



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 60568  
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty 10 02 1982  
Patent meddelat

(51) Kv.Ik.<sup>3</sup>/Int.Cl.<sup>3</sup> C 07 G 7/00, A 61 K 31/35,  
37/02

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

|                                                                                            |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| (21) Patentihakemus — Patentsökning                                                        | 800292   |
| (22) Hakemispäivä — Ansökningsdag                                                          | 31.01.80 |
| (23) Alkuperäpäivä — Giltighetsdag                                                         | 06.10.77 |
| (41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig                                                  | 31.01.80 |
| (44) Nähtävöispanon ja kuul.julkaisun pvm. —<br>Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 30.10.81 |
| (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet                                         | 12.10.76 |
| USA(US) 731414                                                                             |          |

(71) Research Corporation, 405 Lexington Avenue, New York, N.Y., USA(US)

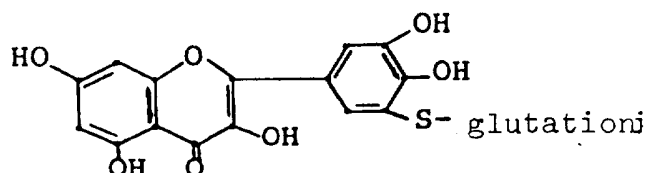
(72) Arthur Malley, Portland, Oregon, USA(US)

(74) Ruska & Co

(54) Menetelmä konjugaatin valmistamiseksi allergiareaktioiden estämistä varten - Förfarande för framställning av ett konjugat för blockering av allergiska reaktioner

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta 772945 (patentti 58501) -  
Avdelad från ansökan 772945 (patent 58501)

Tämä keksintö koskee menetelmää konjugaatin valmistamiseksi allergiareaktioiden estämistä varten, jolla konjugaatilla on seuraava rakenne



tai sama rakenne kovalenttisesti sidottuna proteiiniin tai peptidiin peptidisidoksen avulla glutationiosan välityksellä.

Menetelmät allergioiden ja allergisten reaktioiden käsittelemiseksi ovat tähän saakka käsittäneet sen, että henkilölle annetaan antigeenia, joka aloittaa vasta-aineiden muodostuksen, jotka kilpailevat niiden vasta-aineiden kanssa, joiden muodostumisen herkiste aiheuttaa, jolloin hillitään tai vähennetään allergiareaktiota.

Tähän saakka tavallinen tapa allergiapotilaiden käsittelyssä käsittää allergiaa aiheuttavan aineen raa'an uutteen valmistuksen vesipitoisessa puskuriliuoksessa. Sitten potilaita käsitellään raa'an uutteen ensin pienillä ja sen jälkeen kasvavilla annoksilla pitkänä aikana. Tavallisesti kolmen tai useamman vuoden käsittely on välttämätön, ennen kuin

todetaan huomattavaa pysyvää paranemista. Käsittelyn edistyessä potilaalle annettavan raa'an uutteen määrää lisätään vähitellen. Lisätyn annoksen määrä jaannostelun tiheys riippuu potilaan yksilöllisestä herkkyydestä ja reaktioasteesta aikaisempiin annoksiin.

Koko raa'an herkisteuutteen ruiskutus pitkien aikajaksojen aikana saa aikaan estävien tai kilpailevien vasta-aineiden muodostumisen. On esitetty teorioita, että estävät vasta-aineet kilpailevat allergiavasta-aineen kanssa antigeenista ja antavat suojan allergiapotilaalle.

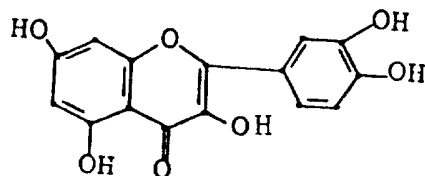
Kalliiseen ja aikaa vievään menetelmään herkkyyden poistamiseksi potilaalta liittyy monia selviä epäkohtia. Hyvin usein raa'an uutteen antamisesta on seurauksena vakava allergiareaktio, jos annokset eivät ole olleet huolellisesti valvottuja ja annosteltuja. Edelleen kilpailevien vasta-aineiden muodostuminen allergiapotilaassa aiheuttaa hyvin usein sivuvaikutuksia, jotka voivat olla potilaalle vahingollisempia kuin itse allergiareaktio.

Erittäin merkityksellistä on se, että tähän saakka käytetty aikaisemmin tunnettu menetelmä herkkyyden poistamiseksi potilaalta ei ole ollut kokonaisuudessaan menestyksellinen. Monissa tapauksissa aikaa vievästä herkkyyden poistomenetelmästä ei ole tuloksena riittävää suojaa potilaalle, joka vielä jatkuvasti kärsii allergiasta joutuessaan antigeenin vaikutuksen alaiseksi.

Tämän keksinnön tarkoituksena on aikaansaada tuote, joka soveltuu annettavaksi allergiapotilaalle ja joka neutraloi olemassa olevat vasta-aineet sekä täydellisesti estää sellaisten vasta-aineiden muodostuksen, jotka joko kilpailevat allergeenisen antigeenin kanssa tai ovat sille ominaisia.

