



F1000096000B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLAGGNINGSSKRIFT 96000
C (45) **Patentti myönnetty**
Patent mellelat 25 04 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6
A 61K 38/49, 47/12, 47/18, 47/22, 47/26
(21) Patentihakemus - Patentansökning 913909
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 19.08.91
(24) Alkupaivä - Löpdag 19.12.90
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 19.08.91
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.01.96
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/EP90/02251
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
20.12.89 DE 3942143 P

(71) Hakija - Sökande

1. Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 112-132, 6800 Mannheim-Waldhof, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kohnert, Ulrich, Heubachweg 6, 8121 Habach, Germany, (DE)
2. Rudolph, Rainer, Färbergasse 19, 8120 Weilheim, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren O: Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

t-PA pro:n stabilointi
Stabilisering av t-PA pro

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 217379 (A 61K 37/54), EP A 211592 (A 61K 37/54), EP A 297294 (A 61K 37/54)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee glykosyloimattoman t-PA:n farmaseuttista valmistetta, jolla on entsyymaattinen aktiivisuus ainakin 0,1 MU/ml ja pH-arvo 4,5 - 6, ja joka sisältää sitraattia ja ainakin 1 yhdistettä joukosta: a) askorbiinihappo, b) EDTA, c) aminoyhdisteet, joilla on kaava R^1R^2N-R-X , jossa $X = SO_3H$, $CH(NH_2)-CO_2H$, CO_2H , H , NH_2 tai OH , $R = C_1-C_3$ -alkyleeni, C_3-C_6 -sykloalkyleeni tai bentsyliideeni, ja R^1 ja R^2 ovat toisistaan riippumatta H tai C_1-C_3 -alkyyli, d) guanidinovoihappo, e) dimetyylbiguanidi, f) arginiini, g) glukosamiini, fruktoosi, h) pyrimidiininukleosidit ja pyrimidiininukleotidit, i) 1 tai useammalla hydroksi-, keto- tai/ja muilla karboksiryhmillä substituoidut karboksyylihapot, samoin kuin lääkeainetta vaikuttavana aineena olevan glykosyloimattoman t-PA:n pohjalta, ja menetelmää sen valmistamiseksi.

Uppfinningen avser en farmaceutisk komposition av oglykosylerad t-PA med en enzymaktivitet av minst 0,1 MU/ml och ett pH-värde av 4,5 - 6, vilken komposition innehåller citrat och åtminstone en substans vald bland grupperna: a) askorbinsyra, b) EDTA, c) aminoföreningar med formeln R^1R^2N-R-X , där $X = SO_3H$, $CH(NH_2)-CO_2H$, CO_2H , H , NH_2 eller OH , $R = C_1-C_3$ -alkylen, C_3-C_6 -cykloalkylen eller bentsyliden, och R^1 och R^2 är oberoende av varandra H eller C_1-C_3 -alkyl, d) guanidinosmörtsyra, e) dimetylbiganid, f) arginin, g) glukosamin, fruktos, h) pyrimidinnukleosider och pyrimidinnukleotider, i) genom 1 eller flera hydroxi-, keto- eller/och andra karboxigrupper substituerade karbonsyror, likaså som ett läkemedel på bas av oglykosylerad t-PA såsom verksamt ämne, och ett förfarande för dess framställning.

t-PA pro:n stabilointi - Stabilisering av t-PA pro

Ihmisen kudospasminoogeniaktivaattorilla (t-PA) on suuri
5 terapeuttinen merkitys verihyytymien liuottamisessa, esimerkiksi sydäninfarkteissa. t-PA aikaansaa verihyytymien liukenemisen plasminogeenin aktivoinnilla plasmiiniksi. Plasmiini vuorostaan liuottaa fibriiniä, hyytyneen veren proteiinimatriisin pääkomponenttia.

