



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



FI 000107779B

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 107779 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.10.2001

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

A61K 39/395, 38/00, 35/16

(21) Patentihakemus - Patentansökning

921309

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

25.03.1992

(24) Alkupäivä - Löpdag

25.03.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

26.09.1992

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

25.03.1991 AT 651/91 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Baxter Aktiengesellschaft, Industriestrasse 67, 1221 Wien, ITÄVALTA, (AT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Eibl,Johann, Gustav-Tschemakgasse 2, 1180 Wien, ITÄVALTA, (AT)

2 •Eibl,Martha, Gustav-Tschemakgasse 2, 1180 Wien, ITÄVALTA, (AT)

3 •Linnau,Yendra, Lavendelweg 24, 1224 Wien, ITÄVALTA, (AT)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Oy
Itämerenkatu 3 B, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä plasmaproteiineihin perustuvan farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en plasmaproteinbaserad farmaceutisk sammansättning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää sellaisten plasmaproteiineihin perustuvien farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi, joilla on antimikrobinen, antiflogistinen tai vastaavasti antiallerginen vaikutus. Valmisteet sisältävät immunoglobuliinia A (IgA), immunoglobuliinia G (IgG) ja transferriiniä, jolloin siinä on IgA:n paino-osaa kohden 0,40 - 0,80 paino-osaa IgG:tä ja 0,15 - 0,45 paino-osaa transferriiniä. On osoittautunut, että sekä vaikutuksen voimakkuutta bakteeri- ja virusperäisiin taudinaiheuttajien suhteen että IgA- ja IgG-pitoisen valmisteiden vaikutusspektriä voidaan lisätä, kun se sisältää vielä lisäksi transferriiniä ja nämä kolme komponenttia IgA, IgG ja transferriini esiintyvät hakemuksessa esitetyissä painosuhteissa.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av farmaceutiska preparat med antimikrobiella, antiflogistiska resp. antiallergiska effekter på basen av plasmaproteiner. Preparaten innehåller immunglobulin A (IgA), immunglobulin G (IgG) och transferrin, varvid för varje viktdel av IgA det finns mellan 0,40 och 0,80, viktdelar IgG och mellan 0,15 och 0,45 viktdelar transferrin. Det har visat sig, att såväl verkans styrka på bakteriella och virala sjukdomsalstrare som verkningsspektret hos ett IgA- och IgG-haltigt preparat kan ökas, om det innehåller ytterligare transferrin och de tre komponenterna IgA, IgG och transferrin förekommer i det viktförhållanden som anges i ansökan.

Menetelmä plasmaproteiineihin perustuvan farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi

5 Keksintö liittyy plasmaproteiineihin perustuviin farmaseuttisiin valmisteisiin, joilla on antimikrobinen, antiflogistinen tai vastaavasti antiallerginen vaikutus. Etenkin keksintö koskee menetelmää tällaisten tuotteiden valmistamiseksi.

10 Immunoglobuliineihin perustuvia farmaseuttisia valmisteita käytetään jo bakteeri- ja virusinfektioiden profylaksiaan ja hoitoon. US-patenttijulkaisussa 4 335 099 esitetään esimerkiksi oraalisesti annettava valmiste, joka sisältää immunoglobuliinia A (IgA) ja immunoglobuliinia G (IgG) ja joka
15 soveltuu suolistoinfektioiden hoitoon. Edelleen on tunnettua, että immunoglobuliini-valmiste, jonka IgG- ja IgA-osuus koko globuliinista on 73 tai vastaavasti 26 %, voi vähentää kes-
kosten sairastumisvaaraa nekrotisoituvaan enterokoliittiin annettaessa sitä profylaktisesti (Martha M. Eibl et al., New
20 Journal of Medicine, 319, s. 1 - 7, 1988).

Samoin on osoitettu, että seerumilla on bakteriostaattinen vaikutus Staphylococcus aureukseen, jolloin tämä vaikutus riippuu seerumiin sisältyvän siderofiinin (transferriinin)
25 kyllästymisestä raudalla (Arthur L. Schade, Protides Biolog. Fluids; Proc. Colloq. 1961, 8, s. 261 - 263). Tämä raudalla rikastettu seeruminäyte sisältää IgA:n paino-osaa kohden 15
paino-osaa IgG:tä ja 2,6 paino-osaa transferriiniä ja vaikuttaa ainoastaan muutamia taudinaiheuttajia vastaan.

