

(11) Patento numeris: 3226

(51) Int.Cl.⁵: A61K 35/16,
A61K 31/195,
A61K 31/70,
A61K 33/06,
A61L 2/16

(21) Paraiškos numeris: IP333

(22) Paraiškos padavimo data: 1993 02 12

(41) Paraiškos paskelbimo data: 1994 03 25

(45) Patento paskelbimo data: 1995 04 25

(31,32,33) Prioritetas: 92 01604, 1992 02 13, FR

(72) Išradėjas:
Miryana Burnouf, FR

(73) Patento savininkas:
ASSOCIATION POUR L'ESSOR DE LA TRANSFUSION SANGUINE DANS LA REGION
DU NORD, 21 rue Camille Guérin, F-59000 Lille, FR

(74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 10/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
**Kompozicija ir būdas kraujo plazmai stabilizuoti pasterizacijos metu ir šiuo būdu gauti
terapinės paskirties produktai**

(57) Referatas:

Išradimas apima kompoziciją, skirtą stabilizuoti kraujo plazmą, visą plazmą arba be krioproteinų pasterizacijos metu. Kompozicija pagal išradimą leidžia pasterizuoti labai didelius plazmos tūrius (60 l eilės).
Išradimas taip pat apima plazmos stabilizavimo būdą naudojant stabilizavimo kompoziciją.
Gauta pasterizuota plazma skirta terapiniam naudojimui.

Išradimas apima kompoziciją, leidžiančią stabilizuoti kraujo plazmą pasterizacijos metu, pasterizacijos būdą, naudojant minėtą kompoziciją ir tuo būdu gautus plazmos tirpalus skirtus, ypač, plazmos perpylimui bei kraujo krešėjimo faktoriaus terapijai.

Visa žmogaus plazma ar plazma be krioproteinų iki šiol yra naudojama "perpylimo terapijoje" asmenims, kenčiantiems nuo sunkių nudegimų ar rimtų sužeidimų arba patyrusiems dideles chirurgines intervencijas, bendrai - visais atvejais, kai pacientai netenka didelio skysčio kiekio.

Bendrai šio tipo gydymui yra naudojama plazma, gauta iš atskirų sveikų asmenų, prieš tai patikrintų, siekiant užkirsti kelią bet kokiai rizikai perduoti virusines ligas. Tačiau ši procedūra neužtikrina visiškai rizikos užteršti virusais priešserologinėje stadijoje pašalinimo, ypač, įvairiais hepatito bei AIDS virusais.

Todėl yra svarbu tirti virusų inaktyvacijos metodų ir stabilizavimo kompozicijų, kurios apsaugotų svarbiausias biologines plazmos funkcijas, paiešką.

Buvo parodyta, jog hepatito B virusas yra pilnai inaktyvuojamas, kaitinant 10 val. 60°C temperatūroje esanti 0.5 M natrio citrato (Tabor et al. Thrombosis Res. 22, 1981, 233-238). Tačiau šis apdorojimas sąlygoja kai kurių plazmos baltymų biologinio aktyvumo praradimą (Tabor et al. and Barrowcliffe et al. Fr. J. Haematology 55, 1983, 37-46).

Įrodyta, jog galima įvairius, turinčius terapinę vertę proteinus, išvalytus iš kraujo plazmos, pasterizuoti įprastu būdu - 10 val. 60°C temperatūroje, esant įvairiems stabilizuojantiems agentams. Tačiau pažymėta, jog kompozicijos, stabilizuojančios vienos rūšies

biologinį aktyvumą, gali neturėti jokio poveikio kitos rūšies biologiniam aktyvumui.

5 Šios skirtingos eksperimentinių duomenų išvados sudaro išpūdį, jog visos plazmos (šviežios plazmos ar užšaldytos šviežios plazmos) ar plazmos be krioproteinų virusinė inaktyvacija negali būti pasiekta pasterizavimo būdu.

10 Nežiūrint to, kadangi yra medicininis poreikis visos plazmos, pareiškėjas ieškojo kompozicijų, kurios užtikrintų vienalaikę visų plazmos faktorių, turinčių terapinę vertę, biologinio aktyvumo apsaugą nuo denatūracijos pasterizavimo metu.