10

Luonnollinen t-PA koostuu useammasta funktionaalisesta alueesta F, E, K1, K2 ja P. Alue P sisältää proteolyyttisesti aktiivisen keskuksen, joka aikaansaa plasminogeenin lohkeamisen plasmiiniksi. On jo tunnettua valmistaa eukariot-
15 tisissa ja prokariotissa soluissa geeniteknologisesti t-PA:ta tai erilaisia t-PA-mutaatioita, joissa 1 tai useita alueista F, E, K1 ja K2 on deletoitu. Tällöin t-PA-johdannaisia syntetisoidaan prokarioteista luonnolliselle t-PA:lle vastakohtana ei-glykosyloidussa muodossa.

20

Edelleen on tunnettua, että sokeriosalla on huomattava vaikutus proteiinien liukoisuuteen ja aggregoitumiseen (J. Biol. Chem. 263 (1988), 8832-8837). Nyt on keksitty, että glykosyloimaton t-PA on olennaisesti huonoliukoisempi kuin
25 glykosyloitu t-PA.

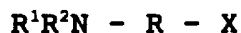
Glykosyloimaton t-PA (t-PA pro) liukenee vain hyvin huonosti proteiinien liuottamiseen tavallisesti käytettyihin pusku-
reihin kuten esimerkiksi 50 mmol/l Na-sitraattiin, 50 mmol/l
30 fosfaattiin tai fysiologiseen NaCl-liuokseen. t-PA pro:lla pitäisi terapeuttisena vaikuttavana aineena käyttöä varten kuitenkin olla suurempi entsymaattinen aktiivisuus ainakin 0,1 MU/ml, edullisesti 0,1 - 10 MU/ml. Aktiivisuus on määritelty laitoksen WHO, National Institute for Biological Standards and Control (ZGIMAL 42 (1987), 478-486) mukaisesti.
35

EP-patenttijulkaisusta A 0217379 on tunnettua korottaa pro-kariooteista saadun t-PA:n liukoisuutta neutraaleilla tai hieman alkalisilla arginiiniformuloinneilla. Eräs tämän menetelmän haitta on kuitenkin, että t-PA pro:n hyviä liukoisuuksia voidaan saavuttaa vain hyvin korkeilla arginiinikonsentraatioilla.

Siten keksinnön tehtävänä on kehittää farmaseuttisia valmisteita, jotka sisältävä t-PA pro:ta aktiivisuudella yli 0,1 MU/ml, jolloin t-PA pro:n on oltava stabiilia pitemmän ajanjakson.

Keksinnön mukainen tehtävä ratkaistaan glykosyloimattoman t-PA:n farmaseuttisella valmisteella, jonka entsyymattinen aktiivisuus on ainakin 0,1 MU/ml pH-arvolla 4,5 - 6, jolloin tämä koostumus sisältää sitraattia ja ainakin yhtä yhdistettä joukosta

- a) askorbiinihappo,
- b) EDTA,
- 20 c) aminoyhdisteet, joilla on kaava



jossa X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ tai OH, R = C₁-C₆-alkyleeni, C₃-C₆-sykloalkyleeni tai bentsylideeni, ja R¹ ja R² ovat toisistaan riippumatta H tai C₁-C₃-alkyyli,

- d) guanidinovoihappo,
- e) dimetyylibiguanidi,
- f) arginiini,
- 30 g) glukosamiini, fruktoosi,
- h) pyrimidiininukleosidit ja pyrimidiininukleotidit,
- i) 1 tai usealla hydroksi-, keto- tai/ja muilla karboksiryhmillä substituoidut karboksyylihapot.

35 t-PA pro:lla ymmärretään tämän keksinnön mukaisesti t-PA, joka alkaa aminohapoilla -3 (Gly) - +1 (Ser) ja loppuu aminohapolla 527 (Pro) (nimeäminen: Harris, Protein Enginee-

ring, nide 1 (1987) 449-458). t-PA pro on saatavissa PCT-patenttijulkaisussa WO 87/02673 kuvatulla menetelmällä.

t-PA pro:n liuottamiseen on erityisen sopiva sitraattipuskuri. Sitraatti-ionien konsentraation on oltava ainakin 5
5 mmol/l, edullisesti 5 - 100 mmol/l, erityisen edullisesti sitraatti-ionien konsentraatio on 50 mmol/l. pH-arvo säädetään kulloinkin käytetyn yhdisteen emäksisyyden mukaan edullisesti HCl:llä tai emäksellä kuten esimerkiksi NaOH tai
10 KOH.

