



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42121 (13) C2

(51) 7 A61K39/12, A61K39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ГІПЕРІМУННОГО ГАММАГЛОБУЛІНОВОГО ПРЕПАРАТУ ПРОТИ TORCH-ІНФЕКЦІЙ

(21) 2000127336

(22) 19 12 2000

(24) 15 10 2001

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р

(72) Марков Ігор Семенович

(73) МАРКОВ ІГОР СЕМЕНОВИЧ

(56) RU 20510554, 27 12 1995

EP 0 128 522, МПК C07G7/00, 19 12 1989

US 4 617 379, МПК C12Q1/04, 02 05 1991

(57) Спосіб отримання гіперімунного гаммаглобулінового препарату проти TORCH-інфекцій шля-

хом спиртової обробки фракцій плазми крові невакцинованих донорів з високим вмістом антитіл до однієї з інфекцій етиловим спиртом з подальшим центрифугуванням і відокремленням цільового продукту, який відрізняється тим, що використовують фракцію II + III, а на етапі відокремлення протромбіну рН встановлюють на рівні 5,0, а на заключному етапі виділення осаду гаммаглобуліну рН встановлюють рівним 7,2, після чого суміш піддають центрифугуванню спочатку при 1,5 тис об/хв протягом 30 хв, а потім при 3,0 тис об/хв протягом 45 хв

Винахід відноситься до галузі медицини, зокрема до фармакології, препаратів імунomodуючої дії, і може бути використаний для імунотерапії та імунoproфілактики вірусних та протозойних захворювань, а саме захворювань, викликаних TORCH-інфекціями

Актуальність винаходу обумовлюється різким збільшенням на сьогоднішній день числа захворювань, які викликаються TORCH-інфекціями, що значною мірою пов'язане з погіршенням екологічної ситуації, а також широким використанням імунodeпресивної терапії TORCH-інфекції є однією з основних причин вторинного безпліддя у жінок репродуктивного віку, що приводить до "звичного" викидня, "замершої" вагітності, мертворожденню. Активізація TORCH-інфекцій під час вагітності може призводити до формування тяжких вад розвитку плоду, інколи несумісних з життям, або внутрішньоутробного інфікування плоду, яке може проявлятися в різні періоди життя дитини. У дорослих основні інфекції TORCH-групи (цитомегаловірус - CMV, вірус простого герпесу - HSV 1/2, вірус оперезуючого герпесу - HZV, Епштейна-Барра вірус - EBV, токсоплазмоз) найбільш часто викликають ураження нервової системи, очей, імунної системи

На цей час широко відомі імунні гаммаглобуліни, вилучені з суміші плазми крові різних донорів, які латентно або активно перенесли в минулому різноманітні інфекції, а також способи, що дозволяють одержувати ці імунні гаммаглобуліни. Гаммаглобулін, одержаний таким чином, може

містити широкий спектр антитіл до різних мікробних та вірусних антигенів. Проте різні серії гаммаглобуліну, звичайно, не мають однакового титру протимікробних антитіл, тому доцільно проводити титрування гаммаглобулінів до різних бактеріальних і вірусних антигенів і відбирати серії, які можуть бути використані для конкретного інфекційного захворювання. Такі титровані препарати мають виражену специфічну біологічну та клінічну активність

Крім того, відомо, що вираженою профілактичною і лікувальною активністю володіють препарати гаммаглобулінів, одержаних з плазми крові людей, активно гіперімунізованих відповідними мікробними антигенами. Це препарати специфічної або направленої дії (див. А.Е. Киселев, Г.Я. Розенберг, П.С. Васильєв, Д.М. Гроздов, В.А. Аграненко, А.А. Фром. Справочник по кровезаменителям и препаратам крови. М., Медицина, 1969, с. 152-161)

У комерційних препаратах імунглобуліну містяться антитіла проти токсинів багатьох вірусів, та проти ряду збудників бактеріальної природи (ешірії, сальмонели, шигелли). Але справа у тім, що для лікування бактеріальних захворювань краще використовувати препарати, збагачені імунглобулінами класів М та/або А, а для лікування вірусних захворювань - імунглобулінові препарати, в яких переважають імунглобуліни класу G. Таким чином, способи одержання імунглобулінових препаратів також вимагають диференційованого

