



F1000092905B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****92905****C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 01 1993**

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 35/42, 31/685, 37/02**S U O M I - F I N L A N D****(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	881508
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	30.03.88
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	30.03.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	09.10.88
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	14.10.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
08.04.87 IT 20032/87 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Chiesi Farmaceutici S.p.A., Via Palermo, 26/A, Parma, Italia, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Robertson, Bengt, c/o Dept. of Pediatrics and Pediatric Pathology St. Göran's Hospital,
Box 12500, 112 81 Stockholm, Sverige, (SE)
2. Curstedt, Tore, c/o Dept. of Pediatrics and Pediatric Pathology St. Göran's Hospital,
Box 12500, 112 81 Stockholm, Sverige, (SE)

(74) Asiamies - Ombud: Forssén & Salomaa Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä eläinperäisen keuhkojen pinta-aktiivisen aineen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett ytaktivt ämne för lungor**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 81261 (A 61K 35/42), EP A 119056 (A 61K 31/685), GB A 2050832 (A 61K 31/685),
US A 4397839 (A 61K 35/12)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu eläinperäiseen keuhkojen pinta-aktiiviseen aineeseen, joka muodostuu suureksi osaksi (noin 99 %) fosfolipideistä sekä proteiinifraktiosta, ja jonka tunnusomainen piirre on hiilihydraattien ja kolesterolin puuttuminen.

Keksinnön mukainen pinta-aktiivinen aine saadaan suodattamalla, sentrifugoimalla, uuttamalla ja käsittelemällä kromatografisesti käänteisfaasia käyttäen, ja sillä saavutetaan parempia lääkinällisiä tuloksia hoidettaessa imeväisten ja aikuisten hengityselinten toimintahäiriöitä (IRDS ja ARDS).

Uppfinningen avser ett ytaktivt ämne för lungor av djursprung, som till en stor del ($\approx 99\%$) består av fosfolipider samt en proteinfraaktion och vars karakteristiska drag är avsaknad av kolhydrater och kolesterol.

Det ytaktiva ämnet enligt uppfinningen fås genom filtrering, centrifugering och extrahering och kromatografisk behandling genom att använda sig av en invers fas, och med uppfinningen uppnås bättre medicinska resultat då man behandlar funktionsstörningar i andningsorganen hos spädbarn och vuxna (IRDS och ARDS).

Menetelmä eläinperäisen keuhkojen
 pinta-aktiivisen aineen valmistamiseksi
 Förfarande för framställning av
 ett ytaktivt ämne för lungor

5

Keksinnön kohtena on menetelmä eläinperäisen keuhkojen pinta-aktiivisen aineen valmistamiseksi, joka muodostuu polaarista lipidifraktiosta, joka muodostuu pääasiassa fosfolipideistä, joka fosfolipidifraktio muodostuu vähintään 70-75 painoprosenttisesti fosfatidyylikoliinista, joka puolestaan muodostuu vähintään 40-45 painoprosenttisesti dipalmitoyylidifosfatidyylikoliinista, sekä proteiinifraktiosta, joka muodostuu yksinomaan proteiineista, joiden molekyylipaino on pieni, 3-14 kilodaltonia, jota polaarista lipidifraktiota on läsnä vähintään 98,5 paino-%, sen muodostuessa puolestaan pääasiassa, vähintään 95-prosenttisesti, fosfolipidien seoksesta.

Keksintö kohdistuu eläimestä peräisin olevaan keuhkojen pinta-aktiiviseen valmisteeseen (KPA), jonka toksisuus on vähäinen, ja jonka pinta-aktiiviset ominaisuudet ovat optimaaliset, ja jota voidaan käyttää imeväisten hengityselinten toimintahäiriön (Infant Respiratory Distress Syndrome; IRDS) ja aikuisten hengityselinten toimintahäiriön (Adult Respiratory Distress Syndrome) estämiseen ja hoitamiseen, joka hengityselinten toimintahäiriö liittyy hyaliinikalvon sairauteen (Hyaline Membrane Disease; HMD).

