



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

263615

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 35/16

(22) Přihlášeno 15 05 86

(21) PV 3520-86.R

(40) Zveřejněno 16 09 88

(45) Vydáno 14 08 89

(75)

Autor vynálezu

RYBÁK MIROSLAV ing. CSc., ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., ULRYCH STANISLAV RNDr.,
LOŠTICKÝ CYRIL RNDr. CSc., SEDLMAIER OLDŘICH, PRAHA

(54) Způsob zpracovávání krevní plazmy na její frakce

Řešení se týká způsobu zpracování lidské nebo zvířecí krevní plazmy nebo jejích frakcí na koncentráty antitrombinu III, proteinu C, koagulačních faktorů a dalších bílkovin, a to afinitní sorpcí na ekvilibrovaném polymerním nosiči s imobilizovaným heparinem a následující selektivní desorpcí, přičemž sorpce z výchozí suroviny se provádí na makroporézním sférickém sorbentu na bázi kopolymerů hydroxyalkylakrylátů nebo hydroxyalkylmetakrylátů se 2 až 4 atomy uhlíku v alkylovém zbytku. Řešení všestranně zlepšuje a ekonomizuje společensky významnou výrobu derivátů krevní plazmy.

Vynález se týká způsobu zpracování lidské nebo zvířecí krevní plasmy nebo jejích frakcí na koncentráty antitrombinu III, proteinu C, koagulačních faktorů a dalších bílkovin, afinitní sorpcí na ekvilibrovaném polymerním nosiči s imobilizovaným heparinem a následující selektivní desorpcí. Tyto složky krevní plasmy v podobě více či méně čistých koncentrátů jsou důležité při laboratorní diagnostice hemokoagulačních poruch, slouží k přípravě preparátů pro klinickou aplikaci a slouží k přípravě antigenů za účelem produkce antisér, proto jejich separace a purifikace má značný význam.

Využití lidských krevních bílkovin pro klinické účely je znesnadněno nebezpečím přenosu sérové hepatitidy, případně i choroby AIDS, pokud bílkovinu nelze zahřívát 10 h na teplotu 60 °C, dále pak komplikovaností a nízkou efektivností konvenčních preparačních metod. Řešení těchto problémů se nabízí v použití separačních postupů na bázi afinitní sorpce a desorpce. Tato cesta je jednoduchá, vysoce selektivní a hospodárná a umožňuje vycházet i z malých objemů a používat jen plasmy s negativním nálezem antigenu sérové hepatitidy, což redukuje nebezpečí přenosu viru na minimum. Vzhledem k poměrné stabilitě antitrombinu III v přítomnosti stabilizátorů je dána možnost, aby byl zahříván 10 h na teplotu 60 °C bez podstatné ztráty aktivity. Stupeň určité purifikace je však podmínkou. Separaci uvedených bílkovin lze zařadit před schéma běžné průmyslové frakcionace krevní plasmy, aniž by tím byl nějak porušen frakcionační postup a výtěžky albuminu aaminoglobulinů.

Antitrombin III je inhibitor trombinu, koagulačních faktorů Xa, XIIa, XIa a dalších proteináz krevní plasmy a tělních tekutin. V krevním oběhu cirkuluje ve své neaktivní formě a je aktivován účinkem heparinu a látek heparinu podobných. Separovaný a koncentrovaný antitrombin III, ať již ve své proformě nebo v podobě aktivního komplexu s heparinem, upravený do vhodné aplikační formy, může být léčebně a preventivně použit při substituci dědičného či získaného nedostatku antitrombinu III a při mnoha dalších indikacích. Antitrombin III je dále potřebný pro stanovení hladiny heparinu a proteinu C v krevní plasmě, při monitorování heparinu během mimotělního oběhu apod.

Protein C je jedna z plasmatických proteináz přítomná v plasmě v neaktivním stavu a aktivovaná trombinem za spoluúčasti endoteliálního trombomodulinu. Jeho fyziologický význam spočívá v tom, že inaktivuje koagulační faktory V a VIII a aktivuje fibrinolýzu, čímž ovlivňuje proces krevní koagulace. Koncentráty proteinu C jsou potenciální antitrombotika s podobnou indikací jako antitrombin III (hyperkoagulační stavy).

Je známa příprava antitrombinu III s použitím afinitní sorpce na polysacharidových nosičích. Tyto nosiče však mají řadu nedostatků, například náchylnost k bakteriální kontaminaci s následnou produkcí endotoxinů-pyrogenů, ke změně vlastností nosiče a zhoršení průchodností sloupce, dále špatnou odolnost proti fyzikálně-chemickým podmínkám, malou životnost apod.