30 Kaikilla tunnetuilla IgA-pitoisilla farmaseuttisilla valmisteilla on myös suhteellisen kapea vaikutusspektri.

Keksinnön päämääränä on saada aikaan plasmaproteiineihin
45 perustuva, antimikrobisen vaikutuksen omaava farmaseuttinen valmiste, jolla on laaja vaikutusspektri. Tämän lisäksi tällä valmisteella tulee olla myös antiflogistinen ja antiallerginen vaikutus.

Keksinnön mukainen farmaseuttiselle valmisteelle on ominaista, että se sisältää immunoglobuliinia A (IgA), immunoglobuliinia G (IgG) ja transferriiniä, jolloin siinä on IgA:n paino-osaa kohden 0,40 - 0,80 paino-osaa IgG:tä ja 0,15 - 0,45 paino-osaa transferriiniä.

On osoittautunut, että sekä vaikutuksen voimakkuutta bakteeri- ja virusperäisiin taudinaiheuttajiin että IgA- ja IgG-pitoisuuden valmisteen vaikutusspektriä voidaan lisätä, jos se sisältää vielä lisäksi transferriiniä ja nämä kolme komponenttia IgA, IgG ja transferriini esiintyvät keksinnön mukaisissa painosuhteissa. Näitä suhteita voi verrata äidinmaidossa ja kolostrumissa (pihkamaito) esiintyviin suhteisiin.

Keksinnön mukaan aikaansaataavassa valmisteessa IgA esiintyy edullisesti muodossa, jossa se sisältää niin kutsuttua "Secretory Piece":ä, proteiinia, joka antaa IgA:lle kyvyn tunkeutua limakalvon läpi.

Keksinnön mukaan valmistettavan tuotteen eräälle edulliselle sovellutusmuodolle on tyypillistä, että se sisältää käyttövalmiin liuoksen millilitraa kohden 10 - 100 mg IgA:ta, 4 - 80 mg IgG:tä ja 1,5 - 45 mg transferriiniä.

Keksinnön edullisen sovellutusmuodon mukaan farmaseuttinen koostumus voidaan saada aikaan yhdessä tai useammassa valmistusvaiheessa, joissa inaktivoidaan tai vastaavasti poistetaan infektioosiset aineet, etenkin virukset.

Tässä hakemuksessa kuvattava valmiste soveltuu etenkin limakalvoinfektioiden, etenkin nekrotisoituvan enterokoliitin, tulehdusten ja allergioiden profylaksiaan ja terapiaan. Se voi lisäksi korvata äidinmaidon, joka välittää humoraalisen immunitetin imeväisille.

Keksinnön mukaisen valmisteen valmistamiseksi voidaan käyttää

kaupallisesti saatavaa IgA:ta ja IgG:tä, kaupallisesti saatavia IgA/IgG-sekavalmisteita ja kaupallisesti saatavaa transferriiniä.

5 Keksinnön mukaan

- IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävä plasmafraktio käsitellään infektioosisten aineiden inaktivoimiseksi tai saatetaan käsittelemättömässä muodossa kosketuksiin ioninvaihtimen kanssa IgA:n, IgG:n ja transferriinin adsorboimiseksi,
 - ioninvaihtimessa adsorboitu IgA, IgG ja transferriini pestään ja eluoidaan,
 - eluaatti alistetaan puhdistussaostukseen ei-toivottujen vieraiden proteiinien erottamiseksi puhdistetun IgA-, IgG- ja transferriini-pitoisen liuoksen aikaansaamiseksi,
 - saatu liuos käsitellään proteiinisaostusaineella IgA:n, IgG:n ja transferriinin saostamiseksi ja mahdollisesti esiintyvien infektiöosisten aineiden esi-inaktivoinnin aikaansaamiseksi,
 - saostettu IgA, IgG ja transferriini erotetaan, jäädytyskuivatetaan, käsitellään infektioosisten aineiden edelleeninaktivoimiseksi ja lopuksi käsitellään sinänsä tunnetulla tavalla oraalisesti, parenteraalisesti tai tooppisesti käytettäväksi farmaseuttisena valmisteena.
- 25 On osoittautunut, että mainittujen menetelmävaiheiden aikana infektioosisten aineiden, kuten virusten lähtöaineessa mahdollisesti esiintyvä titteri alenee. Tämä vaikutus on etenkin silloin selvä, kun keksinnön mukainen valmiste valmistetaan siten, että
- plasma tai plasmafraktiot käsitellään Cohnin menetelmän mukaisesti etanolilla Cohn II+III-fraktion erottamiseksi,
 - erotettu Cohn II+III-fraktio digeroidaan vesipitoisella puskurilla pH-arvossa 5,0 - 6,5 IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävän proteiiniseoksen uuttamiseksi,
 - uutettuun proteiiniseokseen lisätään etanolia ei-toivottujen vieraiden proteiinien saostamiseksi,