Yllättäen todettiin, että glykosyloimattoman t-PA:n liukoisuus muissa puskurijärjestelmissä, esimerkiksi fosfaattipuskurissa, on olennaisesti vähäisempi samalla iovivahvuudella
15 ja samalla pH-arvolla. On osoittautunut sopivaksi säätää alkalisten sitraattiliuosten pH-arvo HCl:llä, ts., että koostumus sisältää lisäksi vielä kloridi-ioneja. t-PA pro:n erittäin konsentroidut liuokset ovat nimittäin kloridi-ionien läsnä ollessa yllättäen olennaisesti stabiilimpia kuin
20 esimerkiksi fosfaatti-ionien läsnä ollessa. Happamien sitraattiliuosten pH-arvo säädetään tavallisesti NaOH:lla.

Keksinnön mukaiselle koostumukselle sopiva on pH-arvo välillä 4,5 ja 6,5, edullinen on pH-arvo 6.
25

Keksinnön mukaisessa koostumuksessa aminoyhdisteinä edullisesti käytettyjä ovat tauriini, 4-aminobutanoli-1, 5-aminopentanoli-1, 6-aminohexanoli-1, 1,9-diaminononaani, 1,8-diamino-oktaani, 1,7-diaminoheptaani, 1,6-diaminoheksaani,
30 1,5-diaminopentaani, 1,4-aminobutaani, 1,3-aminopropaani, lyysiini, ornitiini, 8-amino-oktaanihappo, 7-aminoheptaanihappo, ϵ -aminokapronihappo, δ -aminovaleriaanahappo, γ -aminovoihappo, traneksaamihappo tai p-aminometyylilibentsoehappo. Tauriinin ja analogisten yhdisteiden edullinen konsentraatio
35 on 0,1 - 0,5 mol/l, erityisen edullisesti 0,1 - 0,3 mol/l. 4-aminobutanoli-1:tä, 5-aminopentanoli-1:tä, 6-aminohexanoli-1:tä, 1,9-diaminononaania, 1,8-diamino-oktaania, 1,7-

- di-aminoheptaania, 1,6-diaminoheksaania, 1,5-diaminopentaa-
nia, 1,4-diaminobutaania tai 1,3-diaminopropaania käytetään
edullisesti tasolla 10 - 100 mmol/l. Lysiiniä, ornitiinia,
8-amino-oktaanihappoa, 7-aminoheptaanihappoa, ϵ -aminokap-
5 ronihappoa, δ -aminovaleriaanahappoa, γ -aminovoihappoa, tra-
neksaamihappoa tai p-aminometyylilibentsoehappoa käytetään
edullisesti tasolla 0,5 - 20 mmol/l, erityisen edullisesti 1
- 10 mmol/l.
- 10 1 tai usealla hydroksi-, keto- tai/ja muilla karboksiryhmil-
lä substituotuna karboksyylihappona käytetään esimerkiksi
omenahappoa, maitohappoa, fumaarihappoa tai oksoglutaarihap-
poa. Näitä aineita käytetään edullisesti tasolla 1 - 1000
mmol/l, erityisen edullisesti 10 - 500 mmol/l.
- 15 Guanidinovoihappoa tai arginiinia käytetään edullisesti
tasolla 10 - 200 mmol/l, erityisen edullisesti 50 - 100
mmol/l. Dimetyylilibiguanidin konsentraatio on 50 - 400
mmol/l, edullisesti 100 - 300 mmol/l.
- 20 EDTA:ta käytetään edullisesti tasolla 1 - 100 mmol/l, eri-
tyisen edullisesti 10 - 100 mmol/l. Askorbiinihappoa käyte-
tään edullisesti tasolla 0,1 - 1 mol/l, erityisen edullises-
ti 0,2 - 0,3 mol/l.
- 25 Glukosamiinia ja fruktoosia käytetään edullisesti konsent-
raatioissa 1 - 500 mmol/l, erityisen edullisesti 10 - 300
mmol/l.
- 30 Pyrimidiininukleosideina ja pyrimidiininukleotideina ovat
sopivia esimerkiksi tymidiini, sytosiini ja uridiini tai
vastaavat nukleotidit. Niitä käytetään edullisesti konsent-
raatioissa 1 - 300 mmol/l, erityisen edullisesti 10 - 300
mmol/l.
- 35

Edelleen keksintö koskee keksinnön mukaista koostumusta, joka sisältää lisäksi 1 tai useaa aminohappoa, erityisesti histidiiniä.