Bylo zjištěno, že sorbenty na bázi syntetických polymerů hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmetakrylátů uvedené nedostatky odstraňují. Na základě těchto nových poznatků byl vypracován způsob zpracování lidské nebo zvířecí krevní plasmy na koncentráty antitrombinu III, proteinu C, koagulačních faktorů a dalších bílkovin, afinitní sorpcí na ekvilibrovaném polymerním nosiči s imobilizovaným heparinem a následující selektivní desorpcí, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se sorpce výchozí suroviny provádí na makroporézním sférickém sorbentu na bázi kopolymerů hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmetakrylátů se 2 až 4 atomy uhlíku v alkylovém zbytku, obsahujícím imobilizovaný heparin.

Podle potřeby nebo podle možností lze sorpci výchozí suroviny na sorbent provádět buď na sloupci nebo vsádkově. Pro dosažení optimálního účinku je výhodné používat sorbent s velikostí částic od 50 do 300 μm.

Výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti sorbentů na bázi hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmetakrylátů podstatně zlepšují možnost komplexního zpracování lidské nebo zvířecí plasmy

nebo plasmatických frakcí na žádané produkty. Odolnost sorbentu proti vysokým tlakům dovoluje pracovat rychle a standardně, s přesnou reprodukcí pracovních postupů a s možností automatizace celého procesu. Charakter nosiče umožňuje uskutečnit průtok tekutin tlakově, dodržovat časový limit operací a optimalizovat jednotlivé operace. Stálost a trvanlivost sorbentu použitého při způsobu podle vynálezu je nesrovnatelně vyšší než u kterýchkoliv dosud známých a pro tyto účely užívaných materiálů, což má i příznivé ekonomické důsledky. Životnost sorbentu při opakovaném používání (2 až 3 cykly týdně) je několik roků. Způsob podle vynálezu tedy podstatně zdokonaluje a ekonomizuje společensky důležitou výrobu významných derivátů krevní plasmy a zlepšuje tím i léčebnou a diagnostickou praxi.

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

P ř í k l a d 1

Separace hrubé frakce plasmatických bílkovin s afinitou k heparinu

Sloupec (6x35 cm) se předem promyje pufrem, který obsahuje 0,005 mol/l citrátu sodného a 0,1 mol/l chloridu sodného; 8 až 10 l lidské krevní plasmy (nebo tzv. K-plasmy) s hodnotou pH 6,0 až 6,4 se protlačuje peristaltickým čerpadlem rychlostí 50 až 60 ml/min. Sorbent s průměrnou velikostí zrna 100 až 200 μ m byl před naplněním do sloupce ponechán 24 h botnat ve vodě. Proteklá plasma, ochuzená o sorbovaný podíl, se zpracuje odděleně samostatnou frakcionací na imunoglobuliny a albumin. Na sloupci je za těchto podmínek zachyceno 80 až 90 % antitrombinu III. Sloupec sorbentu se potom promyje výchozím pufrem a sorbované bílkoviny se z vazby na sorbent eluují jako jediný podíl pomocí citrátového pufru (0,005 mol/l) pH 7,5, který obsahuje 2 mol/l chloridu sodného. Získaná hrubá frakce obsahuje antitrombin III, protein C, plasminogen, koagulační faktory a další bílkoviny. Tato frakce se po dialýze dále frakcionuje. Proces sorpce a eluce je kontrolován sledováním koncentrace bílkovin (A_{285}).

P ř í k l a d 2

Příprava koncentráту antitrombinu III

Postupuje se jako v příkladu 1. Po sorpci a promytí sloupce se nejprve uvolní bílkoviny sorbované slabší vazbou, a to působením acetátového pufru (0,4 mol/l ve vodě) s hodnotou pH 7,5. Z promývací tekutiny je získán protein C, plasminogen, koagulační faktory ev. další bílkoviny. Tato frakce se zpracuje odděleně. Po promytí sloupce nadbytkem acetátového pufru se ze sloupce eluuje zkoncentrovaný antitrombin III roztokem s vyšší iontovou silou, s výhodou citrátovým pufrem 0,005 mol/l pH 7,5 s obsahem 2 mol/l chloridu sodného. Eluát se odsolí a zahustí ultrafiltrací na obsah 0,1 až 0,3 % hmot. a po přidání natrium citrátu (0,6 mol/l) a úpravě pH na 7,5 se roztok zahřívá 10 h na 60 °C, aby se inaktivoval popřípadě přítomný virus sérové hepatitidy. Potom se roztok zbaví citrátu diafiltrací, zahustí na koncentraci cca 50 IU/ml, přidá se 1 % hmot. sorbitolu jako stabilizátoru a lyofilizuje se, čímž se získá preparát koncentráту antitrombinu III určený pro klinickou aplikaci.