Keuhkojen normaali toiminta riippuu erityisen materiaalin, eli keuhkojen pinta-aktiivisen aineen, läsnäolosta, jonka pinta-aktiivisen aineen tehtävänä on alveolien stabiloiminen pintajännitystä pienentämällä, erityisesti uloshengitysvaiheen aikana.

Keuhkojen pinta-aktiivisen aineen läsnäolo on erityisen tärkeätä syntymähetkellä. KPA:n puuttuminen on IRDS-taudin, josta 10-15 % keskosista kärsii syntymähetkellä, syntymisen avaintekijä. Näiden keskosten hengityksestä on huolehdittava keinotekoisesti käyttäen suuria happipitoisuuksia ja suuria sisäänpuhalluspaineita. IRDS-tilan kuolleisuus on noin 25 % ja monet eloonjääneet kärsivät keuhkojen kroonisista komp-

likaatioista, jotka johtuvat pääasiassa pitkäaikaisesta keinotekoisesta hengityksestä, sekä sekundaarisista neurologisista vajaatoiminnoista, jotka johtuvat aivojen vaurioitumisesta hapen niukkuuden seurauksena.

- 5 Keuhkojen pinta-aktiivisen aineen puute on myös ARDS-tilan tärkeä tekijä. Tämä sairaalloinen tila voi kehittyä lukuisten vammojen, sisäänhengityksen, haimatulehduksen, jne. tapauksessa, kuolleisuuden ollessa 40-70 %.
- 10 Puuttuvan pinta-aktiivisen aineen korvaavien annosten antaminen on osoittautunut käyttökelpoiseksi näitä patologisia tiloja hoidettaessa.

Alalla tunnetut pinta-aktiiviset aineet kuuluvat kolmeen perusryhmään:

15 1. Keinotekoiset keuhkojen pinta-aktiiviset aineet

Keinotekoisia pinta-aktiivisia valmisteita, jotka perustuvat dipalmi-
toyylydyfosfokoliinin tai fosfolipidin pitoisuuksiltaan ja suhteiltaan
erilaisiin seoksiin, joihin on valinnaisesti yhdistetty muita kompo-
20 nentteja kuten sokereita, aminohappoja, alkoholeja tai rasvahappoja, on
kuvattu monissa patenttijulkaisuissa:

DE 2900300 (Klitzing LV); JP 58222022 (Teijin KK); EP 110498;
US 4312860 (University of California); DE 3229179 (Natterman A & Cie
GmbH); JP 61065821 (Tokyo Tanabe KK).

25

Keinotekoiset pinta-aktiiviset aineet eivät kuitenkaan osoittautuneet
kovinkaan tehokkaiksi kliinis-farmakologisessa käytössä.

2. Ihmisen keuhkojen pinta-aktiivinen aine

30

Tämä on saatu uuttamalla vesikalvonesteestä. Vaikka se onkin tehokas,
niin se on kuitenkin käytännössä lähes käyttökeltotonta johtuen sekä
sen suuresta proteiinipitoisuudesta (joka voi johtaa käsiteltävän koh-
teen herkistymiseen) että vaikeudesta valmistaa sitä suuria määriä,
35 sillä yhden annoksen saaminen edellyttää vesikalvonesteen ottamista
kolmesta loppuvaiheesta olevasta raskaudesta. Siihen liittyy myös suuri

viruskontaminaation vaara, jolloin niinkin vakavien sairauksien kuin immuunikadon (AIDS) siirtyminen on mahdollista.

3. Luonnollinen keuhkojen pinta-aktiivinen aine

5

Tämä pinta-aktiivinen aine on uutettu nisäkkäiden keuhkoista ja sen tehokkuus on verrannollinen ihmisen pinta-aktiiviseen aineeseen, ja näin ollen sen etuna on valmistamisen yksinkertaisuus sekä pienempi proteiinipitoisuus.

