



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 247127

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28 12 82
(21) PV 9874-82
(89) WP 211 443, DD

(11) B₁

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 39/00,
A 61 K 35/14

(40) Zveřejněno 13 06 85
(45) Vydáno 28.09.87

(75)
Autor vynálezu

FRANKE WILFRIED dr., PLAUEN,
KARL MANFRED dr., JÜSSNITZ,
JÄGER LOTHAR prof.dr.,
METZNER GERHARD dr., JENA (DD)

(54)

Způsob výroby preparátů humánního transfer-faktoru

Řešení se týká výroby standartního a imunologicky účinného preparátu humanního transfer - faktoru, který v kombinaci s ostatními postupy zdokonaluje frakcionaci čerstvé neporušené krve. Díky tomu se získá racionálnější a méně nákladné využití lidské krve. Spočívá ve využití vedlejšího produktu, kromě klinicky použitelných základních produktů, jsou jako erytrocyty, kryoprecipitát a plazma, na vysoce jakostní terapeutický preparát. Postup spočívá v promývání a odstředování oddělující od leukocytární vrstvy "buffy coats" s následním nejméně desetinásobným pomalým zmražením a rychlým rozmrazováním.

Область применения изобретения

Изобретение касается способа изготовления препаратов человеческого трансфер-фактора из периферических лейкоцитов крови здоровых, невыборочных доноров, причем полученные препараты характеризуются высокой иммунологической активностью при стимуляции клеточной иммунной системы.

Постоянно растущая потребность в консервированной крови и проведение оптимальной гемотерапии при минимальном риске для больного привело уже давно к все более возрастающему эффективному использованию донорской крови в учреждениях переливания крови и донорства ГДР. В настоящее время усилия концентрируются на разработке новых препаратов из человеческой цельной крови, особенно при использовании неприменяемых до сих пор составных частей крови и на более рациональной комбинации различных способов препарации при повышении качества и количества.

Благодаря новым познаниям об иммунодефицитных состояниях, полученным за последние годы, и все еще неудовлетворительной ситуации терапевтических возможностей повлиять на эти часто угрожающие жизни заболевания возникает необходимость разработки соответственно действующих медикаментов.

Таким терапевтическим препаратом, стимулирующим иммунные реакции, зависящие от Т-лимфоцитов, является трансфер-фактор. Трансфер-фактор влияет на корреляты клеточного иммунитета на живом организме и в лабораторных условиях без того, чтобы были подробно известны его действующие компоненты и их механизм действия. Он состоит из смеси низкомолекулярных полипептидов /молекулярный вес < 10 000 дальтон/ с до 12 аминокислотами и одной долей рибонуклеиновой кислоты с 2 - 3 нуклеотидными щелочами. Трансфер-фактор является термостойким при 37°C на 6 часов и нечувствительным при воздействии рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы и химотрипсина, но при воздействии температур > 90°C и проназы - разрушается.

Показаниями для лечебного применения трансфер-фактора являются первичные иммунные дефекты, например, при агаммаглобулинемии швейцарского типа, синд-

поме di-Giorgio, болезни Nezelof, синдроме Wiskott-Aldrich, атаксии расширения капилляров и артериол, приобретенные иммунные дефекты при различных основных болезнях, например, при саркоидозе, болезни Гочкина, злокачественных лимфоцитомах, раках, при лечении иммунодепрессантами и цитостатиками, а также при инфекциях, вызванных бактериями, вирусами и грибами, например, при общей реакции организма на прививки, синегнойных инфекциях и кандидамикозах.

Противопоказания пока неизвестны и не ожидаются.

Характеристика известных технических решений

До настоящего времени препараты трансфер-фактора добывались только в виде единичных приготовлений или малых скоплений от 10 до 20 доноров при помощи клеточной сепараций у донора или при помощи фракционирования цельной крови, ориентирующегося исключительно на максимальное получение лейкоцитов. Этот вид изготовления трансфер-фактора является неэффективным в отношении оптимального использования ценного биологического сырья цельной крови, требует технически больших затрат и расходов. Поэтому также не могут быть превышены малые скопления, что оказывается необходимым для целенаправленного длительного лечения препаратом в высшей мере стандартизированным и однородным. Для всех до сих пор известных препаратов трансфер-фактора вследствие малых скоплений не могли быть указаны ни однородный состав ни какие-либо параметры, достаточно характеризующие иммунологическое действие в лабораторных условиях.

