



(19)  
**Bundesrepublik Deutschland**  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 199 03 876 B4 2006.09.28**

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **199 03 876.7**  
 (22) Anmeldetag: **01.02.1999**  
 (43) Offenlegungstag: **10.08.2000**  
 (45) Veröffentlichungstag  
 der Patenterteilung: **28.09.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/545 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:  
**Orthogen Gentechnologie GmbH, 40210  
 Düsseldorf, DE**

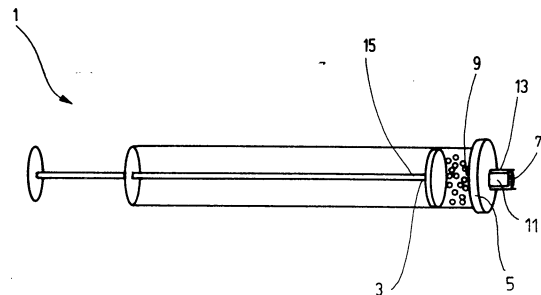
(72) Erfinder:  
**Reinecke, Julio, Dr., 50739 Köln, DE; Meijer, Hans,  
 Dr., 50823 Köln, DE; Wehling, Peter, Dr., 40597  
 Düsseldorf, DE**

(74) Vertreter:  
**Gleiss Große Schrell & Partner Patentanwälte  
 Rechtsanwälte, 70469 Stuttgart**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
 gezogene Druckschriften:  
**DE 42 44 437 A1**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, dadurch gekennzeichnet, dass man  
 a) eine Spritze aus Glas oder Kunststoff 5 bis 30 Minuten mit einem ätzenden Agens behandelt, wäscht und sterilisiert  
 b) mit Blut füllt, und  
 c) 12 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur bis 41°C inkubiert.



**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten gemäß den Patentansprüchen.

## Stand der Technik

**[0002]** Therapeutisch wirksame Proteine wie Erythropoietin, Insulin oder Interferone, sind seit langem bekannt. Viele dieser Proteine sind bereits als Arzneimittel zugelassen und werden dementsprechend häufig eingesetzt. Aufgrund der hohen mit der Entwicklung und Zulassung dieser Medikamente verbundenen Kosten besteht jedoch ein Bedarf an einfachen und kostengünstigen Alternativen zur Bereitstellung von therapeutisch wirksamen Proteinen. Zudem sind nicht alle therapeutisch wirksamen Proteine als Arzneimittel zugelassen. Gleichwohl besteht jedoch häufig der Bedarf, auch diese Proteine dem Patienten zu applizieren. Von besonderer Bedeutung sind dabei aufgrund ihrer mutmaßlichen guten Körperverträglichkeit autologe, das heißt körpereigene, Proteine. Zu diesen Proteinen gehören der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist, Interleukin **4**, Interleukin **10** und der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Typ I oder Typ II

**[0003]** In der DE 42 44 437 A1 wird ein Verfahren zur Gewinnung körpereigener Cytokine offenbart. Bei dem Verfahren wird eine Kultur aus Eigenblut eines Patienten mit einem Ozon-Sauerstoff-Gemisch beagast. Anschließend werden durch Zentrifugation einzelne Fraktionen gewonnen. Durch dieses Verfahren überleben nur die resistenten Zellen und die radikalempfindlichen sterben ab. Die so gewonnenen resistenten Zellen können anderen Kulturen zugegeben werden.

**[0004]** Die Stimulation von Monocyten durch adherentes Immunglobulin G zur Bildung des Interleukin-I-Rezeptor-Antagonisten wird von Arend und Leung in Immunological Reviews (1994) 139, 71-78 und Moore et al. in Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1992) 6, 569-575, beschrieben. Andersen et al. in Autommunity (1995) 22, 127-133 erläutert, daß der therapeutische in vivo zu beobachtende Effekt von Immunglobulin G nicht auf eine verstärkte Bildung von Interleukin-I-Rezeptor-Antagonist zurückgeführt werden kann und daß die in vitro Bildung des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IRAP, IL-1ra) durch Monocyten in Abhängigkeit von an Polypropylen adsorbierten Serums- und Plasma-Bestandteilen stattfindet. Der therapeutische Einsatz von adsorbierten Serums- und Plasma-Bestandteilen zur Stimulation der Bildung therapeutisch interessanter Proteine in Therapien ist nicht nur sehr kostenlastig, sondern beinhaltet auch die Gefahr einer Kontamination mittels infektiöser Partikel, mit denen die Serums- und Plas-

ma-Bestandteile verunreinigt sein können. Verfahren zur Herstellung unmittelbar in einer Therapie einsetzbaren IL-1ra ohne Verwendung von adsorbierten Serums- und Plasma-Bestandteilen werden in den vorstehend erwähnten Druckschriften nicht beschrieben.