10

Alalla on valmistettu aikaisemmin alkuperältään luonnollisia keuhkojen pinta-aktiivisia aineita eläimistä uuttamalla. Esimerkiksi patenttijulkaisuissa DE 3021006, JP 58045299 ja EP 119056 (Tokyo Tanabe KK) kuvataan suhteellisen monimutkainen menetelmä, joka johtaa monien toimenpiteiden, kuten toistuvien sentrifugointien (850 x g - 20 000 x g), lyofilisoinnin ja lukuisten uuttojen jälkeen luonnolliseen keuhkojen pinta-aktiiviseen aineeseen, joka sisältää fosfolipidien (75-95,5 %) ja proteiinien (0,5-5 %) lisäksi myös hiilihydraatteja (0,1-2 %), neutraaleja lipidejä (0,3-14 %) ja kokonaiskolesterolia (0-8 %), joilla komponenteilla ei ole mitään yhteyttä farmakologiseen vaikutukseen.

20

Samoin patenttijulkaisun EP 145005 mukaisesti valmistettu pinta-aktiivinen aine (VEB Arzneimittel Dresden) sisältää vieläkin suuremman prosenttisen osuuden (5-40 %) apolaarista lipidifraktiota, jolla ei ole mitään vaikutusta biologiseen aktiivisuuteen. Sen sijaan fosfolipidien, jotka sitä vastoin muodostavat tärkeimmän fysiologisen komponentin, pitoisuus siinä on pieni (40-70 %).

25

Lopuksi patenttijulkaisuissa EP 55041, JP 58183620, JP 58183621 ja JP 58164513 (Tejin KK) kuvataan luonnollisia, keinotekoisia tai puolittain luonnollisia (eli joihin on lisätty synteettisiä fosfolipidejä) pinta-aktiivisia aineita, joista proteiinit on poistettu täydellisesti. Kaikkein viimeaikaisimmat tutkimukset ovat selvittäneet, että proteiinien läsnäoloon liittyy huomattavaa toiminnallista merkitystä.

35

Pitkäaikaisten ja syväallisten tutkimusten, jotka käynnistettiin monia vuosia sitten, jälkeen hakija on saanut valmistetuksi uuden keuhkojen pinta-aktiivisen aineen, johon oheinen keksintö liittyy, ja jonka koostumus on optimaalinen tasapainoiselle farmakologiselle aktiivisuudelle.

5

Keksinnön mukaisella pinta-aktiivisen aineen valmistusmenetelmällä toivottu fraktio saadaan erotetuksi vain muutamalla toimenpiteellä eläinkeuhkoista lähtien.

10 Keksinnön mukainen menetelmä on pääasiassa tunnettu siitä, että

a) pinta-aktiivinen aine erotetaan kokonaisuudessaan hienoksi jauhe-
tuista ja suolaliuoksella pestyistä eläinkeuhkoista peräkkäisten suo-
datus-, sentrifugointi- ja uuttotoimenpiteiden avulla orgaanista liuo-
15 tinta käyttäen;

b) raaka lipidifraktio otetaan talteen haihduttamalla liuotin;

c) polaarinen lipidikomponentti erotetaan lopulta apolaarisesta kom-
20 ponentista geelikromatografisesti käänteisfaasilla LIPIDEX -5000^R (epi-
kloorihydriinillä ristosilloitettu dekstraanijohdannainen) täytetyllä
kolonnilla ja orgaanisella liuotinseoksella.

... Keksinnön mukaisella menetelmällä saadulla keuhkojen pinta-aktiivisella
... 25 aineella on seuraavat ominaisuudet:

a) suurin polaaristen lipidien, jotka ovat pääasiassa fosfolipidejä,
pitoisuus (99 %) muihin valmisteisiin verrattuna;

30 b) vapaat hiilihydraatit, kolesteroli, triglyseridit sekä kolestero-
liesterit, eli komponentit, jotka eivät vaikuta millään tavalla pinta-
aktiivisuuteen, puuttuvat niistä täysin (Suzuki Y., J. Lipid Res. 23,
62-69, 1982), kuten myöskin muut farmakologisesti katsoen tehottomat
neutraalit lipidit (Nohara K., Eur. J. Resp. Dis. 69, 321-335, 1986);

35

c) siinä on läsnä proteiinikomponenttia, jonka tunnusomaisena piirteenä on hydrofobisten aminohappojen erityisen suuri määrä, näiden aminohappojen suurimman pitoisuuden ollessa alle 1-1,5 %. Proteiini-osa muodostuu yksinomaan hydrofiilisista proteiineista, joiden molekyylipaino on 3-4 kilodaltonia, ja jotka ovat tärkeitä ajatellen fosfolipidien absorptiota ilman ja nesteen rajapinnalla.