- saostetut vieraat proteiinit erotetaan IgA-, IgG- ja transferriini-pitoisen liuoksen aikaansaamiseksi,
- tämä IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävä liuos saatetaan kosketuksiin DEAE-ioninvaihtimen kanssa IgA:n, IgG:n ja transferriinin adsorboimiseksi,
- adsorboitu IgA, IgG ja transferriini pestään ja eluoidaan,
- saatu eluaatti käsitellään etanolilla IgA:n ja IgG:n saostamiseksi,
- saostunut IgA ja IgG erotetaan IgA- ja IgG-pitoisen sakan ja transferriini-pitoisen supernatantin muodostamiseksi,
- supernatantti tehdään happamaksi transferriinin saostamiseksi,
- saostettu transferriini erotetaan,
- erotetut sakat yhdistetään ja valmistetaan farmaseuttiseksi valmisteeksi.

Keksinnön mukaisen menetelmän tämä muunnelma johtaa silloin, kun infektioosisia aineita on mahdollisesti läsnä lähtöaineessa, titterin alenemiseen vähintään 29 logaritmiyksiköllä.

Seuraavassa selitetään lähemmin keksinnön mukaisen valmisteen valmistusta ja sen vaikutusta.

Valmistus

Esimerkki 1

100 l jäädytettyä ihmisen plasmaa sulatetaan, sakka (kryosakka) erotetaan ja supernatanttiin (kryosupernatantti) lisätään -2 °C:ssa ja pH-arvossa 7,0 etanolia 8 %:n konsentraatioon. Tällöin muodostuvan sakan erottamisen jälkeen supernatantin etanoli-konsentraatiota lisätään -5 °C:ssa 25 %:iin. Tällöin saostuva sakka (Cohn II+III-fraktio) uutetaan fosfaatti-asetatti-puskurilla ja siihen lisätään 12 % etanolia pH-arvossa 5,3 ja -2 °C:n lämpötilassa, jolloin muodostuu sakka, joka erotetaan. Supernatantti käsitellään pH-arvossa 6,0 - 6,5

anioninvaihtimella, kuten DEAE-Sephadexilla IgA:n, osittain IgG:n ja transferriinin adsorboimiseksi. Samoin adsorboidaan myös vielä muita proteiineja, kuten albumiinia.

5 Sitoutumattomien proteiinien poistamiseksi pestään, jolloin pesuvaiheen tehokkuuden kautta voidaan vaikuttaa lopputuotteen IgA:IgG-suhteeseen. Tämän jälkeen adsorboidut proteiinit eluoidaan fosfaattipuskuroidulla, 3 %:sella NaCl-liuoksella. Saatuun liuokseen lisätään pH-arvossa 6,4 - 6,5 ja -3 °C:n
10 lämpötilassa 20 % etanolia, heitetään pois tällöin muodostuva sakka ja supernatantin etanolikonsentraation lisäämiseksi 30 %:iin, jolloin IgA, IgG ja transferriini saostuvat.

15 Tämä sakka erotetaan, liuotetaan veteen ja siihen lisätään pH-arvossa 6,5 ja -5 °C:n lämpötilassa 25 % etanolia. Tällöin muodostuva sakka sisältää IgA:ta ja IgG:tä ja se erotetaan. Transferriini jää liuokseen ja se saostetaan säätämällä pH arvoon 5,5.