## Aufgabenstellung

**[0005]** Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht also darin, Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten bereitzustellen, die als sichere, kostengünstige und schnell durchzuführende Alternative zum Einsatz und zur Herstellung konventioneller Arzneimittelpräparate dienen.

**[0006]** Die Erfindung löst dieses Problem, indem ein Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten gemäß Hauptanspruch bereitgestellt wird.

**[0007]** Gemäß der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, daß die innere Struktur der Spritze aus einem besonderen Material besteht, nämlich Glas oder Kunststoff, dessen Oberfläche modifiziert wird, nämlich mit Hilfe eines ätzenden Agens, zum Beispiel einer Säure oder einer Lauge, insbesondere Chromschwefelsäure, und anschliessend nach Entfernen des Agens und Waschen der Spritze gegebenenfalls, das heißt in besonders bevorzugter Weise, die Oberfläche der inneren Struktur der Spritze sterilisiert wird, insbesondere durch Autoklavierung. Anschließend wird die Spritze mit einer Körperflüssigkeit, nämlich Blut eines Patienten gefüllt, inkubiert und dabei das prophyllaktisch oder therapeutisch wirksame Protein, nämlich der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IRAP) in der Körperflüssigkeit gebildet. Das mit dem IRAP angereicherte Blut kann dann dem Patienten wieder injiziert werden, zum Beispiel in ein krankes Gelenk. Die Erfindung sieht also in einem ersten Verfahrensschritt vor, daß die Oberfläche der inneren Struktur der Spritze modifiziert wird, nämlich mit Hilfe eines ätzenden Agens, wie einer Säure oder einer Lauge, insbesondere Chromschwefelsäure, und dann, falls erwünscht, die Oberfläche der inneren Strukturen der Spritze sterilisiert wird, insbesondere durch Autoklavierung. Vor und/oder nach der Sterilisation kann eine Trocknung vorgesehen sein. Nach der Modifizierung und der gegebenenfalls erfolgenden Sterilisation wird die Spritze in einem zweiten Verfahrensschritt mit einer Körperflüssigkeit, nämlich Blut, gefüllt und inkubiert. Vorzugsweise wird die Körperflüssigkeit dem Patienten direkt mit der Spritze entnommen. Die modifizierte Oberfläche der inneren Struktur der Spritze induziert in der Körperflüssigkeit spezifisch, das heißt je nach eingesetztem Material der inneren Struktur der Spritze, eingesetzter Modifizierung, insbesondere Ätzen der inneren Struktur, eingesetzter Sterilisation, insbesondere Autoklavie-

rung, und eingesetzter Körperflüssigkeit, die Bildung prophylaktisch oder therapeutisch wirksamer Proteine, nämlich IRAP, das demgemäß in der in der Spritze vorhandenen Körperflüssigkeit angereichert beziehungsweise gebildet wird. Die so angereicherte Körperflüssigkeit kann in der Spritze steril gelagert und bei Bedarf dem Patienten direkt ohne weitere Behandlung oder beispielsweise nach Zentrifugation und/oder Sterilfiltration wieder zugeführt werden.

**[0008]** Die Erfindung ermöglicht also auch ein Verfahren zur Prophylaxe oder Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, wobei dem menschlichen oder tierischen Körper eine Körperflüssigkeit, nämlich Blut, mittels einer Spritze gemäß der vorliegenden Erfindung entnommen, diese Körperflüssigkeit in der Spritze inkubiert und dabei prophylaktisch oder therapeutisch wirksame Proteine, nämlich IRAP, gebildet oder angereichert und mittels dieser Spritze die Körperflüssigkeit wieder demselben menschlichen oder tierischen Körper zugeführt wird.

**[0009]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Protein ein mehrere oder viele Aminosäure aufweisendes Molekül verstanden. Der Begriff Protein erfasst also auch Oligopeptide, Peptide oder Polypeptide sowie Fragmente oder Derivate davon. Derartige Derivate können zum Beispiel Glycoproteine oder Proteoglycane sein.

**[0010]** Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das therapeutisch wirksame Protein der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (IRAP oder IL-1ra) oder ein diesen enthaltendes Gemisch. Die Erfindung ermöglicht jedoch auch die Bildung weiterer oder mehrerer Proteine oder Peptide sowie Fragmente davon.