Keksinnön mukaisella valmistusmenetelmällä saadaan toistettavasti ja teollisessa mitassa kannattavasti pinta-aktiivista ainetta, jolla on edellä esitetyt tunnusomaiset piirteet.

Hienoksi jauhetut eläinkeuhkot pestään fysiologisessa liuoksessa. Ne suodatetaan ja niitä sentrifugoidaan alueella 1000 - 5000 x g olevilla nopeuksilla yhdestä kolmeen tuntiin, nopeudesta riippuen. Pinta-aktiivinen aine uutetaan sitten orgaanisella liuottimella, joka on mielellään metyylialkoholin ja kloroformin 1:2-seosta. Orgaaninen faasi pestään vedellä ja haihdutetaan, jolloin saadaan raaka lipidifraktio, joka otetaan talteen orgaanisella liuottimella, tämän liuottimen ollessa edullisesti 1,2-dikloorietaanin ja dikloorimetaanin 1:4-seos. Tämän jälkeen fosfolipideistä muodostuva polaariset lipidikomponentit erotetaan geelikromatografisesti apolaarisesta komponentista, joka muodostuu triglyserideistä, kolesterolista ja kolesteroliestereistä.

Kliiniseen käyttöön tarkoitettu fosfolipidifraktio steriloidaan ultrasuodattamalla ja sitä säilytetään korkeintaan -20 °C:n lämpötilassa. Se voidaan vaihtoehtoisesti lyofilisoida ja säilyttää -20 °C:n lämpötilassa.

Oheisen keksinnön kohteena olevan pinta-aktiivisen aineen valmistusta havainnollistetaan seuraavassa yksityiskohtaisilla esimerkeillä, keksintöä kuitenkin millään tavalla rajoittamatta.

Esimerkki 1

Sian keuhkot jauhetaan hienoksi sekoittajassa ja kudokappaleet pestään fysiologisella liuoksella. Seos suodatetaan ja sitä sentrifugoi-

daan alustavasti nopeudella 1000 x g 20 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia solukappaleiden poistamiseksi. Tämän jälkeen supernatantiksi jäävää nestettä sentrifugoidaan uudestaan nopeudella 3000 x g 4 °C:n lämpötilassa 2 tuntia.

5

Raaka (kiinteä) pinta-aktiivinen aine poistetaan ja uutetaan kloroformin ja metyylialkoholin 2:1-seoksella (vol./vol.), suodatetaan, pestään vedellä ja orgaaninen faasi haihdutetaan, jolloin saadaan raaka lipidiuute. Lipidifraktion uute (1-1,5 g) otetaan talteen 20 millilitralla

10 1,2-dikloorietaanin ja metyylialkoholin 1:4-seosta (vol/vol) ja erotetaan kromatografisesti käänteisfaasilla Lipidex -5000 (4 x 21,5 cm; Packard Instruments Co.) täytetyllä kolonnilla, käyttäen eluenttina 1,2-dikloorietaanin ja metyylialkoholin 1:4-seosta (vol/vol), virtausnopeudella 60-90 ml/h. Fraktio 1 (0-270 ml) sisältää vain fosfolipidejä, fraktio 2 (270-405 ml) sisältää hieman fosfolipidejä ja muita polaarisia lipidejä, kun taas apolaariset lipidit (triglyseridit, kolesterolit ja sen esterit) jäävät kolonniin.

15

Fraktio 1 voidaan käyttää sellaisenaan.

20

Fraktion 2 sisältämät fosfolipidit voidaan ottaa talteen menettelemällä seuraavasti. Fraktio 2 kromatografoidaan uudestaan samalla kolonnilla ja ensimmäiseksi saatava fraktio (0-270 ml) yhdistetään edellisestä kromatografisesta käsittelystä saatuun fraktioon 1. Nämä kaksi yhdistettyä fraktiota kuivataan (alle 40 °C:n lämpötiloissa), liuotetaan kloroformin ja metyylialkoholin 98:2-seokseen (vol/vol), steriloidaan suodattamalla (esisuodatin 0,45 µm ja suodatin 0,2 µm), ja säilytetään pakastimessa -20 °C:n lämpötilassa.