20 Sitten sakoissa määritetään tunnettujen menetelmien mukaisesti IgA-, IgG- ja transferriini-pitoisuudet ja sekoittamalla yhteen vastaavat määrät säädetään keksinnön mukainen koostumus, jolloin IgA:ta, IgG:tä ja/tai transferriiniä voidaan täydentää kaupallisesti saatavilla valmisteilla ja niihin
25 voidaan lisätä vielä farmaseuttisia lisäaineita.

30 Tämän jälkeen liuos jäädytyskuivatetaan, kostutetaan vedellä ja lämpökäsitellään 10 tunnin ajan 60 °C:ssa mahdollisesti esiintyvien taudinaiheuttajien tuhoamiseksi.

35 Jäädytyskuivatetun, lämpökäsitellyn jauheen saattamiseksi käyttömuotoon se joko liuotetaan NaCl-pitoiseen glukosiliuokseen, steriilisuodatetaan ja täytetään tai se voidaan tabletoida tai täyttää kapseliin oraalista käyttöä varten, jolloin kuitenkin tabletit ja kapselit on päällystettävä mahanestettä kestävillä päällysteillä.

Esimerkki 2

10 l:aan ihmisen plasmaa lisätään 140 g ammoniumsulfaattia
litraa kohden pH-arvossa 7,2. Sakan erottamisen jälkeen
5 ammoniumsulfaattikonsentraatiota lisätään 275 g:aan/l. Täl-
löin saostuva sakka liuotetaan 5 mmoolia/l:n asetaattipusku-
riin pH-arvossa 5,0, liukenematon osa erotetaan ja heite-
tään pois. Supernatantista eristetään IgA, IgG ja transfer-
riini ja konsentroidaan saostamalla 30 %:lla etanolia pH-ar-
10 vossa 6,6 ja -5 °C:ssa.

Valmisteen koostumus on seuraava:

15	IgA:ta	63 mg/ml
	IgG:tä	28 mg/ml
	transferriiniä	10 mg/ml

Virus-titterin alentaminen

20 Mahdollisesti lähtöplasmassa esiintyvien virusten keksinnön
mukaisen valmisteen valmistuksen aikana tapahtuvan inakti-
voinnin tai vast. poistamisen dokumentointia varten toistet-
tiin esimerkissä 1 esitetyt menetelmävaiheet, jolloin ennen
jokaista yksittäistä menetelmävaihetta näytteeseen säädettiin
25 määrätty virus-titteri (HIV) ja se määritettiin menetelmävai-
heiden suorittamisen jälkeen. Tulokset on esitetty taulukossa
1.

Vaihe 1: Kryosakan talteenotto

30 10 ml:aan ihmisen plasmaa lisättiin 1 ml HIV-1-virussuspen-
siota, joka sisälsi 10⁶ infektiyksikköä/0,5 ml (virussuspen-
sio I). Seos jäädytettiin -20 °C:ssa ja sulatettiin 0 -
2 °C:ssa. Muodostunut sakka erotettiin sentrifugoimalla.
35 Supernatantissa (kryosupernatantti) määritettiin virustitte-
ri, jossa oli 10⁴ infektiyksikköä/ml. Menetelmävaiheessa 1
saadaan siten aikaan virus-titterin aleneminen kymmenpotens-

silla.

Vaihe 2: Fraktiointi 8 %:sella etanolia

5 6 ml:aan kryosupernatanttia lisättiin 0,6 ml virus-suspensiota I. Seoksen lämpötila pidettiin -1...-2 °C:ssa ja siihen lisättiin 0,6 ml 96 %:sta etanolia (-20 °C), niin että esiintyy 8 %:nen etanolikonsentraatio. Muodostunut sakka erotettiin sentrifugoimalla. Supernatantissa määritettiin viruskonsentraatio, jossa oli 103 infektiokyökköä/ml, mikä merkitsee alenemista tekijällä 102.

Vaihe 3: Albumiinin erottaminen immunoglobuliineista

15 8 ml:aan vaiheen 2 supernatanttia lisättiin 0,8 ml HIV-1-virussuspensiota, joka sisälsi 107 infektiokyökkö/0,5 ml (virussuspensio II). Seoksen lämpötila pidettiin -5 °C:ssa ja siihen lisättiin 2,1 ml 96 %:sta etanoliliuosta 25 %:sen liuoksen aikaansaamiseksi. Muodostunut sakka erotettiin sentrifugoimalla. Liuotetussa sakassa (1 ml:ssa PBS:ää) ei voitu osoittaa yhtään virusta, mikä merkitsee alenemista tekijällä 106.