підходу в залежності від того, проти яких агентів спрямований препарат

Відомий спосіб отримання комплексного імуноглобулінового препарату з осаду Б (III фракції Кона), що являє собою баластну фракцію при спиртовому фракціонуванні сироватки (Експериментально-производственный регламент №338-91 иммуноглобулин человека сухой, для энтерального применения, утв. 06.09.91). Спосіб передбачає сольову екстракцію осаду Б у 0,9%-ному розчині хлориду натрію (у співвідношенні 1:10, тобто у десятикратному об'ємі). Обробку екстракту осаду Б ведуть хлоридом (10% по об'єму) з декстрансульфатом (0,1%) з метою видалення ліпопротеїдів і подальшого осадження імуноглобулінів поліетиленгліколем. Препарат, одержаний згідно з цим способом, містить 55-60% Ig G, 25-30% Ig M, 15-20% Ig A. Він містить високі титри антитіл проти ряду ентробактерій (ешеріхій, шигел, сальмонел), але він майже не придатний для лікування вірусних інфекцій, оскільки має низький вміст Ig G, до якого саме і відносяться віруссpezifічні антитіла.

На сьогоднішній день встановлено, що віруссpezifічні антитіла грають суттєву роль у патогенезі TORCH-інфекцій. Захисну дію їх пов'язують з їх безпосередньою участю у нейтралізації вірусних антигенів, а також з активацією комплекс-опосередкованого лізису та антитіло залежної клітинно-опосередкової цитотоксичності по відношенню до інфікованих клітин.

Відомий спосіб одержання імуноглобуліну до цитомегаловірусу з плазми крові невакцинованих донорів (Патент США №4,617,379). Вказаний спосіб передбачає відбір свіжої плазми нативних донорів з високими титрами антитіл до цитомегаловірусу і подальше її фракціонування за методом Conn та Oncley (Conn et al., J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946) з метою одержання фракції II, що представляє собою гіперімуний цитомегаловірусний імуноглобулін, що має титр антитіл до CMV 1:150000 - 1:1225000. Але недоліком способу є, по-перше, недостатньо високий титр антитіл, а, по-друге, він не дозволяє одержувати препарат вільний від імунологічно неактивних білкових фракцій, присутність яких у препараті викликає алергізацію організму.

Найбільш близьким до запропонованого способу є відомий спосіб одержання препарату проти герпетичного імуноглобуліну людини (Патент RU №20510554, 27.12.1995), який передбачає використання фракції III Кона, що утворюється при фракціонуванні плазми замість цільної плазми донорів, що коштує досить дорого. Спосіб передбачає спиртову обробку плазми 8-, 25-, 17% розчином етилового спирту з подальшим центрифугуванням і виділенням цільового продукту, при цьому спосіб передбачає обробку водного осаду фракції III хлороформом та декстрансульфатом, після чого проводять фракціонування розчином поліетиленгліколю. Але спосіб передбачає використання багатьох реактивів і є достатньо складним, крім того, він не дає змоги одержати препарат з високим титром антитіл.

Задачею винаходу є створення препарату для лікування захворювань, викликаних TORCH-інфекціями, з високими титрами/рівнями віруссpezifічних антитіл та антитіл проти токсоплазм

шляхом використання способу, що відповідає одержанню препарату точно направленої дії.

Задача вирішується тим, що спосіб одержання імуноглобулінового препарату проти TORCH-інфекцій передбачає спиртову обробку етиловим спиртом фракції II + III, що утворюється при спиртовому фракціонуванні плазми крові нативних невакцинованих донорів, з подальшим поетапним центрифугуванням та відокремленням цільового продукту, який відрізняється тим, що передбачає встановлення диференційованого pH на етапі відокремлення протромбіну pH встановлюють на рівні 5,0, а на заключному етапі виділення осаду гамма-глобуліну pH встановлюють рівним 7,2, після чого суміш піддають центрифугуванню спочатку при 1,5 тис. об./хв. протягом 30 хвилин, а потім при 3,0 тис. об./хв. протягом 45 хвилин. Спосіб забезпечує одержання імуноглобулінового препарату специфічної дії з вмістом Ig G на рівні 98%. Рівень антитіл до HSV 1/2 складає не нижче 150 IU/ml, до CMV - не нижче 50 IU/ml, до токсоплазмозу - не нижче 1000 IU/ml.

Слід сказати, що фракція II + III містить фібрин та Ig G, сумарний вміст яких складає 95%, Ig M, Ig A, складають приблизно 5%. За допомогою запропонованого способу, що передбачає використання диференційованого pH, а саме 5,0 на етапі відокремлення протромбіну і 7,2 на стадії одержання осаду гамма-глобуліну, а також використання певного режиму центрифугування спочатку протягом 30 хвилин при 1,5 тис. об./хв., а потім протягом 45 хвилин при 3,0 тис. об./хв. досягається більш повне розщеплення фракції II + III, що дає змогу збільшити кількісний вихід імуноглобуліну класу G, що є дуже важливим для імуноглобулінових препаратів, спрямованих проти TORCH-інфекцій.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

#### Приклад 1

Було обстежено 20 жінок, 5 з яких страждали хронічною герпетичною інфекцією. За аналізами крові визначили високий діагностичний рівень антитіл до HSV 1/2 типу. Відібрані жінки здали по 400 мл крові, з якої виділяли фракцію II+III.

