

(19)



VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

(10) **LT 3419 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3419**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 35/16**

(21) Paraiškos numeris: **IP264**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 09 25**

(60) SU duomenys: **PCT/FR 91/00493, 1991 06 20**

(31,32,33) Prioritetas: **90 08375, 1990 07 03, FR**

(72) Išradėjas:

Miryana Burnouf, FR

Thierry Burnouf, FR

(73) Patent savininkas:

Centre Regional de Transfusion Sanguine de Lille, 19-21 rue Camille Guerin, F-59000 Lille, FR

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Kompozicija kraujo plazmai stabilizuoti pasterizavimo metu, pasterizavimo būdas ir šluo būdu gauta plazma

(57) Referatas:

Išradimas liečia kompoziciją, skirtą kraujo plazmos, visos ar neturinčios krioproteinų, stabilizavimui pasterizavimo metu. Kompozicija sutinkamai su išradimu įgalina atlikti labai didelių plazmos tūrių (iki kelių šimtų litrų) pasterizavimą.

Išradimas taip pat liečia plazmos pasterizavimo būdą, naudojant stabilizavimo kompoziciją. Gauta pasterizuota plazma skirta terapiniam naudojimui.

Išradimas liečia kompoziciją, įgalinančią stabilizuoti kraujo plazmą pasterizavimo metu, patį būdą, naudojant minėtą kompoziciją, ir gautus tokiu būdu plazmos tirpalus, skirtus ypač plazmos ir kraujo krešėjimo V, XI ir XIII faktorių pakaitalų terapijai.

Visa žmogaus plazma ar plazma, atskirta nuo krioproteinų, panaudojama pakaitalų terapijoje, esant sunkiems nudegimams, pacientams, patyrusiems didelės traumas arba rimtas chirurgines operacijas, t.y. visais atvejais, kad netenkama didelio skysčio kiekio.

Paprastai šio tipo terapijoje naudojama plazma, gauta iš individualių donorų, sveikų ir iš anksto patikrintų asmenų, išvengiant rizikos, pernešant virusinius susirgimus. Vienok ši procedūra neužtikrina virusinio užkrėtimo negalimumo priešserologiniame periode, ypač įvairiais hepatito virusais ir AIDS virusu.

Todėl reikalinga sukurti virusinės inaktyvacijos metodą, kuris neturėtų poveikio įvairioms plazmos biologinėms funkcijoms.

Buvo įrodyta, jog hepatito B virusas yra pilnai inaktyvuojamas kaitinant prie 60°C 10 val., esant 0.5 M natrio citrato (Tabor ir kt. Trombosis Res., 22, 1981, 233-238). Vienok šis apdorojimas iššaukia kai kurių plazmos proteinų biologinio aktyvumo praradimą (Tabor ir kt., ir Barrowcliffe ir kt., Fr. J. Haematology, 55, 1983, 37-47).

Yra įrodyta, jog įvairūs proteinai, reikšmingi terapijai, išskirti ir išvalyti iš kraujo plazmos, atlaiko klasikini pasterizavimą prie 60°C 10 val. laikotarpyje, esant įvairiems stabilizatoriams. Be to, parodyta, jog molekulės, stabilizuojančios vieną

biologinį aktyvumą, gali būti visiškai neefektyvios kitų aktyvumų atžvilgiu.

5 Taigi, albuminas gali būti stabilizuojamas acetil-
triptofanu ir kaprilatu (Gellis ir kt., J. Clin.
Invest., 27, 1948, 238-244), tuo tarpu šie
stabilizatoriai nerodo poveikio plazminogeno atžvilgiu.
Trombinas gali būti stabilizuojamas aukštomis
10 gliukozidų koncentracijomis (Seegers. Arch. Biochem.,
3, 1944, 363-367), bet jos neapsaugo protrombino. Amino
rūgščių ir karbohidratų priedas duoda gerus rezultatus
VIII faktoriaus ir III antitrombino atžvilgiu (žiūr.
VFR patentą Nr. 29 16 711).

15 Europos patentas Nr. 0 035 204 aprašo α -antitripsino,
III antitrombino, prekalikreino, fibronektino ir VIII
faktoriaus stabilizavimą polialkoholių pagalba, kaip
vieną iš paskutinių pavyzdžių nurodydamas sacharozę;
vienok parodyta, kad tokiomis pačiomis sąlygomis IX
20 faktorius ir prekalikreinas praranda savo visą terapinį
aktyvumą.