**[0011]** Die Erfindung sieht auch vor, daß die Bildung mehrerer Proteine in einer Körperflüssigkeit simultan induziert wird, so daß eine Körperflüssigkeit gebildet wird, die eine erhöhte Konzentration mehrerer Proteine aufweist.

**[0012]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer inneren Struktur einer Spritze jeglicher Bereich oder jegliche Struktur der Spritze verstanden, der in ihrem Inneren, das heißt im Probeaufnahmebereich, liegt und mit der aufzunehmenden Körperflüssigkeit in Kontakt kommen kann. In besonders vorteilhafter Weise ist die innere Struktur einer Spritze deren innere Oberfläche, bevorzugt eine Oberfläche mit einer Strukturierung zur Oberflächenvergrößerung. Selbstverständlich kann die vorliegende Erfindung auch mittels einer handelsüblichen Spritze ohne besondere Ausgestaltung in ihrem inneren Hohlraum durchgeführt werden. Die innere Struktur ist in einem solchen Fall die Innenfläche des Spritzenzylinders und der in dem Zylinder liegende Teil des Kolbens. Die innere Struktur kann entweder alternativ oder zusätzlich durch Partikel, Kugeln, Per-

len, Gele, Glaswolle, Granulat oder ähnliches gebildet sein, um die innere Oberfläche der Spritze zu vergrößern und so eine größere induzierende Oberfläche zur Verfügung zu stellen.

**[0013]** Derartige zusätzliche Strukturen, wie zum Beispiel Glasperlen mit einem Durchmesser von 1 bis 5 mm, sollten jedoch nicht mehr als 50 % des Innenvolumens der eingesetzten Spritzen einnehmen, die beispielsweise 10 bis 100 ml Spritzen sein können.

**[0014]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer modifizierten Oberfläche einer inneren Struktur der Spritze eine mittels eines ätzenden Agens behandelte Oberfläche verstanden, die in der Lage ist, die Bildung von therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Stoffen, nämlich IRAP in einer Körperflüssigkeit eines Menschen oder Tieres zu induzieren und/oder zu verstärken. Die modifizierte Oberfläche kann sich durch eine besonders hohe Reinheit, das heißt weitgehende oder vollständige Abwesenheit von Verunreinigungen und/oder eine chemisch/physikalische Änderung der Oberflächeneigenschaften und/oder -struktur auszeichnen. Vorzugsweise wird zur Herstellung der modifizierten Oberfläche der inneren Struktur eine Lauge oder eine Säure, zum Beispiel Chromschwefelsäure, insbesondere 20 bis 80 %ige, besonders bevorzugt 50 %ige Chromschwefelsäure, eingesetzt. Die Spritze wird in bevorzugter Weise 5 bis 30 min mit dem ätzenden Agens, insbesondere der Chromschwefelsäure, inkubiert.

**[0015]** Nach Entfernen des Agens können bevorzugt ein oder mehrere Waschschriffe erfolgen sowie gegebenenfalls vorzugsweise eine Sterilisation, beispielsweise durch Autoklavierung, insbesondere Autoklavierung bei 100°C bis 150°C für 20 bis 60 min unter einem Druck von 1 bis 5 bar, durchgeführt werden. Nach dem Waschen und vor und/oder nach dem Autoklavieren können gegebenenfalls noch ein oder mehrere Trocknungsschriffe bei 60 bis 150°C, vorzugsweise 80°C, für 30 bis 120 min in zum Beispiel einem Trockenschrank erfolgen.

**[0016]** In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Spritze, insbesondere die innere Struktur der Spritze, aus Glas, zum Beispiel Quarzglas, einem Kunststoff, wie Polystyrol, Polyethylen, Polyvinylchlorid, Polypropylen, oder einem ähnlichen Stoff hergestellt ist, das heißt aus diesen Stoffen besteht oder diese Stoffe im wesentlichen enthält. In besonders bevorzugter Ausführungsform weisen diese Stoffe nach erfolgter Modifizierung, insbesondere Ätzung, und nach der gegebenenfalls erfolgenden Sterilisation, proteinbildende oder induzierende Eigenschaften auf.