...
...

25

30 Esimerkki 2

Esimerkissä 1 kuvatulla menetelmällä saatu fosfolipidifraktio sulatetaan steriileissä olosuhteissa, kuivataan ja suspendoidaan uudestaan fysiologiseen liuokseen käyttäen ultraääntä, jonka taajuus on sopiva, eli 45-50 kilohertsiä, energiatason ollessa 50 Wattia. Tämä on sangen kriittinen vaihe menetelmässä aktiivisen tuotteen saamiseksi, sillä

35

tietyissä tapauksissa ollaan varmistettu kokeellisesti, että jopa pienetkin vaihtelut ultraäänen taajuudessa saattavat vaikuttaa huomattavasti biologiseen aktiivisuuteen, vaikka tuotteen kemialliset ja fysiokemialliset ominaisuudet pysyvätkin muuttumattomina.

5

Tällä tavalla saatu suspensio laitetaan ampulleihin myöhempää lääkinnällistä käyttöä varten, pitoisuuden ollessa tällöin 80 mg fosfolipidijä/ml suolaliuosta. Esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla menetelmällä täysikasvuisen sian keuhkoista saadaan eristetyksi noin 200 mg keuhkojen pinta-aktiivista ainetta, eli suurin piirtein tuoteannos IRDS-tilan hoitamista varten. Suurempia annoksia tarvitaan ARDS-tilan hoitamiseen.

Kustakin tuote-erästä arvioitiin joka kerta fosfolipidien pitoisuus ja koostumus sekä muiden komponenttien määrä. Proteiinipitoisuus arvioitiin analysoimalla aminohapot.

Taulukossa I esitetään fosfolipidifraktion koostumus valmisteessa, joka saatiin esimerkissä 1 kuvatun menetelmän mukaisesti.

20 Taulukko I: Fosfolipidikoostumus pinta-aktiivisissa valmisteissa. Arvot esitetään keskiarvoina $\pm$ standardipoikkeama kuuden erän tapauksessa.

	Fosfolipidit
	Mooli-%
25	-----
	Fosfatidyylikoliini
	75,1 $\pm$ 3,3
	Fosfatidyylietanoliini
	7,5 $\pm$ 2,7
	Fosfatidyyliiseriini
	1,2 $\pm$ 1,1
	Fosfatidyyliinositoli
	7,2 $\pm$ 1,7
30	Fosfatidyyliglyseroli
	3,5 $\pm$ 1,3
	Lysofosfatidyylikoliini
	0,7 $\pm$ 0,5
	Sfingomyeliini
	4,7 $\pm$ 1,7

Seuraavassa kuvauksessa lääkitsevän tuotteen olennaisena ja pääasiallisena komponenttina mainitaan yksinkertaisuuden vuoksi vain fosfolipidifraktio.

- 5 Kunkin erän pintaominaisuudet arvioitiin samoin 37 °C:n lämpötilassa sykkivällä kuplatekniikalla (Surfactometer International, Toronto, Kanada) (Enhörning G., J. Appl. Physiol. 43, 198-203, 1977).

- Pitoisuuden ollessa 10 mg/ml valmisteeseen pintajännitys on pienimmillään,
10 < 5 mN/m, pinnan puristuksen ollessa 50 % 5 minuutin pulssituksessa.

- Valmisteeseen steriliys varmistettiin bakteriologisella analyysillä. Tämän valmisteeseen tehokkuus testattiin eläimillä sekä spontaanin IRDS-tilan tapauksessa liian varhain syntyneissä kaniineissa ja että ARDS-tilan tapauksessa, joka oli indusoitu marsuihin huuhtelemalla keuhkot
15 moneen kertaan.