- 5 Seuraavassa esitetään joukko erityisen edullisia keksinnön mukaisia valmisteita.

10 Eräs formulaatio sisältää 50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH:ta, pH 6, ja 0,1 - 0,3 mol/l tauriinia. Edullinen on myös formulaatio, jossa on 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 0,2 - 0,3 mol/l askorbiinihappoa.

15 Edelleen edullinen on formulaatio, joka sisältää 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 1 - 10 mmol/l 7-aminoheptaanihappoa, 8-amino-oktaanihappoa, p-aminometyylilibentsoehappoa, ε-aminokapronihappoa, δ-aminovaleriaanahappoa, γ-amino-

20 Edelleen erityisen edullisia ovat myös formulaatiot, jotka sisältävät 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6,0, ja 50 - 100 mmol/l guanidinovoihappoa tai arginiinia.

25 Edullinen on myös formulaatio, joka sisältää 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 10 - 100 mmol/l EDTA:ta. Eräs toinen formulaatio sisältää puolestaan 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 100 - 300 mmol/l dimetyylilibiguanidia.

30 Edelleen eräs formulaatio sisältää 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 10 - 300 mmol/l tymidiiniä, sytosiinia tai uridiinia. Eräs toinen formulaatio sisältää puolestaan 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 10 - 100 mmol/l 4-aminobutanoli-1:tä, 5-aminopentanolli-1:tä, 6-aminohexanolli-1:tä, 1,9-diaminononaania, 1,8-diamino-oktaania, 1,7-diaminoheptaaania, 1,6-diaminoheksaaania, 1,5-diaminopentaania, 35 1,4-diaminobutaania tai 1,3-diaminopropaania. Edelleen eräs formulaatio sisältää 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 10 - 300 mmol/l fruktoosia tai glukosamiinia.

Lopuksi sisältää edelleen eräs formulaatio 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 10 - 500 mmol/l omenahappoa, maitohappoa, fumaarihappoa tai 2-oksoglutaarihappoa.

- 5 Myös useamman edellä mainitun yhdisteen yhdistelmät sitraatin kanssa saavat aikaan t-PA-aktiivisuutta omaavien proteiinien erittäin hyvän liukoisuuden.

10 Keksintö koskee lopuksi myös lääkettä vaikuttavana aineena t-PA-aktiivisuutta omaavan proteiinin pohjalta liuoksessa tai lyofilisaattina ilmoitettujen vaikuttavien aineiden ja mahdollisesti myös muiden farmaseuttisesti yhteensopivien lisä-, apu-, kantaja- ja täyteaineiden kanssa.

15 Keksinnön mukaisia farmaseuttisia valmisteita käytetään edullisesti injektio- ja infuusioliuoksina. Tämä voi tapahtua siten, että saatetaan käyttöön jo injektioon valmis liuos, joka sisältää keksinnön mukaista koostumusta. On kuitenkin myös mahdollista saattaa farmaseuttiset valmisteet
20 käyttöön lyofilisaattien muodossa. Nämä voidaan sitten muodostaa uudelleen sinänsä tunnetuilla, injektiotarkoituksiin sopivilla aineilla tai liuoksilla. Injektioväliaineena käytetään edullisesti vettä, joka sisältää injektiooliuoksissa tavallisia lisäaineita kuten stabilointiaineita, liuoksenvälittäjiä, puskureita ja isotonisia lisäaineita, esimerkiksi
25 fysiologisen NaCl-konsentraation. Tällaisia lisäaineita ovat esimerkiksi mannitoli, tartraatti- tai sitraattipuskuri, etanoli, kompleksinmuodostajat kuten esimerkiksi etyleeni-diamiinitetraetikkahappo ja sen ei-toksiset suolat, soamoin
30 kuin suurimolekyyliset polymeerit, kuten nestemäinen polyetyleenioksidi viskositeetin säätöön. Injektiooliuoksiin tarkoitettujen nestemäisten kantajien on oltava steriilejä, ja ne täytetään edullisesti ampulleihin.