#### Переосадження білків фракції II + III

Осад білків фракції II + III, що зберігався не більше 1 міс. при температурі -20 °C розчиняли у попередньо охолодженій до 0 °C фізіологічному розчині із розрахунку 7,5 V фізіологічного розчину по відношенню до ваги осаду. Суспензію перемішували протягом 2 год. при 0 °C. 95% етиловий спирт, охолоджений до температури -15 -20 °C у кількості 240 мл додавали на 1 л суспензії. Кінцева концентрація спирту у суміші 19%. Суміш перемішували 2 год. при температурі -5 -6 °C. Осад відокремлювали центрифугуванням при 3,0 тис. об./хв. протягом 30 хв.

#### Виділення осаду протромбіну

Осад суспензували при перемішуванні у воді при t = 0 - 1 °C із розрахунку 2 л води на 100 г осаду протягом 2 год. Встановлювали pH суміші на рівні 5,0 за допомогою буферної суміші. Перемішували 3 год. при t = 0 °C. Осад відокремлювали центрифугуванням у рефрижераторних центрифугах при t = 0 °C при 3,0 тис. об./хв. протягом 30

хв Протромбін складає 30 - 40 г на 100 г фракції II + III

#### Виділення β-глобуліну та ліпопротеїдів

Центрифугат поміщали у скляну ємкість при  $t = 0^\circ\text{C}$  та додавали охолоджений до  $t = -15 - 20^\circ\text{C}$  95% етиловий спирт із розрахунку 160 мл на 1 л центрифугату. Кінцева концентрація спирту у суміші 13%. Суміш витримували 13-16 год. Осад β-глобуліну та ліпопротеїдів видаляли шляхом центрифугування при  $t = 5^\circ\text{C}$  при 3,0 тис об/хв протягом 30 хв.

#### Одержання осаду γ-глобуліну

Центрифугат поміщав у скляну ємкість, додають 5 М розчин NaCl із розрахунку 10 мл на кожний літр центрифугату. Встановлюють рН рівне 7,0 шляхом додавання 4,2% розчину бікарбонату Na, додають охолоджений до  $t = -15 - 20^\circ\text{C}$  95% етиловий спирт у кількості 160 мл на 1 л суспензії. Кінцева концентрація спирту у суміші 26%. Суміш перемішують 2 год. Осад фракції II (γ-глобулін) відокремлюють центрифугуванням при  $t = -5^\circ\text{C}$  при 1,5 тис об/хв протягом 30 хв та подальшим центрифугуванням при 3,0 тис об/хв протягом 45 хв.

Вихід сирого осаду γ-глобуліну із 100 г фракції II + III складає 30-40 г. Осад зважують і розчиняють у розчині 0,1% NaCl при  $t = 0^\circ\text{C}$  із розрахунку 40 мл на 10 г осаду. Одержаний розчин розливають по 200 мл у флакони місткістю 500 мл, закривають пробками та піддають заморожуванню та висушуванню. Кінцеву концентрацію специфічних γ-глобулінів перевіряли методом ELISA-тесту. Рівні антитіл в одержаному імуноглобуліновому препараті складають для CMV - не менш 50 IU/ml, для HSV 1/2 - не менш 150 IU/ml, для токсоплазми - не менш 1000 IU/ml. Одержаний вміст антитіл є не нижчим від захисного рівня, встановленого для кожної інфекції. Це дозволяє використовувати його для профілактики та лікувального призначення при захворюваннях, що викликані TORCH-інфекціями. При порівнянні препарату, одержаного методом по способу-прототипу і препарату, одержаного згідно з запропонованим способом, встановлено, що у першому випадку кількість імунологічно неактивних домішок складає приблизно 3%, у другому випадку 1,5 - 2%, що дає можливість говорити, що спосіб забезпечує одержання імуноглобулінового препарату, що має вищий вміст Ig G у порівнянні зі способом-прототипом.

Одержання препарату продемонстровано на прикладі імуноглобуліну, специфічного до герпетичної інфекції, решту препаратів отримують аналогічним чином.

