800 ml apă distilată. Amestecul este încălzit, de asemenea, la temperatura de 30°C, după care se adaugă, la plasmă, amestecul de tenside neionice. Amestecul se agită la temperatura de 30°C cu atenție, și după 4 h, se termină centrifugarea plasmăi. Centrifugarea, de preferință, se face la 4000 rot/min, la temperatura de 12°C și pe o perioadă de timp de o oră. Pentru a crește unitatea de fază lipidică, se adaugă, la amestecul de reacție și înainte de centrifugare, circa 10% (v/v) ulei de soia sau ulei de ricin. După centrifugare, se separă stratul de lipide și stratul de plasmă. Această separare se poate realiza cu ajutorul unui sifon sau prin filtrare pe un material hidrofob micronizat. Straturile de plasmă sunt colectate și apoi filtrate pe membrane filtrante și inerte la proteine. Se obțin 19 l de plasmă. Aceasta este preparată, folosind un adsorbant Prep C₁₈ sau adsorbant Pro RPC/HR 5/5. Cantitatea ce se obține se spală cu apă, de preferință 1,2 kg în 2,4 l de

apă. Cromatografia se realizează pe o coloană ce are un diametru de 15 cm, iar debitul de curgere este de 300 litri/minut. Eluentul obținut este controlat cu ajutorul unui motor cu raze UV. Frațiunea de plasmă care rezultă este colectată și adusă la o valoare a pH-ului de 7,0 până la 7,4 cu hidroxid de sodiu 0,5N. În continuare, plasma este filtrată pe un filtru cu membrană (0,22 m) steril și apoi congelată și uscată după care se toarnă în flacoane de capacitate de 250 ml.

Revendicare

Procedeu pentru prepararea plasmăi sanguine, neinfecțioase, prin tratare cu un detergent și un ulei natural, **caracterizat prin aceea că** plasma sanguină, congelată, se deghează la 20 ... 30°C, se aduce la pH = 7,0 ... 7,4 și se tratează cu amestec de Tri-N-butilfosfat:Triton X-100:apă în rapoarte de 0,5 ... 2:0,5 ... 2:2 ... 4, se adaugă 10%, din volum, lipide compatibile biologic, alese dintre ulei de soia și/sau ulei de ricin, se centrifughează, se filtrează pe materiale hidrofobe, micronizate și apoi se cromatografiază cu fază inversată, pe un derivat de octadecil C₁₈ cu verificarea pH-ului care trebuie să fie 7,0 ... 7,4, se filtrează steril și apoi se liofilizează, în mod cunoscut.

Președintele comisiei de examinare: **ing. Novac Maria**
Examinator: **farm. Pentelescu Elena**