**[0017]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die innere Struk-

tur einer Spritze mit einer modifizierbaren und sterilisierbaren Beschichtung zu versehen und anschließend die Modifizierung beziehungsweise auch gegebenenfalls die Sterilisierung vorzunehmen.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung ist vorteilhaft insofern, als dass ein einfach durchzuführendes Verfahren bereitgestellt wird, mit dem autologe, durch Induktion, insbesondere Oberflächen-Induktion, herstellbare prophylaktisch oder therapeutisch wirksame Proteine, nämlich IRAP hergestellt werden können und in der so hergestellten Form, das heißt zusammen mit den anderen Bestandteilen der in der Spritze befindlichen Flüssigkeit dem Patienten direkt, das heißt ohne weitere Manipulation, wie zum Beispiel Umfüllen in andere Behälter, wieder appliziert werden können. Gegebenenfalls kann zur Abtrennung von festen Bestandteilen eine Zentrifugation und/oder Sterilfiltration vorgesehen werden. Der Einsatz kommerziell erhältlicher oftmals teurerer Arzneimittel wird daher überflüssig. Zudem ist der Einsatz von prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen autologen Proteinen möglich, die bisher arzneimittelrechtlich noch nicht zugelassen und daher nicht verfügbar sind. Schließlich erweist sich die Erfindung als vorteilhaft, als daß eine Kontamination, Verunreinigung, Infektion oder ähnliches des prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Proteins vermieden wird, die auf einer außerhalb des Patienten stattfindenden Arzneimittelherstellung beruht.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung sieht also ein Verfahren zur Herstellung des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten vor, wobei die inneren Strukturen der Spritze aus einem besonders behandelten Material bestehen, nämlich Kunststoff oder Glas, wobei die Oberfläche der inneren Strukturen der Spritze modifiziert wurde, nämlich mit Hilfe eines ätzenden Agens, insbesondere Chromschwefelsäure, wobei gegebenenfalls anschließend die Oberfläche der inneren Strukturen der Spritze sterilisiert wurde, insbesondere durch Autoklavierung, und wobei die Spritze mit einer Körperflüssigkeit, nämlich Blut, gefüllt, inkubiert und therapeutisch oder prophylaktisch wirksame Proteine, nämlich der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist, in der Körperflüssigkeit gebildet und angereichert wird. Unter anderem aufgrund der besonderen Modifizierung der Oberfläche der inneren Strukturen der Spritze, nämlich der Behandlung mit einem ätzenden Agens, und der besonderen Sterilisation der Oberfläche, insbesondere Autoklavierung, ist die erfindungsgemäß eingesetzte Spritze in der Lage, die im Blut vorhandenen Monocyten zur Bildung des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten anzuregen, so daß dieses im Blut angereichert wird. Das sich in der Spritze befindende Blut kann nach Inkubation, das heißt nach Anreicherung des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, direkt, ohne weitere Manipulation, wie zum Beispiel Umfüllen, wieder dem Patienten zugeführt werden, dem das in die Spritze eingefüllte

Blut entnommen worden war. Vorteilhafterweise kann zur Abtrennung fester Bestandteile, wie Zellen, eine Zentrifugation und/oder Sterilfiltration vorgesehen werden. Die Erfindung sieht also auch vor, daß dem Patienten das Blut mittels der mit einer besonders modifizierten und sterilisierten, insbesondere autoklavierten Oberfläche der inneren Strukturen ausgestatteten Spritze entnommen, das Blut in der Spritze inkubiert und nach IL-1ra-Bildung dem Patienten wieder mit der Spritze zugeführt werden kann. Eine derartige Vorgehensweise ist zum Beispiel besonders vorteilhaft im Bereich der Neuroorthopädie, das heißt beispielsweise bei neurologisch bedingten Rückenbeschwerden. Für die Behandlung derartiger Beschwerden kam bisher nur eine Bandscheibenoperation, Cortisonbehandlungen, Spülungen mit Kochsalzlösungen oder ähnliches in Betracht. Die vorliegende Erfindung erlaubt nun die einfache und kostengünstige Bereitstellung eines therapeutisch wirksamen Proteins zur Behandlung der Beschwerden.

**[0020]** Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, daß die innere Struktur der Spritze zusätzlich mit Anticoagulantien beschichtet wird, insbesondere Heparin. Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, die Anticoagulantien nicht als Beschichtung, sondern ungebunden im Behälter einzusetzen, zum Beispiel in lyophilisiertem oder flüssigem Zustand in die Spritze zu geben. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird in der Spritze jedoch kein Anticoagulans, insbesondere kein Heparin, eingesetzt.

**[0021]** Die Erfindung sieht vor, die Inkubation der Körperflüssigkeit in der Spritze über einen Zeitraum von 12 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur bis 41°C, insbesondere bei 37°C, durchzuführen.