35 Lopuksi keksintöön kuuluu myös t-PA pro:n käyttö keksinnön mukaisten farmaseuttisten valmisteiden valmistukseen.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksinnön konkreettista suorit-
tamista vielä edelleen.

Esimerkki 1

5 t-PA pro:n liukoisuus

Puhdistettua t-PA pro:ta (liuotettuna 0,5 mol/l arginii-
ni/H₃PO₄:ssä, pH 7,2) konsentroidaan ultrasuodatuksella YM
10-membraanilla (Amicon). 1 ml konsentraattia (aktiivisuus:
2,4 MU/ml) dialysoidaan kulloinkin taulukossa 1 esitettyjä
10 puskureita vastaan. Näytteiden sentrifugoinnin jälkeen mita-
taan päällä olevan kirkkaan kerroksen entsymaattinen aktii-
visuus.

Entsymaattinen aktiivisuus esitetään tilavuusyksikkönä yksi-
15 kössä MU/ml ja kokonaisaktiivisuutena yksikössä MU.

tPA-aktiivisuuden mittaaminen voi tällöin tapahtua tavallisella
tavalla kromogeenisen substraatin lohkaisemisella (H. Lill,
ZGIMAL 42 (1987), 478-486). Yksikkö U on aktiivisuuden yk-
20 sikkö laitoksen WHO, National Institute for Biological Stan-
dards and Control määritelmän mukaan.

Taulukko 1

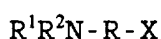
25	puskuri	aktiivisuus	
		MU/ml	MU
30	50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH, pH 6 0,3 mol/l tauriini	0,34	0,20
	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6 0,3 mol/l fruktoosi	0,12	0,07
35	50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH, pH 6 0,3 mol/l askorbiinihappo	0,34	0,18

	50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH, pH 6	0,18	0,22
	50 mmol/l EDTA		
	50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH, pH 6	0,26	0,29
5	100 mmol/l EDTA		
	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6	0,29	0,37
	50 mmol/l 1,6-diaminoheksaani		
10	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6	0,29	0,36
	50 mmol/l 5-aminopentanol		
	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6	0,27	0,28
	0,3 mol/l glukosamiini		
15	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6	0,16	0,21
	0,1 mol/l tymidiini		
	50 mmol/l Na-sitraatti/HCl, pH 6	0,07	0,09
20	50 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /H ₃ PO ₄ , pH 6	0,02	0,03
	50 mmol/l Na-sitraatti/NaOH, pH 6	0,19	0,19
	0,3 mol/l fumaarihappo		
25			

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä glykosyloimattoman t-PA:n farmaseuttisen valmisteen, jolla on entsyymaattinen aktiivisuus ainakin 0,1 MU/ml ja pH-arvo 4,5 - 6, valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että glykosyloimaton t-PA-johdannainen liuotetaan sitraatin ja vähintään yhden seuraavista yhdisteistä kanssa:
- askorbiinihappo,
 - EDTA,
 - aminoyhdisteet, joilla on kaava

10



- jossa X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ tai OH, R= C₁-C₉-alkyleeni, C₃-C₆-sykloalkyleeni tai bentsylideeni, ja R¹ ja R² ovat toisistaan riippumatta H tai C₁-C₃-alkyyli,
- guanidinovoihappo,
 - dimetyyllibiguanidi,
 - arginiini,
 - glukosamiini, fruktoosi,
 - pyrimidiininukleosidit ja pyrimidiininukleotidit,
 - yhdeällä tai usealla hydroksi-, keto- tai/ja muulla karboksiryhmällä substituoidut karboksyylihapot, ja saatu liuos saatetaan sopivaan farmaseuttiseen antomuotoon.