Лейкоцитарные пленки "buffy coats" консервированной крови, смесь лейкоцитов и тромбоцитов, являются в настоящее время нежелательными, мешающими факторами в концентратах эритроцитов, так как они могут привести к иммунизированию в системе HLA и за счет образования микро и макроагрегатов к значительному снижению успеха переливания. Лечебное использование этих лейкоцитарных пленок "buffy coats" до сих пор было невозможно. Для изготовления концентратов лейкоцитов и тромбоцитов эти побочные продукты непригодны. Для этих жизненных клеточных концентратов требуются единичные приготовления в системе HLA при помощи сепараторов крови.

Цель изобретения

Целью изобретения является рациональным способом изготовить не имеющийся в настоящее время в распоряжении эффективный иммунобиологический препарат для воздействия на способность реакции, зависящей от Т-лимфоцитов при применении неиспользуемых до сих пор составных частей крови в форме так называемых лейкоцитарных пленок "buffy coats", который вследствие очень больших исходных скоплений является однородным и по своим действующим субстанциям стандартизированным и этим создает благоприятные условия для успешного проведения лечения. При этом, изготовленный по этому изобретенному способу препарат трансфер-фактора относительно его однородности по составу и его количественной иммунологической активности в лабораторных условиях, должен считаться со строгими масштабами фармацевтического законодательства. Далее этот способ приготовления трансфер-фактора должен целю включаться в имеющуюся задачу переливания крови и донорства, включая уже практикующиеся способы фракционирования цельной крови.

Изложение сущности изобретения

Описанные в характеристике известных решений недостатки объясняются следующими причинами:

Проводимое до сих пор единичное приготовление трансфер-фактора при помощи клеточной сепарации на доноре или применение малых скоплений не привело к однородному и стандартизируемому препарату, что требуется для планомерного и целенаправленного лечения. Далее все до сих пор известные способы были направлены на максимальное получение лейкоцитов как главную цель фракционирования цельной крови, причем, без того, чтобы возникающие при других способах фракционирования как неиспользуемые составные части крови лейкоцитарные пленки "buffy coats" могли быть приведены к применению в качестве исходного материала для приготовления трансфер-фактора.

Для того, чтобы устранить эти причины, изобретению была поставлена задача, разработать способ, при котором при включении в технологический процесс обработки свежей консервированной человеческой цитратной крови, консервированной человеческой цитратной крови на АГ или гепариновой человеческой крови в клинически используемые эритроцитные осадки, криопреципитат и плазму получить лейкоцитарные пленки "buffy coats", до сих пор нежелаемые и отбрасываемые, в допустимом количестве и высокой частоте в виде побочного продукта и исходного материала для изготовления трансфер-фактора. За счет интеграции практикующихся в настоящее время процессов фракционирования цельной крови лейкоциты получают не как единственные, а как побочный продукт и этим удается изготовить трансфер-фактор технологически поразительно просто и с малыми затратами.

Согласно изобретению это достигается тем, что свежесконсервированная кровь центрифугируется при 1800 об/мин продолжительностью в 10 - 40 минут при температуре +8° до +15°С, так что только эритроциты оседают в достаточной плотности и на эритроцитах не образуется кромка лейкоцитарной пленки "buffy coats". Плазмы от двух консерватов скапливаются посредством техники избыточного давления азота и центрифугируются 20 - 60 минут при 1800 до 2000 об/мин и при температуре от +8° до +15°С, так что получается надосадочная бесклеточная плазма. На каждое скопление добывается ок. $4 \cdot 10^8$ до $2 \cdot 10^9$ лейкоцитов в лейкоцитарной пленке "buffy coats" для изготовления трансфер-фактора.