**[0022]** Die Erfindung sieht in einer Ausgestaltung der Erfindung auch vor, dass nach Bildung des therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Proteins in der Körperflüssigkeit die Körperflüssigkeit weiter behandelt wird, um beispielsweise bestimmte Bestandteile dieser abzutrennen, zum Beispiel Blutplasma oder Blutplättchen. Diese Abtrennung kann in bevorzugter Ausführungsform der Erfindung durch Zentrifugation durchgeführt werden.

**[0023]** Die Erfindung ermöglicht in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Herstellung einer zur In-vitro-Induktion von prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Proteinen, nämlich des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, geeigneten Spritze, wobei sich die Spritze durch das besonders behandelte Material der inneren Struktur der Spritze, nämlich Kunststoff oder Glas, auszeichnet. Insbesondere ist erfindungsgemäß vorgesehen, die Oberfläche der inneren Struktur der Spritze mittels eines ätzenden Agens, insbesondere einer Lauge oder einer Säure

zu ätzen, insbesondere mit Hilfe von Chromschwefelsäure. Nach Entfernen des ätzenden Agens und Waschen der Spritze kann vorgesehen sein, die Oberfläche der inneren Struktur zu sterilisieren, insbesondere zu autoklavieren.

**[0024]** Die Erfindung beschreibt selbstverständlich auch die Verwendung der so hergestellten Spritze, die aus Glas oder Kunststoff, insbesondere Polystyrol, Polyvinylchlorid, Polyethylen oder Polypropylen, hergestellt ist, wobei sich die Spritze durch die besondere Behandlung der Oberfläche der inneren Struktur der Spritze, nämlich Glas oder Kunststoff, auszeichnet, die mittels Einwirkung eines ätzenden Agens ausgeführt wird.

**[0025]** Die Erfindung beschreibt auch die Verwendung von Lauge oder Säure, insbesondere Chromschwefelsäure, zum Modifizieren der Oberfläche der inneren Strukturen der erfindungsgemäß eingesetzten Spritzen, vorzugsweise aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Polyethylen, Polypropylen oder Glas, zur In-vitro-Induktion von prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Proteinen, nämlich dem Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten.

**[0026]** Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

**[0027]** Die Erfindung wird anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

**[0028]** Die Figur zeigt: Die Figur zeigt in schematischer Darstellung eine erfindungsgemäß verwendete Spritze.

#### Ausführungsbeispiel

Beispiel 1: Herstellung und Verwendung einer Glas-spritze mit Granulat

**[0029]** Die Figur zeigt eine 30 ml Spritze **1** aus Glas (Fortuna Optima, Best.Nr. 7.102.-44, wenn im Folgenden nichts anderes angegeben, wurde diese Spritze in allen Beispielen eingesetzt) mit einem Kolben oder Stempel **3**, einem abschraubbaren Verschluß **5** mit einem Verschlußansatz **13** (male Luer) und einer auf dem Verschlußansatz **13** angeordneten und diesen abschließenden abnehmbaren Kappe **7** mit Septum. Der Stempel **3** weist eine Sollbruchstelle **15** auf. Dargestellt ist auch Granulat **9** aus Glas (Glasperlen der Firma Roth, Art.Nr. A 557.1). Die Größe der Granulatpartikel **9** liegt zwischen 1 und 3 mm Durchmesser, wobei jedoch auch kleinere Partikel, insbesondere größer als 100 µm, eingesetzt werden können.

**[0030]** Zur Herstellung der Spritze **1** wird die Oberfläche der inneren Struktur der fabrikneuen und originalverpackten Spritze **1** und des fabrikneuen und ori-

ginalverpackten Granulats **9** modifiziert mit Hilfe eines handelsüblichen Chromschwefelsäure-Präparat, indem das Chromschwefelsäure-Präparat in die Spritze aufgenommen wird und die Spritzeninnenwand, das heißt Zylinderinnenwand und Kolben, sowie das Granulat damit geätzt werden. Die Spritze wird durch ein- bis zehnmaliges, vorzugsweise dreimaliges, vollständiges Aufziehen und Ausspritzen von 50 %iger Chromschwefelsäure (Merck, Darmstadt, Best.Nr. 1.02499.2500, Chromschwefelsäure wird mit Biochrom Reinstwasser Ultra Pure Water No. L 0040 bis zur gewünschten Verdünnung verdünnt) behandelt und dabei gesäubert beziehungsweise modifiziert. Nach dem letzten Ruziehen wird die Spritze unten abgedichtet und in gefülltem Zustand 5 bis 30 min mit der Chromschwefelsäure inkubiert. Anschliessend wird der Spritzenkolben entfernt und zwei- bis zehnmal, vorzugsweise viermal, durch vollständiges Auffüllen und Ablaufenlassen des Spritzenzylinders mit frischem Reinstwasser durchgewaschen, wobei darauf zu achten ist, dass das Wasser vollständig ein- und ausgefüllt wird. Sodann wird der Spritzenkolben in 50 %ige Chromschwefelsäure getaucht und gründlich mit destilliertem Wasser abgewaschen.