Vaihe 4: Uuttaminen ja saostus 12 %:sella etanolilla

25 1 g vaiheessa 3 saatua sakkaa suspendoitiin 30 ml:aan fosfaatti-asetatti-puskuria. 10 ml:aan tätä suspensiota lisättiin 1 ml virussuspensiota I. -2 °C:n lämpötilassa lisättiin 1,6 ml 96 %:sta etanoliliuosta, jolloin loppukonsentraatio oli 12 massa-%. Tämä suspensio sentrifugoitiin. Supernatantissa ei voitu osoittaa yhtään virusta, mikä vastaa alenemista tekijällä 105.

Vaihe 5: Adsorptio, pesu, eluointi

35 10 ml:aan vaiheen 4 supernatanttia lisättiin 500 mg DEAE-Sephadexia/g proteiinia, lisättiin 1 ml virussuspensiota II,

sekoitettiin -2 °C:ssa ja adsorbaatti erotettiin; Sephadex pestiin ja proteiinit eluoitiin. Virustititteri oli 103 infektiokyksikköä/ml, mikä vastaa alenemista tekijällä 103.

5 **Vaihe 6: Saostaminen 20 %:sella etanolilla**

5 ml:aan vaiheen 5 eluaattia lisättiin 0,5 ml virussuspensiota II, lisättiin 1,45 ml 96 %:sta etanoliliuosta, sekoitettiin -2 °C:ssa ja sakka sentrifugoitiin pois. Supernatantissa ei voitu osoittaa yhtään virusta (aleneminen: 106).

Vaihe 7: Saostaminen 30 %:sella etanolilla

15 5 ml:aan vaiheen 6 supernatanttia lisättiin 0,5 ml virussuspensiota ja sitten lisättiin 0,83 ml etanolia, sekoitettiin -5 °C:ssa ja sentrifugoitiin. Sakka liuotettiin 1 ml:aan puskuria. Yhtään virusta ei voitu osoittaa (aleneminen: 106).

20 Koko virustititteri aleni (menetelmävaiheiden 1 - 7 summa) siten vähintään määrällä 1029 (ks. taulukko).

Taulukko 1: Virustititterin aleneminen

Menetelmä- vaihe	Virustititteri inf.yk./ml		Virustititterin aleneminen
	ennen vaihetta	vaiheen jälkeen	
1	105	104	101
2	105	103	102
3	106	0	106
4	105	0	> 105
5	106	103	103
6	106	0	> 106
7	106	0	> 106
koko virustititterin aleneminen			> 29 =====

Vaikutus bakteereita vastaan

Keksinnön mukaisen valmisteen vaikutuksen tutkimiseksi bakteereiden suhteen käytettiin kolmea liuosta (a, b ja c), joiden koostumus on esitetty taulukossa 2:

Taulukko 2

Liuos	IgA	IgG	Transferriini
a	50	30	15
b	25	20	11
c	90	40	15

(luvut koskevat mg:aa/ml)

3 ml kulloinkin kyseessä olevaa liuosta a, b ja c ympätettiin pienissä putkissa kulloinkin 0,1 ml:lla erilaisia bakteerisuspensioita *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ja *Candida albicans*, ravisteltiin, pipetoitiin 2 x 0,1 ml petrimaljoihin ja kasteltiin ravinneagarilla tai vastaavasti *Candidan* kohdalla soijapapu-kaseiini-agarilla.

Koloniat laskettiin sen jälkeen, kun oli inkuboitu 0,5, 1, 3, 5 ja 24 tunnin ajan 20 - 25°C:ssa. Kaikki kolme valmistetta a, b ja c estivät kaikkien viiden bakteerin kasvun. Ainoastaan liuoksessa b kasvun esto *Escherichia coli* suhteen oli heikosti ilmenevä.