Eläinkokeet

- 20 Näissä kokeissa (jotka toteutettiin menetelmällä, joka kuvataan julkaisussa Lachmann B., et al., Pediatr. Res., 15, 833-838, 1981) käytettiin kaniineja, jotka olivat syntyneet liian aikaisin keisarinleikkauksen seurauksena 27. raskausvuorokautena, ja joiden henkitorvet avattiin ja varustettiin kanyylillä.

... 25

11 kaniinia käsiteltiin antamalla niille kanyylin kautta keuhkojen pinta-aktiivista ainetta, joka oli valmistettu oheisen keksinnön mukaisesti, kun taas 15 muuta ei saanut mitään, vaan ne muodostivat vertailuryhmän.

30

- Kaikki eläimet, sekä käsitellyt että vertailut, kytkettiin rinnan hengityslaitteeseen, ja niitä hengitettiin keinoitekoisesti vakioaineella 100 % happea käyttäen 40 hengityksellä minuutissa, sisäänhengityspaineen muuttuessa tavanomaisesti. Keuhkoja laajennettiin ensin kohdistamalla niihin 1 minuutin ajan 35 cm H₂O paine. Sitten painetta alennettiin vähitellen eri hetkillä arvoon 15 cm H₂O. Lopuksi se nostettiin
35

uudestaan 5 minuutiksi arvoon 25 cm H₂O. Hengitystilavuus mitattiin joka 5. minuutti.

Tulokset esitetään taulukossa II.

5

Taulukko II: Mediaaniarvot, jotka saatiin 11 pinta-aktiivisella aineella käsitellyillä eläimellä ja 15 vertailueläimellä. Hengitystilavuudet (HT) liian varhain syntyneissä kaniineissa, joita oli hengitetty 30 minuuttia tavanomaisesti muuttuvia sisäänhengityspaineita (P_I) käyttäen.

10

	Aika (min)	P_I (cm H ₂ O)	HT (käsitelty) (ml/kg)	HT (vertailu) (ml/kg)
15	5	25	34,5	2,2
	10	25	34,0	2,0
	15	25	34,5	2,2
	20	20	25,0	1,3
	25	15	8,1	1,0
20	30	25	40,0	3,0

Hengitystilavuuden todettiin suurenevan huomattavasti käsitellyissä eläimissä vertailueläimiin nähden.

25 Paraffinoitujen keuhkoleikkeiden, jotka oli värjätty hematoksyliinillä ja eosiinilla, ja joita tarkasteltiin mikroskooppisesti, histologinen analyysi osoitti alveolilohkon tilavuuden suurentuneen huomattavasti käsitellyssä ryhmässä.

30 Samankaltaisia tuloksia saatiin antamalla oheisen keksinnön mukaista pinta-aktiivista ainetta marsuille, joihin oli indusoitu hengityselinten vajaatoiminta menetelmällä, joka kuvataan julkaisussa Berggren P., et al., Acta Anesthesiol. Scand. 30, 321-328, 1986.

35 Käsitellyissä tapauksissa, kuten taulukosta III nähdään, kaasuvaihdon arvot palautuivat nopeammin normaaleiksi vertailutapauksiin nähden.

Taulukko III: Veren kaasut täysikasvuissa marsuissa, joihin on induoitu hengityselinten vajaatoimintaa huuhtomalla keuhkot moneen kertaan (mediaaniarvot). Koe toteutettiin yhteensä 41 täysikasvuisella marsulla, joiden keuhkot oli huuhdottu moneen kertaan haalealla

- 5 (37 °C) normaalilla suolaliuoksella. Eläintä, jossa todettiin alhaimmat PaO_2 -pitoisuudet (keskiarvo 5,6 KPa), käytettiin pinta-aktiivisen aineen korvaamisella aikaansaadun vaikutuksen arvioimiseen; loput eläimistä (keskiarvo PaO_2 : 8,1 KPa) oli käsittelemättömiä ja ne toimivat vertailuna.

10

	Aika (min)	paO_2	Käsitelty		Vertailu (Kpa)
			(Kpa)	PaCO_2	
15	0 *	7,5		8,2	8,0
	15	47		5,9	9,0
	30	48		5,5	10,0
	45 *	50		5,3	10,1
20	60	55		5,0	10,3

* Aika, joka kuluu PS-annoksen tiputtamiseen käsitellyissä eläimissä.