**[0031]** Eventuell in der Spritze vorhandene Wasserreste werden durch Betupfen des Lueranschlusses kapillar abgesaugt, um ein schnelles Trocknen der Spritze zu gewährleisten. Voneinander getrennte Kolben und Spritzen inklusive der eventuell darin enthaltenen Glasperlen werden in Melag-Folie mit Indikatorfeld (Melag, Melafol 1502) eingeschweißt (Melag, Melaseal). Die so verpackten Spritzen werden im Trockenschrank (Melag-Trockensterilisator) bei 80°C für mindestens 60 min getrocknet. Die getrockneten verpackten Spritzen werden anschliessend bei 132°C 30 min bei 2 bar autoklaviert (Wolf Autoclav HRM 242 II) und bei 80°C für mindestens 60 min ein weiteres Mal getrocknet.

**[0032]** Vor der Blutentnahme (siehe unten) wird Heparin (Liquemin N 2500, Heparin-Natrium 2500 I.E.) oder Citrat (ACDA) in die Spritze eingebracht, um eine Koagulation des später aufgenommenen Blutes zu verhindern.

**[0033]** Die Spritze **1** wird eingesetzt, indem Blut eines Patienten mit Hilfe eines nicht dargestellten Adapters entnommen wird, der die abschraubbare Kappe **7** mittels eines nicht dargestellten Schlauches mit einer nicht dargestellten Kanüle verbindet. Der Adapter weist eine Nadel auf, mittels derer das im Verschlußansatz **13** vorhandene Septum durchstoßen wird. Anschliessend wird der Adapter abgenommen und eine Inkubation des Vollblutes bei 37°C für 24 Stunden unter dem Schutz der abnehmbaren Kappe **7**, deren Septum sich selbsttätig geschlossen hat, durchgeführt. Die Inkubation kann stehend oder liegend erfolgen. Erfolgt die Inkubation stehend, wird

das Plasma durch das Septum und einen sterilen Vorsatzfilter (0,2 µm) abgenommen. Zusätzlich oder alternativ kann eine Zentrifugation vorgesehen werden. Erfolgt die Inkubation liegend, wird das Blut zentrifugiert und das Plasma durch einen sterilen Vorsatzfilter (0,2 µm) abgenommen. Es kann aber auch vorgesehen sein, das Plasma durch das Septum abzunehmen ohne eine Zentrifugation durchzuführen. Anschliessend wird das Plasma zum Beispiel an einer Nervenwurzel oder einem Gelenk des Patienten reinjiziert.

Beispiel 2: Herstellung und Verwendung einer Kunststoff-Spritze mit Granulat

**[0034]** In diesem Beispiel wird steriles Granulat aus Polystyrol, Glas oder einem anderen modifizierbaren und/oder sterilisierbaren Material eingesetzt. Die Oberfläche des Granulats wird mit Hilfe eines handelsüblichen Chromschwefelsäure-Präparat im Batch-Verfahren, wie im Beispiel 1 ausgeführt, modifiziert. Anschliessend wird das Granulat mit Wasser gespült, um die Chromschwefelsäure-Reste wegzuwaschen. Dann wird das Granulat bei 121°C unter einem Druck von 2 bar mindestens 20 min inkubiert, um so das Granulat zu sterilisieren und mit Wasser zu sättigen. Das Granulat wird anschliessend getrocknet bei 80°C für 20 min.

**[0035]** Eine herkömmliche, nicht modifizierte, fabrikneue und originalverpackte Polypropylenspritze (5, 10, 20 oder 50 ml) wird mit dem modifizierten und sterilisierten Granulat (1, 2, 4 oder 10 cm<sup>3</sup>) sowie mit einer hinreichenden Menge eines Antikoagulans wie Heparin (Liquemin, Heparin-Natrium 2500 I.E.) oder Citrat (zum Beispiel ACDA) befüllt.

**[0036]** Die befüllte Spritze wird inklusive Abnahmekanüle und Schlauch verpackt und anschliessend Gamma- oder Elektronen-sterilisiert.