Vertailua varten testattiin albumiinin, kolmen IgA/IgG-seoksen ja transferriinin vaikutukset. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

		Staph. aur.	E.coli	Pseud. aerug.	Bac.sub.	Cand.alb.
5	albumiini (50 mg)	-	-	-	-	-
10	IgA (56 mg)	-	+	-	-	-
	IgG (2 mg)					
	IgA (75 mg)	+	-	-	-	+
	IgG (26 mg)					
15	IgA (3 mg)	-	-	-	+	-
	IgG (100 mg)					
20	transferriini (56 mg)	-	-	+	-	-
	transferriini (15 mg)	-	-	-	-	-
25	Luvut koskevat mg:aa/ml liuosta.					
	- : ei bakteerikasvun estoa					
	+ : bakteerikasvun esto					

Vaikutus viruksia vastaan

30 Keksinnön mukaisen valmisteen vaikutuksen toteamiseksi virus-
 ten suhteen kulloinkin 1 ml:aan yllä esitettyä liuosta a-
 lisättiin 0,1 ml HIV-, Sindbis- ja VSV-virussuspensiota,
 jäädytyskuivatettiin, kostutettiin ja kuumennettiin 10 tunnin
 ajan 60°C:ssa suljetuissa astioissa, jolloin virustitteri
 35 määritettiin ennen lämpökäsittelyä ja sen jälkeen. Tulokset
 on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4

5	Virus	Virustitteri	
		käsittelyn alussa	10 tunnin kuluttua
10	Sindbis	105	< 100,5
	VSV	104,4	< 100,5
	HIV	104	< 100,5

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä sellaisen plasmaproteiineihin perustuvan farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, jolla on antimikro-

5 binen, antiflogistinen tai vastaavasti antiallerginen vaikutus ja joka sisältää immunoglobuliinia A (IgA), immunoglobuliinia G (IgG) ja transferriiniä, jolloin siinä on IgA:n paino-osaa kohden 0,40 - 0,80 paino-osaa IgG:tä ja 0,15 - 0,45 paino-osaa transferriiniä, t u n n e t t u siitä

10 toimenpiteiden yhdistelmästä, että

- IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävä plasmafraktio käsitellään infektioosisten aineiden inaktivoimiseksi tai saatetaan käsittelemättömässä muodossa kosketuksiin ioninvaihtimen kanssa IgA:n, IgG:n ja transferriinin

15 adsorboimiseksi,

- ioninvaihtimessa adsorboitu IgA, IgG ja transferriini pestään ja eluoidaan,
- eluaatti alistetaan puhdistussaostukseen ei-toivottujen vieraiden proteiinien erottamiseksi puhdistetun IgA-,

20 IgG- ja transferriini-pitoisen liuoksen aikaansaamiseksi,

- saatu liuos käsitellään proteiinisäostusaineella IgA:n, IgG:n ja transferriinin saostamiseksi ja mahdollisesti esiintyvien infektioosisten aineiden esi-inaktivoinnin aikaansaamiseksi,

25

- saostettu IgA, IgG ja transferriini erotetaan, jäädytyskuivatetaan, käsitellään infektioosisten aineiden edelleeninaktivoimiseksi ja lopuksi käsitellään sinänsä tunnetulla tavalla oraalisesti, parenteraalisesti tai

30 tooppisesti käytettäväksi farmaseuttiseksi valmisteeksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

- plasma tai plasmafraktiot käsitellään Cohnin menetelmän mukaisesti etanolilla Cohn II+III-fraktion erottamiseksi,

35

- erotettu Cohn II+III-fraktio digeroidaan vesipitoisella

- puskurilla pH-arvossa 5,0 - 6,5 IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävän proteiiniseoksen uuttamiseksi,
- uutettuun proteiiniseokseen lisätään etanolia ei-toivottujen vieraiden proteiinien saostamiseksi,
 - 5 - saostetut vieraat proteiinit erotetaan IgA-, IgG- ja transferriini-pitoisen liuoksen aikaansaamiseksi,
 - tämä IgA:ta, IgG:tä ja transferriiniä sisältävä liuos saatetaan kosketuksiin DEAE-ioninvaihtimen kanssa IgA:n, IgG:n ja transferriinin adsorboimiseksi,
 - 10 - adsorboitu IgA, IgG ja transferriini pestään ja eluoidaan,
 - saatu eluaatti käsitellään etanolilla IgA:n ja IgG:n saostamiseksi,
 - saostunut IgA ja IgG erotetaan IgA- ja IgG-pitoisen sakan ja transferriini-pitoisen supernatantin muodostamiseksi,
 - 15 - supernatantti tehdään happamaksi transferriinin saostamiseksi,
 - saostettu transferriini erotetaan,
 - 20 - erotetut sakat yhdistetään ja valmistetaan farmaseuttiseksi valmisteeksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan farmaseuttinen koostumus, jossa IgA sisältää "Secretory Piece"-proteiinia.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan farmaseuttinen koostumus, joka sisältää käyttövalmiin liuoksen millilitraa kohden 10 - 100 mg, etenkin 45 - 55 mg IgA:ta, 4 - 80 mg, etenkin 25 - 35 mg IgG:tä ja 1,5 - 45 mg, etenkin 10 - 20 mg transferriiniä.