После отделения свежей плазмы для изготовления криопреципитата лейкоцитарные пленки "buffy coats" сохраняются в кромке плазмы в асептических условиях до тех пор, пока не получены результаты электрофореза на Au/SH, определения в сыворотке крови трансаминазы глютамина и пирувата и исследования на сифилис. Это время хранения не должно превышать 24 часа, чтобы избежать потерь активности. Продолжительные лабораторные данные анализа отсортировываются, также при возможно повторных исследованиях.

Лейкоцитарные пленки "buffy coats" ресуспензируются с 30 - 50 мл изотонического инъекционного раствора NaCl и ресуспензии от 15 до 20 скоплений объединяются. Затем кратковременно центрифугируются скопления при 800 - 1000 об/мин, температуре +4°, чтобы осадить большую часть внесенных эритроцитов. При этом, после центрифугирования на эритроцитах не должен образоваться слой лейкоцитарной пленки "buffy coats". Чтобы удалить мешающие белки плазмы, суспензии от 30 до 60 минут центрифугируются при 1800 до

2000 об/мин. и выступающий раствор отбрасывается. Лейкоцитные осадки ресуспендируются в 50 до 100 мл бидистиллированной воды для инъекций и замораживаются при -40°C .

Для разрушения клеток суспензии лейкоцитов замораживаются минимум 10 - 15 раз медленно при -20° по способу shell freezing и быстро оттаиваются при температуре $+30^{\circ}\text{C}$. Эти процессы медленного замораживания и быстрого оттаивания благоприятствуют освобождению трансфер-фактора из клеток. После разрушения клеток клеточные обломки осаждаются центрифугированием от 30 до 60 минут при 1800 - 2000 об/мин. при $+4^{\circ}\text{C}$ и чистый или слегка мутный раствор, содержащий скопленный лейкоцитный экстракт от ок. 500 - 1000 порций консервированной крови, подвергается ультрафильтрации для того, чтобы отделить высокомолекулярные составные части. Бесцветный или слегка окрашенный в желтый цвет ультрафильтрат стерильно фильтруется через бактерио-фильтр /размер пор $0,2\text{ }\mu\text{м}/$ и в асептических условиях разделяется на порции.

Лиофилизация препаратов, замороженных по способу shell freezing осуществляется начиная при -15 до -10°C в вакууме от 0,1 до 0,3 торр до конечной температуры 4°C выше 24 часов.

Одна фасовка лиофилизированного препарата содержит 5 единиц трансфер-фактора, соответственно лейкоцитному экстракту 10 x 400 мл цельной крови. Изготовленный по этому способу трансфер-фактор является стерильным и беспиогенным и для внутримышечного и подкожного применения растворяется в соответственно 5 мл и для внутривенного применения - в 30 мл изотонического инъекционного раствора NaCl. Препарат свободен от субстанций групп крови, гистосовместимых антигенов и в нем не обнаруживается гепатитно ассоциированный антиген.

Хранение лиофилизированного препарата в течение 6 месяцев до разрешения на выпуск гарантирует благонадежность в отношении переноса сывороточного гепатита соответственно предписанной законом обязательной регистрации при возникновении гепатита у доноров.

Каждый выпуск трансфер-фактора проверяется в соответствии с предусмотренными государственными проверками на физико и биохимические параметры и на его иммунологическое действие. Остаточная влага лиофилизированной субстанции может составлять 5 % массы при продолжительности применяемости 12 месяцев. Значение pH трансфер-фактора, растворенного в изотоническом инъекционном растворе NaCl, должно находиться в пределах 5,8 - 6,5. После растворения в дистиллированной воде соотношение оптической плотности при 260 нм и 280 нм должно составлять $2,21 \pm 0,20$.

Содержание рибозы одной фасовки должно находиться в пределах от 1,0 до 5,0 мг, предпочтительно - от 1,2 до 2,5 мг и содержание пептида - в пределах от 1,0 до 10,0 мг, предпочтительно - от 1,0 до 3,0 мг. Иммунологическая активность каждого выпуска трансфер-фактора исследуется в реакции микротрансформации лимфоцитов (LTT) и в испытании на Е-розеткообразование.