15 Tokiu būdu, Prancūzijos patento paraiškoje Nr. 90 08 375 pareiškėjas parodė, jog mišinys, susidedantis iš sorbito, heparino, lizino ir CaCl_2 , efektyviai stabilizavo plazmos faktorių biologinį aktyvumą pasterizavimo metu.

20 Tačiau dėl heparino buvimo šiame stabilizuojančiame mišinyje ir tuo pačiu galutiniame produkte pacientai, jau gydyti heparinu, negali būti injekuoti šia plazma.

25 Štai kodėl pareiškėjas ieškojo kitos kompozicijos, atliekančios tą pačią stabilizavimo funkciją.

30 Iš anksto pastebėjęs, jog sorbitas tam tikru mastu sustiprina apsaugą nuo terminės denatūracijos, bet rezultatai kinta tarp plazmos pavyzdžių ir efektyvumas nėra aukštas, pareiškėjas ieškojo įvairių priedų, kurie, sumaišyti su sorbitu, padidintų mišinio stabilizuojančią galią; ypač gerus rezultatus gavo, pridėjus į mišinį sacharozės tokią kiekį, kuris atitinka
35 apytiksliai 50% sorbito kiekio.

Iš kitos pusės, pastebėjus, jog CaCl_2 nėra stabilus ilgai kaitinant, jis buvo pakeistas kalcio gliukonatu, pasižyminčiu geru rezistentiškumu pasterizavimo sąlygose.

5

Be to, trinatrio citrato pridėjimas sustiprino mišinio apsauginį efektą, jei jo koncentracija buvo tiksliai reguliuojama: pernelyg maža dozė sąlygoja spontanišką plazmos koaguliaciją, tuo tarpu pernelyg didelė jo dozė sumažina vėlesnį koaguliavimo faktorių aktyvumą plazmos terapinio naudojimo metu.

10

Pagaliau, mažiausiai dvi amino rūgštys, pageidautina lizinas ir argininas, yra dedamos į mišinį.

15

Tokiu būdu stabilizavimo kompozicija pagal šį išradimą susideda iš sorbito, sacharozės, kalcio gliukonato, trinatrio citrato, lizino ir arginino mišinio. Yra naudojamos įvairių priedų, skirtų plazmai pasterizuoti, šios koncentracijos (1 litrai pradinės plazmos):

20

- sorbitas, 800-1.400 g, pageidautina 1.300 g

- sacharozė, 400-600 g, pageidautina 514 g

25

- kalcio gliukonatas, 3-5 mM, pageidautina 4 mM

- trinatrio citratas, 8-25 mM, pageidautina 15 mM

30

- lizinas, 1-10 g, pageidautina 5 g

- argininas, 1-10 g, pageidautina 5 g.

35

Kompozicija pagal šį išradimą yra dedama į šviežią plazmą arba į užšaldytą ir atšildytą šviežią plazmą, arba į plazmą, neturinčią krioprecipitato proteinų,

prieš minėtos plazmos pasterizaciją, ją kaitinant skystame būvyje 10 val. $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Po pasterizacijos temperatūra palaipsniui mažinama iki
 5 20°C ir tirpalas dializuojamas, norint pašalinti sorbitą ir sacharozę. Dializės tirpalo pH yra 7.5 ir jį sudaro 10 mM trinatricio citrato, 4 mM kalcio gliukonato, 0.1 M natrio chlorido, 10 g/ltr lizino ir 3 g/ltr arginino. Pagal pareikalavimą gali būti taip pat naudo-
 10 jami įvairių sudėčių dializės buferiai. Tada tirpalas koncentruojamas norint atstatyti plazmos proteinų fiziologinę normą. Gautas tirpalas filtruojamas ir tada paskirstomas ir laikomas užšaldytas ar liofilizuotas.

15 Išradimas taip pat liečia plazmos pasterizacijos būdą, kuris apima kompozicijos pagal šį išradimą idėjimą į plazmą prieš jos kaitinimą, po to pasterizuotos plazmos dializę prieš aukščiau aprašytą buferį.