25

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että aminoyhdiste on tauriini, 4-aminobutanoli-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminoheksanol-1, 1,9-diaminononaani, 1,8-diamino-oktaani, 1,7-diaminoheptaani, 1,6-diaminoheksaani, 1,5-diaminopentaani, 1,4-aminobutaani, 1,3-aminopropaani, lyysiini, ornitiini, 8-amino-oktaanihappo, 7-aminoheptaanihappo, ε-aminokapronihappo, δ-aminovaleriaanahappo, γ-aminovoihappo, traneksaamihappo tai p-aminometyyllibentsoehappo.

35

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdellä tai usealla hydroksi-, keto- tai/ja muulla karboksiryhmällä substituoitu karboksyylihappo on omenahappo, maitohappo, fumaarihappo tai 2-oksoglutaarihappo.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lisätään lisäksi yksi tai useita aminohappoja.
5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sitraattikonsentraatio on 5 - 100 mmol/l, edullisesti 50 mmol/l.
6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lisätään lisäksi kloridi-ioneja.
- 10 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 0,1 - 1 mol/l, edullisesti 0,2 - 0,3 mol/l, askorbiinihappoa.
- 15 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 1 - 200 mmol/l, edullisesti 10 - 100 mmol/l, EDTA:ta.
- 20 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 0,1 - 0,5 mol/l, edullisesti 0,1 - 0,3 mol/l, tauriinia.
- 25 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 0,5 - 20 mmol/l lysiiniä, ornitiinia, 8-amino-oktaanihappoa, 7-aminoheptaanihappoa, ϵ -aminokapronihappoa, δ -aminovalerianahappoa, γ -aminovoihappoa, traneksaamihappoa tai p-aminometyylilibentsoehappoa.
- 30 11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja 10 - 100 mmol/l 4-aminobutanoli-1:tä, 5-aminopentanolli-1:tä, 6-aminoheksanolli-1:tä, 1,3-diaminopropaania, 1,4-diaminobutaania, 1,5-diaminopentaania, 1,6-diaminoheksaania, 1,7-diaminoheptaania, 1,8-diamino-oktaania tai 1,9-diaminononaania.
- 35 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja

10 - 200 mmol/l, edullisesti 50 - 100 mmol/l, guanidinovoi-
happoa tai arginiinia.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
5 tä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää ja 50 - 400
mmol/l, edullisesti 100 - 300 mmol/l, dimetyylilibiguanidia.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
tätä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja
10 1 - 500 mmol/l, edullisesti 10 - 300 mmol/l, glukosamiinia
tai fruktoosia.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
tätä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraatti/HCl:ää, pH 6, ja
15 1 - 300 mmol/l, edullisesti 10 - 300 mmol/l, tymidiiniä, sy-
tosiinia tai uridiinia.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
tätä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja 0,001 -
20 1 mol/l, edullisesti 0,01 - 0,5 mol/l, omenahappoa, maito-
happoa, fumaarihappoa tai 2-oksoglutaarihappoa.

17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
tätä, että käytetään 50 mmol/l Na-sitraattia, pH 6, ja yhdis-
25 telmää patenttivaatimuksen 1 ryhmien a) - i) aineista.

18. Jonkin patenttivaatimuksista 1-17 mukainen menetelmä,
tunnettu siitä, että koostumukseen lisätään lisäksi taval-
30 lisia farmaseuttisia lisä-, apu- tai/ja kantaja-aineita.