Kliiniset kokeet

25

Kliiniset tutkimukset toteutettiin hyaliinikalvotaudista kärsivien vastasyntyneiden keskosvauvojen erityisissä keskuksissa, joilla keskosilla todettiin hengityselinten huomattavaa vajaatoimintaa ja jotka kärsivät hapen puutteesta, veren liiallisesta hiilidioksidipitoisuudesta ja kudosten happamuudesta huolimatta ajoittaisesta mekaanisesta hengityksestä positiivisessa paineessa, hapen prosenttisen osuuden ollessa yli 60 %.

35

Jäljempänä esitetään tulokset hallitusta tutkimuksesta, joka toteutettiin 10 vastasyntyneestä vauvasta muodostuvalla ryhmällä. Viisi vauvaa käsiteltiin keksinnön mukaisella pinta-aktiivisella aineella ja viisi vertailuvauvaa käsiteltiin perinteisin hoitomenetelmin.

Käsittelyhetkellä potilaat irroitettiin hengityslaitteesta ja pinta-aktiivista ainetta injektoitiin henkitorven sisään annoksena, jonka suuruus oli 2,5 ml/kg, joka vastaa 200 mg fosfolipidejä/kg.

- 5 Antamisen jälkeen vauvoja hengitettiin käsin 1 minuutin ajan kuplan avulla nopeudella 40-60 hengitystä minuutissa, käyttäen samaa kaasuseosta kuin aikaisemmin.

- 10 Sitten potilaat liitettiin uudestaan hengityslaitteeseen, joka toimi samalla tavalla kuin aikaisemmin; toimintaa muutettiin tämän jälkeen klinisen reaktion ja veren kaasuarvojen muuttumisen mukaan.

- Vertailuryhmän vauvat irroitettiin myös hengityslaitteesta ja niitä hengitettiin käsin 2 minuuttia samoissa olosuhteissa, kuin pinta-aktiivisella aineella käsiteltyjä potilaita.

Hengityselinten toimintaan liittyvien eri indeksien muuttuminen osoitti käsittelyn tehokkuuden.

- 20 Erityisesti noin 5 minuutin aikana paO_2 -arvot (hapen osapaine valtimossa) suurenivat nopeasti ja dramaattisesti siten, että pa/AO_2 -suhde (valtimoissa ja alveoleissa vallitsevan hapen osapaineen välinen suhde) saavutti 15 minuutin kuluessa mediaaniarvon, joka oli kolme kertaa suurempi kuin alkuperäinen arvo (30,6 verrattuna arvoon 10,4; $p < 0,001$), minkä jälkeen arvo pieneni hiukan ensimmäisen ja toisen tunnin välillä vakiintuakseen sitten arvoihin, jotka olivat noin kaksinkertaiset lähtöarvoihin verrattuna.

- 30 Sen sijaan vertailuryhmässä pa/AO_2 -suhteen alkuperäinen mediaaniarvo, 7,62, ei muuttunut merkittävästi.

Keuhkojen radiologiset löydökset osoittivat samoin patologisen tilan paranevan käsitellyissä kohteissa peruskudokseen pidäytyneen nesteen vähentyessä ja ilmatiehyiden venyessä.

Sen sijaan vertailuryhmään kuuluvien vauvojen radiologiset löydökset eivät paljastaneet mitään merkittävää muutosta ensimmäisen 48-72 havaintotunnin aikana.