Šie skirtingi eksperimentiniai duomenys patvirtina tą
nuomonę, jog virusinė visos plazmos (šviežios plazmos,
25 užšaldytos šviežios plazmos ar krionusodinto
supernatanto) inaktyvacija negali būti pasiekta
pasterizavimo būdu.

Kadangi medicinoje jaučiamas visos plazmos trūkumas,
30 pareiškėjas turėjo tikslą pasiūlyti kompoziciją,
užtikrinančią vienalaikę visų faktorių, svarbių
terapijai, biologinio aktyvumo apsaugą prieš denatūraciją
pasterizavimo metu.

35 Įskaitant tai, jog sorbitas duoda tam tikrą apsaugą
prieš terminę denatūraciją, bet rezultatai varijuoja
tarp plazmos pavyzdžių ir išėigos yra nedidelės,

pareiškėjas pateikė naujus priedus, kurių mišiniai su sorbitu padidina jų stabilizuojančią galią.

5 Taigi, pagal šią išradimą siūlomą kompoziciją sudaro sorbitas, kalcio chloridas, heparinas ir lizinas. Įvairių komponentų koncentracijos reguliuojamos tokiu būdu, kad plazmoje, skirtoje pasterizavimui, būtų sekančios galutinės koncentracijos:

- 10 - 50-80% sorbito, tinkamiausia 60%,
- 0.1-1% vienetų/ml heparino, tinkamiausia 0.5 vienetų/ml,
- 15 - 1-10 g/l lizino, tinkamiausia 4 g/l,
- 3-5 mM CaCl_2 , tinkamiausia 4 mM.

20 Sutinkamai su išradimu, kompozicija yra dedama į šviežią plazmą, į užšaldytą-atšildytą šviežią plazmą arba į plazmą, iš kurios pašalinti krionuosėdų pavidalu proteinai prieš tai, kai pastaroji pasterizuojama prie $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 10 val.

25 Pasibaigus pasterizavimui, temperatūra palaipsniui sumažinama iki 20°C , ir tirpalas yra dializuojamas, kad pašalintų sorbitą ir hepariną. Dializės buferio tirpalo pH yra 7, jis turi 4-10 mM natrio citrato, 4 mM kalcio chlorido, 0.13 M natrio chlorido ir 4 g/l lizino.

30 Priklausomai nuo poreikio, dializės buferiai gali turėti įvairias sudėtis. Po to tirpalas yra koncentruojamas, kad atstatyti plazmos proteinų fiziologinę normą. Gautas tirpalas steriliai filtruojamas, kondicionuojamas, po to užšaldomas ar

35 liofilinamas.

Išradimas taip pat apima plazmos pasterizavimo būdą, kuri sudaro kompozicijos, sutinkamai su išradimu, pridėjimas į plazmą, prieš ją kaitinant, ir po to pasterizuotos plazmos dializė prieš anksčiau nustatytą buferio tirpalą.

Šis būdas vertingas ypač tuo, kad jį galima taikyti didelėms plazmos partijoms, gaunamoms iš keleto individualių donorų. Dar daugiau, partijų nuo 100 iki 200 l ar daugiau pasterizavimas įgalina po atitinkamų testų garantuoti partijų kokybės pastovumą.

Iš kitos pusės plazmos partijos, pasterizuotos kaip pateikta išradime, gali būti naudojamos kaip pakaitalai pacientams, turintiems krešėjimo faktorių, tokių kaip V faktoriaus, XI faktoriaus ir XIII faktoriaus, kuriems nėra valytų koncentratų, nepakankamumą.

Tokiu būdu, išradimas apima taip pat pasterizuotus plazmos tirpalus, gautus sutinkamai su išradimu, ir ypač skirtus, iš vienos pusės, V, XI ir XIII faktorių nepakankamumui gydyti, iš kitos pusės - pakaitalų terapijai, reikalaujančiai visos plazmos arba krionusodinto supernatanto.

Sekantis pavyzdys aprašo išradimo įgyvendinimo variantą, neapribojant jo apimties.

PAVYZDYS:

Į du litrus atšildytos plazmos pridedama heparino (1000 vienetų), lizino (8 g) ir kalcio chlorido (220 mg). Šie du produktai pridedami druskų miltelių pavidale, plazma atsargiai maišoma. Po to palaipsniui dedama 120 g neištirpinto sorbito.