Индекс усиления, как мера для повышенной трансфер-фактором стимуляции лимфоцитов по отношению к индуцированному стимулятору фитогемагглютинина /РНА/ при добавке 1 $\mu\text{л}$ РНА должен составлять минимум 1,4. При испытании на Е-розеткообразование при добавке трансфер-фактора должно быть установлено характерное повышение доли розеткообразующихся лимфоцитов.

Пример осуществления изобретения

Изобретение более подробно поясняется ниже на нескольких примерах.

Пример 1

Свежеконсервированная кровь на ACD-AG /не старше 4 часов/ центрифугируется в течение 15 минут при 2000 об/мин и +8°C. Богатые лейкоцитами плазмы от двух консерватов скапливаются и центрифугируются при 2000 об/мин в течение 40 минут, при этом осадки эритроцитов после ресуспензии в консервируемом растворе находят клиническое применение. После отделения свежей плазмы, которая применяется далее для изготовления криопреципитата, на следующий день после ресуспензии в 30 мл изотонического инъекционного раствора NaCl объединяются по 15 лейкоцитарных пленок "buffy coats" и центрифугируются для отделения еще имеющихся эритроцитов продолжительностью 5 минут при 1000 об/мин.

В заключение лейкоцитная суспензия сильно центрифугируется при 2000 об/мин продолжительностью 40 минут и осадок после устранения раствора в 100 мл бидистиллированной воды для инъекций ресуспензируется и замораживается.

Всего 16 бутылок скоплений / $\approx$ 480 трансфузионных единиц цельной крови/ оттаиваются 10 раз при 30°C в термостатах и затем медленно замораживаются. После центрифугирования при 2000 об/мин раствор 30 минут ультрафильтруется, стерильно фильтруется и разделяется на порции в 48 сосудов по 5 единиц трансфер-фактора. После лиофилизации проводятся исследования на стерильность и пирогенность.

Изготовленные по такому способу препараты стерильны и беспирогенны и имеют следующие физико-химические и иммунологические параметры:

значение pH	5,9
остаточная влага	4,4%
отношение оптической плотности 260 к оптической плотности 280	2,12
содержание пептида	2,3 мг
содержание рибозы	1,1 мг

Индукцированная фитогемагглютинином /РНА/ стимуляция лимфоцитов в реакции микротрансформации лимфоцитов /LTT/ усиливается при добавке 1 μ л раствора РНА благодаря трансфер-фактору в 2,9 раза.

Пример 2

Изготовление осуществлялось аналогично способу, описанному в примере 1. В качестве исходного материала служили 820 трансфузионных единиц цельной крови. В соответствии с этим после различных процессов центрифугирования, чистки и промывки, а также ультрафильтрации и стерильной фильтрации были получены 82 сосуда по 5 единиц трансфер-фактора каждый. При этом получают стерильный и беспирогенный препарат со следующими физико-химическими и иммунологическими параметрами:

значение pH	6,2
остаточная влага	3,4%

отношение оптической плотности при 260 нм	
к оптической плотности при 280 нм	2,33
содержание пептида	1,1 мг
содержание рибозы	1,6 мг

Индукцированная фитогемагглютинином /РНА/ стимуляции лимфоцитов в реакции макротрансформации лимфоцитов /ЛТТ/ усиливается при добавке 1 μ л раствора РНА благодаря трансфер-фактору в 2,1 раза.

Из примеров осуществления вытекает особая пригодность изобретенного способа для изготовления стандартизированного и иммунологически действующего препарата трансфер-фактора, характеризующегося комбинацией с другими шагами способа для фракционирования цельной крови. Благодаря этой связи удается более рациональное и более выгодное по затратам использование имеющейся в распоряжении в ограниченном объеме ценной цельной крови, причем, по сравнению с уже известными традиционными способами имеется то преимущество, что кроме клинически применяемых основных продуктов, таких как осадков эритроцитов, криопреципитата и плазмы, до сих пор выбрасываемый побочный продукт преобразуется в высококачественный иммунный терапевтический препарат.