- 5 Lopuksi, on tärkeätä korostaa sitä, että keksinnön mukaisella keuhkojen pinta-aktiivisella aineella käsitellyissä tapauksissa keinotekoisesti hengittämällä positiivisessa paineessa toteutetun hoidon ja happihoidon pituuden todettiin lyhenevän merkittävästi.
- 10 Tämän ansiosta erittäin kalliin tehohoidon pituutta sekä tunkeutuviin käsittelyihin liittyviä vaaroja voidaan vähentää. Monet kirjoittajat ovat itse asiassa sitä mieltä, että IRDS-tilasta johtuva keuhkojen vaurioituminen on seurausta myös elvytyshoidosta sekä erityisesti pitkästä altistumisesta suurille happipitoisuuksille.
- 15 Lisäksi eloonjääneissä potilaissa ei ollut todettavissa immunologisia komplikaatioita, mikä osoittaa keksinnön mukaisen pinta-aktiivisen aineen pienen antigeenisyyden.
- 20 Näin ollen ulkoisen pinta-aktiivisen aineen käyttö on huomattavan tärkeätä sekä hengityselimien sairaalloisia oireyhtymiä estettäessä että hoidettaessa.
- Aiotussa lääkinnällisessä käytössä erityisen sopiviksi ovat osoittautuneet fosfolipidisuspensiot fysiologisessa liuoksessa, joiden suspensioiden pitoisuus on 80 mg/ml, ja joita annetaan 2,5 mg/kg suuruisina annoksina, vastaten noin 200 mg fosfolipidejä ruumiin painokiloa kohden.
- 25 Käsittely toteutetaan normaalisti tiputtamalla suspensiota suoraan henkitorveen. Toinen mahdollisuus on antaminen sumuna.
- 30

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä eläinperäisen keuhkojen pinta-aktiivisen aineen valmistamiseksi, joka muodostuu polaarista lipidifraktiosta, joka muodostuu
5 pääasiassa fosfolipideistä, joka fosfolipidifraktio muodostuu vähintään 70-75 painoprosenttisesti fosfatidyylikoliinista, joka puolestaan muodostuu vähintään 40-45 painoprosenttisesti dipalmitoyylidifosfatidyylikoliinista, sekä proteiinifraktiosta, joka muodostuu yksinomaan proteiineista, joiden molekyylipaino on pieni, 3-14 kilodaltonia, jota po-
10 laarista lipidifraktiota on läsnä vähintään 98,5 paino-%, sen muodostuessa puolestaan pääasiassa, vähintään 95-prosenttisesti, fosfolipidien seoksesta, t u n n e t t u siitä, että

a) pinta-aktiivinen aine erotetaan kokonaisuudessaan hienoksi jauhe-
15 tuista ja suolaliuoksella pestyistä eläinkeuhkoista peräkkäisten suodatus-, sentrifugointi- ja uuttotoimenpiteiden avulla orgaanista liuotinta käyttäen;

b) raaka lipidifraktio otetaan talteen haihduttamalla liuotin;
20

c) polaarinen lipidikomponentti erotetaan lopulta apolaarisesta komponentista geelikromatografisesti käänteisfaasilla LIPIDEX -5000^R (epikloorihydriinillä ristosilloitettu dekstraanijohdannainen) täytetyllä kolonnilla ja orgaanisella liuotinseoksella.

∴ 25

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että orgaaninen liuotinseos on kloroformin ja metanolin 1:4-seos (v/v).

30

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett ytaktivt ämne för lungor, som består av en polär lipidfraktion som i huvudsak består av fosfolipider, 5 varvid nämnda fosfolipidfraktion består av minst 70-75 vikt% fosfatidylkolin, som i sin tur består av minst 40-45 vikt% dipalmitoyldifosfatidylkolin, samt en proteinfraktion, som enbart består av proteiner vars molekyelvikt är låg, 3-14 K (K = kilodalton), varvid den polära lipidfraktionen är närvarande i en mängd på minst 98,5 vikt%, under det 10 att den i sin tur i huvudsak, i en mängd på minst 95 %, består av en blandning av fosfolipider, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) det ytaktiva ämnet separeras i sin helhet från finpulveriserade och med saltlösning tvättade djurlungor med hjälp av successiva filtrerings-, 15 centrifugerings- och extraktionsåtgärder genom utnyttjande av organiskt lösningsmedel;

b) den råa lipidfraktionen återvinns genom avdunstning av lösningsmedlet; 20

c) den polära lipidkomponenten separeras till slut från den apolära komponenten gelkromatografiskt med en kolonn som fyllts med den omvända fasen LIPIDEX -5000^R (ett dextranderivat tvärbundet med epiklorhydrin) och en organisk lösningsmedelsblandning. 25

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den organiska lösningsmedelsblandningen är en 1:4 (v/v) blandning av kloroform och metanol. 30