**[0037]** Der Anwender entnimmt das sterile Besteck und entnimmt dem Patienten Blut. Die Spritze verfügt an ihrer Öffnung in dem Verschlußansatz über ein Septum, welches zur Entnahme durch das Abnahmezubehör, also die Nadel des Adapters, durchstochen wird. Nach Abnahme des Adapters verschliesst sich das Septum selbsttätig wieder. Nach Blutentnahme wird der Spritzenstempel an einer Sollbruchstelle abgebrochen.

**[0038]** Die Spritze mit Blut wird 24 Stunden bei 37°C bis 41°C inkubiert.

a) Erfolgt die Inkubation stehend, wird das Plasma durch das Septum und einen sterilen Vorsatzfilter, zum Beispiel 0,2 µm, abgenommen.

b) Erfolgt die Inkubation liegend, wird nach Zentrifugation der Spritze das Plasma durch einen sterilen Vorsatzfilter, zum Beispiel 0,2 µm, abgenommen.

**[0039]** Die Reinjektion des Plasma erfolgt zum Beispiel an einer Nervenwurzel, ins Gelenk oder in die Bandscheibe.

Beispiel 3: Herstellung und Verwendung einer Spritze ohne Granulat

**[0040]** Eine originalverpackte, fabrikneue Spritze aus einem modifizierbaren, sterilisierbaren Material (5, 10, 20 oder 50 ml) wird, wie in Beispiel 1 angegeben, mit Chromschwefelsäure modifiziert und anschliessend autoklaviert sowie getrocknet. Vorzugsweise besteht die Spritze aus Glas, Polystyrol, oder einem speziell modifizierbaren anderen Material.

**[0041]** Die modifizierte und sterilisierte Spritze wird mit einer hinreichenden Menge Heparin (Liquemin, Heparin-Natrium 2500 I.E.) oder Citrat (ACDA) befüllt.

**[0042]** Die befüllte Spritze wird inklusive Abnahmekanüle und Schlauch anschliessend Gamma- oder Elektronensterilisiert.

**[0043]** Der Anwender entnimmt das sterile Besteck und entnimmt dem Patienten Blut. Die Spritze verfügt an der Öffnung über ein in dem Verschlußansatz enthaltendes Septum, welches zur Entnahme durch das Abnahmezubehör, also den eine Nadel aufweisende Adapter durchstochen wird. Nach Abnahme des Adapters verschliesst sich das Septum selbsttätig wieder. Nach Blutentnahme wird der Spritzenstempel an einer Sollbruchstelle abgebrochen.

**[0044]** Die Spritze mit Blut wird 24 Stunden bei 37°C bis 41°C inkubiert.

a) Erfolgt die Inkubation stehend (zum Beispiel in einem Reagenzglasständer), wird das Plasma durch das Septum abgenommen, wobei eine Filtration durch einen sterilen Vorsatzfilter, zum Beispiel 0,2 µm, erfolgt.

b) Erfolgt die Inkubation liegend, wird nach Zentrifugation der Spritze das Plasma durch das Septum abgenommen, wobei dabei durch einen sterilen Vorsatzfilter, zum Beispiel 0,2 µm, eine Filtration erfolgt.

**[0045]** Die Reinjektion des Plasma erfolgt zum Beispiel an einer Nervenwurzel oder ins Gelenk oder in die Bandscheibe.

Beispiel 4: In-vitro-Bildung und Anreicherung des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten in einer Spritze unter Verwendung von Heparin

**[0046]** Eine kommerziell erhältliche fabrikneue und originalverpackte Spritze, bestehend aus Glas, wurde mit Chromschwefelsäure gefüllt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, wie in Beispiel 1 angegeben. Anschliessend wurde die Spritze viermal mit de-

stilliertem Wasser gespült, verpackt, 30 min bei 131°C unter einem Druck von 2 bar autoklaviert und 30 min bei 100°C getrocknet.

**[0047]** Nach Abschluß der Modifizierung und Sterilisation wird die Spritze zwischengelagert. Arzneimittelrechtlich zugelassenes Heparin (Liquemin, Heparin-Natrium 2500 I.E.) wird in die Spritze als Anticoagulanzen aufgezogen.

**[0048]** Anschliessend wird dem Patienten venöses Blut mit der beschichteten Spritze steril entnommen.

**[0049]** Die Spritze wird bei Raumtemperatur 12 bis 72 Stunden inkubiert. In dieser Zeit findet eine starke Anreicherung im Plasma enthaltender Proteine, insbesondere des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, im Blutplasma statt (Ausgangskonzentration 150 pg/ml). Es konnte eine Konzentration von 1 bis 50 ng/ml des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten festgestellt werden.