20 Šis būdas ypatingai naudingas, kadangi jis gali būti pritaikytas didelėms plazmos, gautos iš keleto atskirų šaltinių, partijoms ir gali svyruoti nuo 1 litro iki keleto šimtų litrų. 60 ir daugiau litrų partijų pasterizacija gali būti atliekama po atitinkamos
 25 kontrolės, taip įgalinant garantuoti produkto atitinkamą biocheminę kokybę.

Išradimas taip pat apima pasterizuotus plazmos tirpa-
 lus, gautus išradimo būdu, minėtus tirpalus, įskaitant
 30 visą plazmą ar plazmą be kai kurių proteinų (tokių, kaip krioprecipitato proteinai), skirtus terapiniam naudojimui, taip pat skirtus pakeisti visą plazmą arba kompensuoti atskiro kraujo faktoriaus nepakankamumą.

35 Kompozicija ir būdas pagal šį išradimą taip pat gali būti pritaikyti gyvulinės kilmės plazmai. Jie gali būti naudingai pritaikyti, pav., fetaliniam veršelių

serumui, naudojamam kaip priedas ląstelių kultūroms, daugiausia skirtoms terapinių produktų paruošimui.

5 Sekantis pavyzdys pateikia šio išradimo įgyvendinimo formą, neapribojant jo apimtį.

Pavyzdys:

10 Sekantis mišinys yra dedamas į 60 ltr atšildytos plazmos, ją nestipriai maišant:

	kiekis pradinės plazmos litrui
sorbitas	1.300 g
sacharozė	514 g
kalcio gliukonatas	4 mM
trinatrio citratas	15 mM
lizinas	5 g
argininas	5 g

15 Pasterizacija yra atliekama termostatuotame inde, kaitinant 10 val. 60°C temperatūroje.

Po pasterizacijos temperatūra palaipsniui sumažinama iki 20°C ir tada tirpalas dializuojamas, siekiant pašalinti sorbitą ir sacharozę.

20 Dializė atliekama, pav., naudojant kasetinę ultrafiltracijos sistemą (Pellicon®).

Dializės buferio kompozicija yra tokia:

25	- trinatrio citratas	10 mM
	- lizinas	10 g/ltr
	- argininas	3 g/ltr
	- kalcio gliukonatas	4 mM
	- natrio chloridas	0.1 M

30

Sorbito pašalinimas kontroliuojamas kolorimetriškai, o sacharozės - fermentinės analizės būdu, tiriant galutinį produktą.

5 Po dializės gali sekti, jei tai reikalinga, koncentravimas, naudojant tą pačią įrangą, norint atstatyti koaguliavimo faktoriaus kiekį apytiksliai iki 1 V/ml, kaip yra geros kokybės terapinėje plazmoje. Produktas yra dializuojamas, esant 370 mosmol/l osmosiniam slėgiui ir pH 7-7.5.

Po to produktas sterilizuojamas filtracijos būdu, pav., naudojant Millipack® 40, Millipore® su 0.22 μ dydžio poromis. Tada produktas išpilstomas į plastmasinius maišelius arba butelius ir užšaldomas arba liofilinamas.

Virusinės inaktyvacijos efektyvumas pasterizuojant buvo vertinamas, pasirenkant virusus, rekomenduojamus Europos specialistų ekspertų grupės biotechnologijos/farmacijos srityje biologinių produktų virusų eliminavimo ir inaktyvavimo procesams ratifikuoti. Rezultatai pateikti I lentelėje.

I lentelė

25

Virusas	Genas	Struktūra	Infektiškumo sumažėjimas (log 10)	Trukmė
ŽIV	RNR	E	>5	<10 min.
POLIO SABIN 1	RNR	NE	>6.23	<5 val.
VAKCINA	DNR	E	>4.30	<1 val.
HERPES-AUJESZKY	DNR	E	>4.15	<5 val.
PARA gripo 3 tipas	RNR	E	>6.30	<2 val.
REOVIRUSO 3 tipas	RNR	NE	>3.28	≤10 val.
SINDBIS	RNR	E	>5.74	<5 val.

E - su apvalkalėliu

NE - be apvalkalėlio

Kokybės kontrolės rezultatai, gauti 6 sekančiose viena paskui kitą reguliuojamose partijose, pateikti sekančiose lentelėse.

5

II lentelė.