19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** sii-
: tätä, että farmaseuttinen antomuoto on injektiooliuos tai lyo-
filisaatti.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett farmaceutiskt preparat av oglykosylerad t-PA med ett enzymatiskt aktivitet minst 0,1 MU/ml och pH-värde 4,5-6, **kännetecknat** av att det
5 oglykosylerade t-PA derivatet löses med citrat och åtminstone ett av följande ämnen:

- a) ascorbinsyra,
- b) EDTA,
- c) aminoföreningar med formeln



vari X = SO₃H, CH(NH₂)-CO₂H, CO₂H, H, NH₂ eller OH, R = C₁-C₉-alkylen, C₃-C₆-cykloalkylen eller bensyliden, och R¹ och R² är oberoende av varandra H eller C₁-C₃-alkyl,

- d) guanidinosmörtsyra,
- 15 e) dimetylbiguanid,
- f) arginin,
- g) glukosamin, fruktos,
- h) pyrimidinnukleosider och pyrimidinnukleotider,
- i) karboxylsyror substituerade med en eller flera hydroxi-,
20 keto- och/eller annan karboxigrupp,
och erhållen lösning bringas i en lämplig farmaceutisk doseringsform.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
25 aminoföreningen är taurin, 4-aminobutanol-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminohexanol-1, 1,9-diaminononan, 1,8-diaminooktan, 1,7-diaminoheptan, 1,6-diaminohexan, 1,5-diaminopentan, 1,4-aminobutan, 1,3-aminopropan, lysin, ornitin, 8-aminooktansyra, 7-aminoheptansyra, E-aminokapronsyra, δ-aminovaleriansyra, γ-aminosmörtsyra, tranexamsyra eller p-aminometylbensoesyra.
30

3. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
karboxylsyran substituerad med en eller flera hydroxi-, keto- och/eller annan karboxigrupp är äppelsyra, mjölksyra,
35 fumarsyra eller 2-oxoglutarsyra.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man tillsätter en eller flera aminosyror.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att citratkoncentrationen är 5 - 100 mmol/l, företrädesvis 50 mmol/l.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, **kännetecknat** av att man vidare tillsätter kloridjoner.

10

7. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat, pH 6, och 0,1 - 1 mol/l, företrädesvis 0,2 - 0,3 mol/l, askorbinsyra.

15 8. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat, pH 6, och 1 - 200 mmol/l, företrädesvis 10 - 100 mmol/l, EDTA.

20 9. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat, pH 6, och 0,1 - 0,5 mol/l, företrädesvis 0,1 - 0,3 mol/l, taurin.

25 10. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl, pH 6, och 0,5 - 20 mmol/l lycin, ornitin, 8-aminooktansyra, 7-aminoheptansyra, E-aminokapronsyra, δ -aminovaleriansyra, γ -aminosmörtsyra, tranexamsyra eller p-aminometylbensoesyra.

30 11. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl, pH 6, och 10 - 100 mmol/l 4-aminobutanol-1, 5-aminopentanol-1, 6-aminohexanol-1, 1,3-diaminopropan, 1,4-diaminobutan, 1,5-diaminopentan, 1,6-diaminohexan, 1,7-diaminoheptan, 1,8-diaminooktan eller 1,9-diaminononan.

35

12. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl, pH 6, och 10 - 200

mmol/l, företrädesvis 50 - 100 mmol/l, guanidinosmörtsyra eller arginin.

13. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
5 man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl och 50 - 400 mmol/l, företrädesvis 100 - 300 mmol/l, dimetylbiganid.

14. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
10 man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl, pH 6, och 1 - 500 mmol/l, företrädesvis 10 - 300 mmol/l, glukosamin eller fruktos.

15. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
15 man använder 50 mmol/l Na-citrat/HCl, pH 6, och 1 - 300 mmol/l, företrädesvis 10 - 300 mmol/l, tymidin, cytosin eller uridin.

16. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att man
20 använder 50 mmol/l Na-citrat, pH 6, och 0,001 - 1 mol/l, företrädesvis 0,01 - 0,5 mol/l, äppelsyra, mjölksyra, fumar-syra eller 2-oxoglutarsyra.

17. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
25 man använder 50 mmol/l Na-citrat, pH 6, och en kombination av ämnen av grupper a) - i) i patentkrav 1.

18. Förfarande enligt något av patentkraven 1-17, **kännetecknat** av att till sammansättningen tillsätts vidare kon-
ventionella farmaceutiska tillsats-, hjälp- och/eller bärar-
30 ämne.

19. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att
den farmaceutiska doseringsformen är en injektionlösning eller lyofilisat.