Pasterizavimas atliekamas 5 l tūrio inde kaitinant 60°C temperatūroje 10 val. vandens vonioje arba termostatuojamame rezervuare. Po pasterizavimo sorbitas ir heparinas pašalinami dializuojant dirbtiniu inkstu arba ultrafiltracijos sistema, kaip Pellikon^M sistema su kasetėmis, naudojant citratinį buferinį tirpalą, turintį 4 g/l lizino, 4 mM CaCl₂ ir 0,13 M NaCl. Dializę gali lydėti koncentravimas tokia pat sistema, kad pasiektų krešėjimo faktorių kiekį apytiksliai iki 1 vieneto/ml, kas rodo gerą terapinę plazmos kokybę. Plazma dializuojama prie 370 mosmol/ltr osmosinio slėgio ir pH 7. Produktas tada steriliai filtruojamas, pav., naudojant Millipack^M 40 filtrą (Millipore), turintį 0.22 µm dydžio poras. Produktas yra paskirstomas į plastikinius maišelius užšaldymui arba į medicininius flakonus liofilinimui.

Plazmos stabilizavimas pasterizuojant ir ultrafiltruojant, pridėjus kalcio chlorido, heparino ir lizino, įgalina gauti sekančias išeigas, lyginant su kontroliniu pavyzdžiu, turinčiu tik liziną ir sorbitą.

FVIIIc	87% prieš 66%
FVc	77% prieš 35%
FVIIc	55% prieš 52%
FIXc	60% prieš 49%
Koaguliuojanti fibrinogenas	81% prieš 57%
FXIII	77% prieš 71%

Nebuvo pastebėta krešėjimo faktorių aktyvacijos požymių, naudojant šį kalcio chlorido kiekį. Tokiu būdu, santykis jaučio FVII/koagulianto FVII yra 0.95 prieš 1.09 kontroliniame pavyzdyje. Stabilumas, tirtas FVIII aktyvumo atžvilgiu, 24 val. konservavus produktą skystame būvyje prie kambario temperatūros, nepablogėjo, palyginus su kontroliniu pavyzdžiu (atsistatė

100% aktyvumo). Tai patvirtina procentinis kiekis PKA < 2% pasterizuotiems produktams ir kontroliniams pavyzdžiams.

- 5 Be to, bandymai su žiurkėmis, gavusiomis intraveniniu būdu tokiu metodu pasterizuotą plazmą, rodo, jog nestebima hipotenzinio efekto ir nesukeliama jokių pokyčių širdies ritme.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija kraujo plazmai stabilizuoti pasterizavimo metu, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ją sudaro sorbito, heparino, kalcio chlorido ir lizino mišinys.
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad sorbito koncentracija yra tarp 500 ir 800 g/l.
3. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad sorbito koncentracija yra 600 g/l.
4. Kompozicija pagal vieną iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad heparino koncentracija yra tarp 100 ir 1000 vienetų/l.
5. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad heparino koncentracija yra 500 vienetų/l.
6. Kompozicija pagal vieną iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kalcio chlorido koncentracija yra tarp 3 ir 5 mM.
7. Kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kalcio chlorido koncentracija yra 4 mM.
8. Kompozicija pagal vieną iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad lizino koncentracija yra tarp 1 ir 10 g/l.
9. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad lizino koncentracija yra 4 g/l.
10. Būdas kraujo plazmai pasterizuoti, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prieš terminį apdorojimą i

plazmą deda kompoziciją pagal vieną iš 1-9 punktų ir po to ją pašalina dializuojant.

5 11. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dializę atlieka prie pH 7 buferio tirpalu, turinčiu 4-10 mM natrio citrato, 4 mM kalcio chlorido, 0.13 M natrio chlorido ir 4 g/l lizino.

10 12. Būdas pagal 10 arba 11 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad jis tinka plazmos tūriams nuo 1 iki keleto šimtų litrų.

15 13. Plazmos tirpalas terapiniam naudojimui, skirtas kraujo krešėjimo V, XI ir XIII faktorių nepakankamumui kompensuoti, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra gautas, naudojant būdą pagal vieną iš 10-12 punktų.

20 14. Visa plazma terapiniam naudojimui, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad ją pasterizuoja naudojant būdą pagal vieną iš 10-12 punktų.

25 15. Krionusodintos ir atskirtos nuo krioproteinų plazmos supernatantas terapiniam naudojimui, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį pasterizuoja naudojant būdą pagal vieną iš 10-12 punktų.