P ř í k l a d 3

Příprava proteinu C a koncentráту koagulačních faktorů vedle antitrombinu III

Postupuje se jako v příkladu 1 a 2. Po sorpci a promytí sloupce výchozím pufrem se sorbované bílkoviny postupně eluují těmito pufrů:

1. 0,22 mol/l octanem sodným se odstraní balastní bílkoviny;
2. 0,32 mol/l octanem sodným se získá koncentrát proteinu C, který se potom zpracuje podle záměru použití;

3. 0,4 mol/l octanem sodným se získá frakce bohatá na koagulační faktor X a plasminogen, která se zpracuje podle záměru použití; pH ve všech případech je 7,5.
4. 2 mol/l chloridem sodným v citrátovém pufru (0,005 mol/l, pH 7,5) se ze sloupce vytěsni antitrombin III.

P ř í k l a d 4

Příprava komplexu antitrombinu III s heparinem

Postupuje se jako v příkladu 1, 2 nebo 3, přičemž antitrombin III je eluován heparinem (0,005 mol/l citrátový pufr pH 7,5 obsahující 100 mg heparinu v litru). Podíl obsahující antitrombin III - heparinový komplex se pro klinickou aplikaci zpracuje podle příkladu 2. Přítomnost tohoto komplexu je prokazována na základě A_{285} spektrofotometricky.

P ř í k l a d 5

Vsádkový způsob zpracování plasmy

Ve 2litrové skleněné nádobě se smíchá 1 000 ml lidské krevní plasmy s hodnotou pH 6,0 až 6,4 se 100 ml vlhkého sorbentu ekvilibrovaného stejně jako v příkladu 1 a míchá se 1 h. Po usazení sorbentu se supernatant odtáhne nebo odstředí, načež se sorbent promývá a eluuje přidáváním elučních roztoků podle příkladů 1 až 4. Získané frakce se zpracují podle záměru použití. Používá se sorbent o zrnění 200 až 300 μm .

P ř í k l a d 6

Příprava antigenu antitrombinu III (vysoce purifikovaného antitrombinu III)

Sorpce plasmatických bílkovin na sloupec s imobilizovaným heparinem je provedena podle příkladu 1. Odstranění volněji vázaných bílkovin je provedeno promývacím roztokem (0,8 mol/l natrium acetát pH 7,5). Antitrombin III je ze sloupce eluován citrátovým pufrem 0,005 mol/l, pH 7,5 s přidávkou 2 mol/l chloridu sodného. Získaný eluát je odsolen a koncentrován na 1/50 objemu výchozí plasmy. Další purifikace je provedena molekulární filtrací. Jako antigen je použito podílů s maximální specifickou aktivitou antitrombinu III. Získá se produkt vhodný k produkci monospecifických polyklonálních i monoklonálních protilátek. Oba typy protilátek slouží v diagnostice.

Regenerace sorbentu

Regenerace sorbentu se provádí citrátovým pufrem (0,005 mol/l) pH 7,5 s obsahem 2 mol/l chloridu sodného. Tento pufr je pak vymyt vodou a sloupec je naplněn citrátovým pufrem (0,005 mol/l) pH 6,0 až 6,5, čímž je sloupec připraven k dalšímu použití. Pokud není sloupec delší dobu používán je uchováván v citrátovém pufre (0,005 mol/l) pH 6,0 až 6,5 obsahujícím bakteriostatikum. Před použitím sloupce je nutné tento pufr nahradit pufrem výchozím.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob zpracování lidské nebo zvířecí krevní plasmy nebo jejích frakcí na koncentráty antitrombinu III, proteinu C, koagulačních faktorů a dalších bílkovin, afinitní sorpcí výchozí suroviny na ekvilibrovaném polymerním nosiči s imobilizovaným heparinem a následující selektivní desorpcí, vyznačující se tím, že se sorpce výchozí suroviny provádí na makroporézním sférickém sorbentu na bázi kopolymerů hydroxyalkylakrylátů nebo hydroxyalkylmetakrylátů se 2 až 4 atomy uhlíku v alkylovém zbytku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se sorpce bílkovin výchozí suroviny na sorbent provádí na sloupci nebo vsádkově.

3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se používá sorbentu s velikostí částic od 50 do 300 μm .