**[0050]** Anschliessend wird das Blut oder das Plasma dem Patienten mit der beschichteten Spritze injiziert.

Beispiel 5: In-vitro-Bildung und Anreicherung des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten in einer Spritze unter Verwendung von Heparin

**[0051]** Eine kommerziell erhältliche fabrikneue und originalverpackte Spritze, bestehend aus Glas, wurde mit Chromschwefelsäure gefüllt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, wie in Beispiel 1 angegeben. Anschliessend wurde die Spritze viermal mit destilliertem Wasser gespült, verpackt, 30 min bei 131°C unter einem Druck von 2 bar autoklaviert und 30 min bei 100°C getrocknet.

**[0052]** Nach Abschluß der Modifizierung und Sterilisation wird die Spritze zwischengelagert.

**[0053]** Anschliessend wird dem Patienten venöses Blut mit der Spritze steril entnommen.

**[0054]** Die Spritze wird bei Raumtemperatur über 12 bis 24 Stunden inkubiert. In dieser Zeit findet eine starke Anreicherung im Plasma enthaltender Proteine, insbesondere des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, im Blutplasma statt (Ausgangskonzentration 150 pg/ml). Es konnte eine Konzentration von 1 bis 50 ng/ml des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten gefunden werden.

**[0055]** Anschliessend wird das verdünnte Blut oder der Kulturüberstand dem Patienten injiziert.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur in-vitro-Bildung und Anreicherung

von Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten, **dadurch gekennzeichnet**, dass man

- a) eine Spritze aus Glas oder Kunststoff 5 bis 30 Minuten mit einem ätzenden Agens behandelt, wäscht und sterilisiert
- b) mit Blut füllt, und
- c) 12 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur bis 41°C inkubiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Kunststoff Polystyrol, Polyvinylchlorid, Polyethylen oder Polypropylen ist.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die innere Struktur der Spritze durch ihre innere Oberfläche, insbesondere oberflächenvergrößernde Ausformungen, gebildet wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die innere Struktur durch in der Spritze vorhandene Kugeln, Gele, Glaswolle, Granulate oder Partikel gebildet wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die innere Struktur aus Polystyrol, Polyvinylchlorid, Polyethylen, Polypropylen oder Glas besteht oder dieses enthält.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das ätzende Agens eine Lauge oder eine Säure, insbesondere Chromschwefelsäure, ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

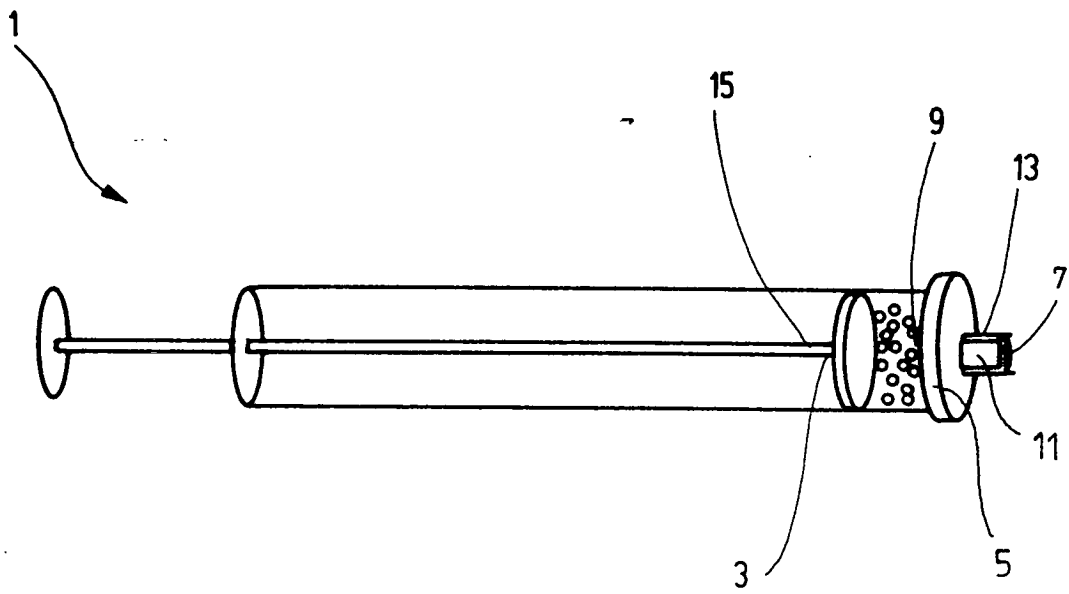


Fig.