Формула изобретения

Способ получения единых по своему составу свободных от субстанций групп крови и гистосовместимых антигенов и также исследованных на иммунологическое действие в лабораторных условиях препаратов трансфер-фактора из периферических лейкоцитов человеческой крови, которые минимум 1,4-кратно усиливают иммунологическое действие индуцированной фитогемагглютинином /РНА/ стимуляции лимфоцитом при добавке 1 μ л раствора РНА в лабораторных условиях и которые получены при исходном скоплении крови 500 до 1000 доноров, отличающийся тем, что выпадающие при изготовлении криопреципитата из свежей человеческой крови лейкоцитарные пленки "buffy coats" после удаления белковых компонентов плазмы и эритроцитов посредством шагов сепаратной промывки и центрифугирования при 800 до 1000 об/мин и +4°C продолжительностью от 5 до 15 мин, как и последовательно при 1800 до 2000 об/мин и +4°C от 30 до 60 мин минимум 10-кратным, а предпочтительно 12- до 15-кратным, медленным замораживанием и быстрым оттаиванием разрушаются и после отделения обломков клеток центрифугированием при 1800 до 2000 об/мин при +4°C от 30 до 60 мин подвергаются ультрафильтрации с последующей стерильной фильтрацией, а затем сразу при медленном возрастании температуры в зоне между -15°C и +4°C при давлении от 0,1 до 0,3 торр лиофилизируются.

Аннотация

Изобретение касается способа изготовления препарата человеческого трансфер-фактора из периферических лейкоцитов крови здоровых, невыборочных доноров, причем, полученные препараты характеризуются однородным составом и высоким иммунологическим действием при стимуляции клеточной иммунной системы. При этом, в качестве исходного материала находят применение составные части крови нежелательные и неиспользуемые при других способах фракционирования цельной крови в форме лейкоцитарных пленок "buffy coats", так что этот способ может быть отнесен к действующей задаче Службы крови и донорства без ориентировки на исключительно максимальное получение лейкоцитов.

Благодаря этому отнесению к уже практикующимся способам фракционирования достигаются исходные скопления от 500 до 1000 доноров и этим может быть получен однородный и по своему иммунологическому действию в лабораторных условиях стандартизированный препарат, соответствующий строгим масштабам фармацевтического законодательства и в результате этого создает благоприятные условия для длительного лечения иммунных заболеваний.

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной Ведомством по делам изобретений и патентов ГДР.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby preparátů humánního transfer-faktoru, zbavených složek krevních skupin a histokompatibilních antigenů, zkoumaných na imunologický účinek v laboratorních podmínkách z periferních leukocytů lidské krve, které nejméně 1,4 násobně zesiluje imunologický účinek indukovaný fytohemaglutininem stimulace lymfocytem při přidavku 1 μ l roztoku fytohemaglutininu v laboratorních podmínkách a které jsou získány při výchozím spojení krve od 500 až do 1000 dárců, vyznačující se tím, že oddělující se leukocytární vrstvy "buffy coats" se při výrobě kryoprecitátu z čerstvé lidské krve po oddělení bílkovinných složek plazmy a erytrocytů postupem odděleného promývání a odstřeďování při 800 až 1000 otáčkách/min a při $+ 4^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 až 15 minut, jakož i dále při 1800 až 2000 otáčkách/min a při $+ 4^{\circ}\text{C}$ po dobu od 30 do 60 minut nejméně desetinasobným, výhodně 12 až 15 násobným pomalým zmrazováním a rychlým rozmrazováním rozruší a po oddělení částí buněk odstřeďením při 1800 až 2000 otáčkách/min při $+ 4^{\circ}\text{C}$ po dobu od 30 do 60 minut se podrobí ultrafiltraci s následující sterilní filtrací a dále se lyofilizuje při pomalém zvyšování teploty od $- 15^{\circ}\text{C}$ do $+ 4^{\circ}\text{C}$ za tlaku 13,33 až 39,99 Pa.