#### Приклад 2.

Дитина Оксана Г., 6 років, діагноз - правосторонній герпетичний увеїт. Хворіє на протязі 6 місяців, за цей час зір знизився до 0,3 Д, а на момент звернення у клініку, зір на праве око - відсутній.

Етіологічний діагноз захворювання підтверджений на підставі виявлення ДНК HSV методом PCR в сльозі і крові.

Лікування людський гамма-глобулін направленої дії проти HSV з рівнем антитіл 182 IU/ml у дозі 6 мл внутрішньом'язово щоденно на протязі 5 днів. Лікування було проведено на фоні загальноприйнятої терапії герпетичної інфекції.

На четвертий день лікування дитина почала розрізняти світло, а після 2-х тижнів дівчинка могла рахувати пальці руки.

#### Приклад 3

Новонароджений Р., 5 днів, народився недоношеним, маса тіла 2 кг 300 г, зріст 43 см з ознаками внутрішньом'язової інфекції: крововилив у шлунок мозку, жовтяниця, температура, збільшення лімфовузлів та печінки.

При обстеженні матері і дитини встановили активну форму цитомегаловірусної інфекції (CMV).

Лікування людський гамма-глобулін направленої дії з рівнем антитіл проти CMV 80 IU/ml, в дозі 1,0 мл внутрішньом'язово щоденно на протязі 5 днів на фоні відповідної базисної терапії.

Через 7 днів жовтяниця пройшла, в крові і сечі перестала визначатися ДНК CMV (методом PCR).

#### Приклад 4

Жінка С., 33 років, вагітність 32-33 тижнів. У зв'язку з субфебрилітетом і збільшенням периферичних лімфовузлів була тестована на основні TORCH-інфекції. Діагностовано хронічний токсоплазмоз в стадії реактивації: виявлені антитіла до Tox gondii класів Ig G, M і A. При проведенні УЗО виявлені непрямі ознаки загрози внутрішньом'язової інфекції плоду і переривання вагітності.

Лікування гамма-глобулін людини направленої дії з рівнем антитіл проти Tox gondii 1078 IU/ml в дозі 15 мл внутрішньом'язово щоденно на протязі 5 днів.

Вагітність у пацієнтки закінчилася народженням в строк живої доношеної дитини з нормальною масою і довжиною тіла без клінічних і лабораторних ознак уродженого токсоплазмозу.

Аналогічний ефект продемонстровано при використанні перемунного гамма-глобулінового препарату до вірусу Епштейна-Барра.

#### Приклад 5

Пацієнт Ч., 52 років, діагноз - оперезуючий лишай, хронічна (7 років) безперервно рецидивуюча течія. Багаторазово приймав противірусні (ацикловір, зовіракс) та імуномодуючі (циклоферон) препарати з обмеженим клінічним ефектом. Довго зберігався больовий синдром і висипи. Останнє загострення набуло розвитку за 3 дні до звернення в клініку.

Лікування монотерапія гамма-глобуліном людини направленої дії з високим рівнем антитіл проти вірусу оперезуючого герпесу (HZV) в дозі 0,3 мл на кожен кг маси тіла (17 мл на добу), внутрішньом'язово щоденно на протязі 5 днів.

Спостерігався виражений найближчий позитивний клінічний ефект - больові відчуття зникли на протязі перших 2-5 днів лікування, висип - на протязі 8 днів (без нових "підсипань").

#### Приклад 6

Пацієнтка Т., 30 років, з обтяженим акушерським анамнезом (дві "замерші" вагітності в 1997 р і 1999 р) і клінічними проявами з 1998 р синдрому хронічної втоми, тривалим субфебрилітетом. При обстеженні діагностована хронічна рецидивуюча Епштейна-Барра вірусна (EBV) інфекція в стадії клінічно-лабораторної активації (в крові методом PCR виявлена DNA EBV).

Лікування людський гамма-глобулін направленої дії з високим рівнем антитіл проти EBV в дозі

0,3 мл/кг (15 мл одноразово на добу) внутрішньом'язово щоденно на протязі 5 днів, а потім ще два введення у тій самій дозі 15 мл на добу з інтервалом 7 днів

На 8-й день лікування в крові припинила виявлятися DNA EBV, клінічне одужання - через 1 місяць

Запропонований спосіб дозволяє отримувати імуноглобуліновий препарат проти TORCH-інфекції шляхом використання фракції II + III плазми крові невакцинованих донорів при використанні методу фракціонування за допомогою етилового спирту та встановлення в залежності від стадії одержання певного значення pH та диференційних режимів центрифугування

---

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

---