Kraujo faktorių atstatymas

	KONCENTRACIJA, U/ml	IŠEIGA, %
Proteinai (g/ltr)	60.0±10.6	93±2
Faktorius VIII:C (IU/ml)	1.10±0.26	94±7
Faktorius VIII:C (chromogeninis)	0.70±0.09	83±13
Faktorius V:C	1.12±0.25	83±4
Faktorius XI:C	0.98±0.06	88±7
Faktorius IX:C	0.64±0.10	59±7
Faktorius VII:C	0.65±0.05	67±6
Fibrinogenas Ag (g/ltr)	3.10±0.28	92±5
Krešėjantis fibrinogenas (g/ltr)	2.50±0.17	92±3
Antitrombino III aktyvumas (g/ltr)	0.99±0.04	92±3
Alfa-1-antitripsino aktyvumas (g/ltr)	0.96±0.10	92±3
APTT	35-38 sekundės	-

10

III lentelė.

Kokybės kontrolė: proteazės ir skilimo produktų nebuvimas

15

	KONCENTRACIJA (U/l)
Trombinas	<0.01
PKA (%)	<2
Kalikreinas (%)	3
Faktorius IXa (U/ml)	<0.1
Faktorius Xa (U/ml)	<0.1
Faktorius VIIb/F VIIa	0.97
Proteolitinis aktyvumas (S. 2288 - OD/mn)	0.03
Fibrinogeno skilimo produktai (ng/ml)	<250

IV lentelė.

Kokybės kontrolė *in vivo*

5

Testas su žiurkėmis:

- | | |
|--|-----------------|
| - Kraujo spaudimas | < -2% |
| - Pulsas | nepakitęs |
| - Toksiškumas (intraveninė injekcija - 25 ml/kg) | toksiškumo nėra |

Testas su triušiais:

- | | |
|------------------|----------------|
| - pirogeniškumas | nepirogeniškas |
|------------------|----------------|
-

Plazma, pasterizuota esant anksčiau aprašytai stabilizavimo kompozicijai, atitinka standartus, nustatytus terapiniam naudojimui.

10

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija kraujo plazmai stabilizuoti pasterizacijos metu, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji
5 susideda iš sorbitolio, sacharozės, kalcio gliukonato, trinatricio citrato, lizino ir arginino mišinio.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad sorbitolio koncentracija yra 800-1400 g/l
10 pirminės plazmos, o geriausiai 1300 g/l.
3. Kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad sacharozės koncentracija yra 400-600 g/l, o geriausiai 514 g/l.
15
4. Kompozicija pagal bet kurią iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kalcio gliukonato koncentracija yra 3-5 mM, o geriausiai 4 mM.
- 20 5. Kompozicija pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad trinatricio citrato koncentracija yra 8-25 mM, o geriausiai 15 mM.
- 25 6. Kompozicija pagal bet kurią iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad lizino ir arginino koncentracijos yra 1-10 g/l, o geriausiai 5 g/l.
7. Kraujo plazmos pasterizacijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prieš šildymo stadiją į plazmą
30 įveda kompoziciją pagal bet kurią iš 1-6 punktų, o po šildymo stadijos cukrus iš kompozicijos pašalina dializės būdu prieš buferį, turintį trinatricio citratą, kalcio gliukonatą, natrio chloridą, liziną ir arginą.
- 35 8. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad buferis dializei turi 10 mM trinatricio citrato,

4 mM kalcio gliukonato, 0,1 M natrio chlorido, 10 g/l lizino ir 3 g/l arginino.

5 9. Būdas pagal 7 punktą arba 8 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jis taikomas plazmos tūriams
nuo 1 l iki kelių šimtų litrų.

10 10. Visa plazma, skirta terapiniam naudojimui, b e -
s i s k i r i a n t i tuo, kad buvo pasterizuota,
naudojant būdą pagal bet kurį iš 7-9 punktų.

15 11. Nusodintos, veikiant šalčiui, plazmos supernatan-
tas, skirtas terapiniam naudojimui, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad buvo pasterizuotas, naudojant
būdą pagal bet kurį iš 7-9 punktų.

12. Plazma arba gyvulinės kilmės serumas, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad buvo pasterizuoti,
naudojant būdą pagal bet kurį iš 7-9 punktų.