5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan farmaseuttinen koostumus inaktivoimalla tai vastaavasti poistamalla infektioosiset aineet, etenkin virukset yhdessä tai useammassa valmistusvaiheessa.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en plasmaproteinbaserad farmaceutisk sammansättning med en antimikrobiell, anti-flogistisk respektive antiallergisk verkan, som innehåller
- 5 immunglobulin A (IgA), immunglobulin G (IgG) och transferrin och varje IgA-viktdel uppvisar 0,40-0,80 viktdelar IgG och 0,15-0,45 viktdelar transferrin, k ä n n e t e c k n a t av den åtgärds kombination att
- 10 - en plasmafraktion, som innehåller IgA, IgG och transferrin behandlas för att inaktivera infektiösa ämnen eller bringas i obehandlad form i beröring med en jonbytare för att adsorbera nämnda IgA, IgG och transferrin,
 - 15 - det i jonbytaren adsorberade IgA:et, IgG:et och transferrinet tvättas och elueras,
 - eluatet underkastas en reningsfällning för att åtskilja icke-önskvärda främmande proteiner för att åstadkomma en renad IgA-, IgG- och transferrinhaltig lösning,
 - 20 - den erhållna lösningen behandlas med ett proteinutfällningsämne för att utfälla IgA, IgG och transferrin och för att åstadkomma en föraktivering av eventuellt existerande infektiösa ämnen,
 - 25 - det utfällda IgA:et, IgG:et och transferrinet separeras, frystorkas, behandlas för de infektiösa ämnas vidareaktivering och behandlas slutligen på ett i sig känt sätt till ett oralt, parenteralt eller topiskt användbart farmaceutiskt preparat.
2. Förfarande i enlighet med patentkrav 1, k ä n n e -
- 30 t e c k n a t av att
- plasma eller plasmafraktioner behandlas enligt Cohn-metoden med etanol för att separera en Cohn II+III-fraktion,
 - 35 - den separerade Cohn II+III-fraktionen digererar medelst en vattenhaltig buffert vid ett ph-värde från 5,0 till

- 6,5 för att extrahera en proteinblandning, som innehåller IgA, IgG och transferrin,
- till den extraherade proteinföreningen tillsätts etanol för att fälla ut icke-önskvärda främmande proteiner,
 - de extraherade främmande proteinerna separeras för att åstadkomma en IgA-, IgG- och transferrinhaltig lösning,
 - denna lösning, som innehåller IgA, IgG och transferrin, bringas i kontakt med en DEAE-jonbytare för att adsorbera IgA, IgG och transferrin,
 - det adsorberade IgA:et, IgG:et och transferrinet tvättas och elueras,
 - det erhållna eluatet behandlas med etanol för att fälla ut IgA och IgG,
 - det utfällda IgA:et och IgG:et separeras för att bilda en IgA- och IgG-haltig fällning och en transferrinhaltig supernatant,
 - supernatanten görs sur för att fälla ut transferrinet,
 - det utfällda transferrinet separeras,
 - de separerade fällningarna förenas och framställs till ett farmaceutiskt preparat.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att det framställs en farmaceutisk sammansättning, vari IgA innehåller "Secretory Piece"-protein.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att det framställs en farmaceutisk sammansättning, som innehåller per milliliter bruksfärdig lösning 10-100 mg, företrädesvis 45-55 mg, IgA, 4-80 mg, företrädesvis 25-35 mg, IgG och 1,5-45 mg, företrädesvis 10-20 mg, transferrin.

5. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t av att det framställs en farmaceutisk sammansättning genom att inaktivera

respektive avlägsna de infektiösa ämnena, företrädesvis virus i en eller flera framställningsskeden.