Valmistettaessa tällaisia tuotteita, jotka estävät allergisen reaktion, on aikaansaatu menetelmä allergisten henkilöiden käsittelemiseksi allergiareaktioiden estämistä varten. Kysymyksessä oleva tuote voidaan valmistaa ruiskutettavaksi valmisteeksi sen antamiseksi allergiapotilaalle allergiareaktioiden estämistä varten.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on pääasiallisesti tunnusomaista se, että kversitiiniä, jolla on kaava

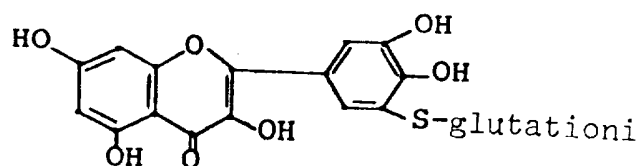


saatetaan reagoimaan glutationin kanssa hapettavan aineen, esimerkiksi hopeaoksidin läsnäollessa, minkä jälkeen muodostuneelle aineelle haluttaessa suoritetaan glutationiosan karboksyyli-ryhmien aktivointi esimerkiksi Woodwardin reagenssilla tai karbodi-imidillä, ja sen jälkeen konjugoidaan se glutamiinihappo- tai glysiiniosan välityksellä proteiinilla tai peptidillä, kuten humaanilla seerumialbumiinilla tai lyysiinin ja glutamiinihapon d-aminohappokopolymeerillä, jolloin kversitiini-glutationi-konjugaatin ja peptidin tai proteiinin moolisuhte on sopivimmin 2 - 30 moolia konjugaattia peptidi- tai proteiinimoolia kohti.

Termillä "konjugaatti" tarkoitetaan konventionaalista kemiallista yhdistettä, missä kyseiset reagenssit ovat kemiallisesti sitoutuneet toisiinsa - vastakohtana kompleksille, missä reagenssit ovat sitoutuneet vain löysästi toisiinsa vetysidoksien ym. avulla.

Niinpä näitä konjugaatteja voidaan antaa allergiapotilaalle allergiareaktion täydelliseksi estämiseksi tarvitsematta pitkää ja aikaavievää sekä kallista, edellä esitettyä herkkyyden poistomenetelmää. Koska konjugaattien antaminen estää täydellisesti allergiavasta-aineiden muodostumisen, estetään itse allergiareaktio samoin kuin mitkä tahansa sivuvaikutukset, jotka aiheutuvat niiden kilpailevien vasta-aineiden muodostumisesta, joita muodostuu tavallisen herkkyyden poistomenetelmän mukaan.

Tuloksia on saatu konjugaatilla, jonka rakenne on

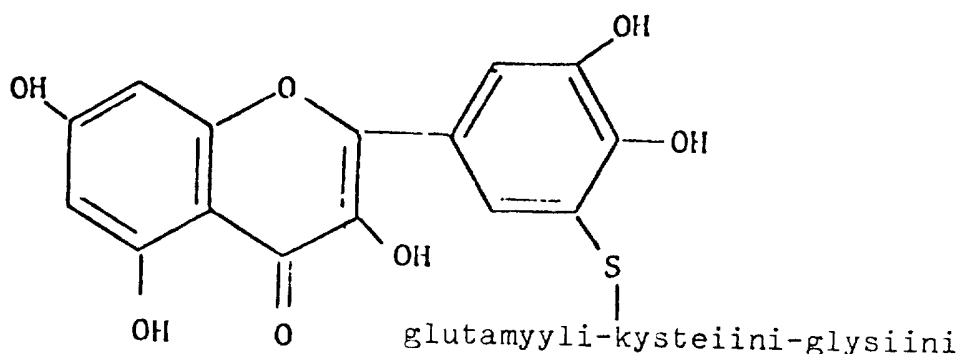
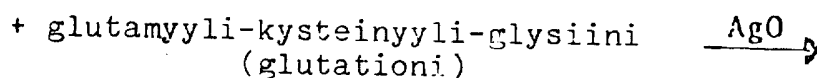
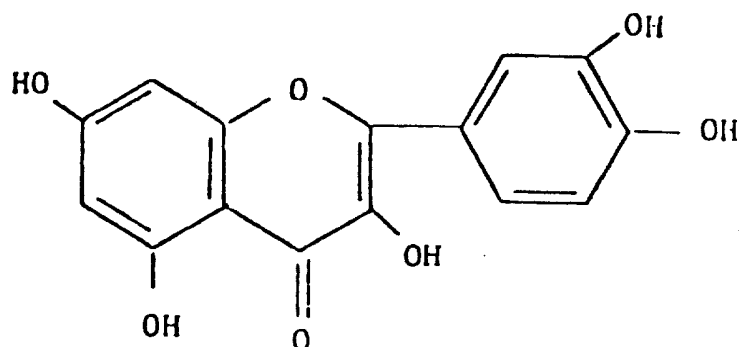


tai konjugaatilla, joka sisältää ainakin yhtä kversitiini-glutationi-konjugaattia kovalenttisesti sidottuna proteiiniin tai peptidiin peptidisidoksen avulla glutationiosan välityksellä. Näiden konjugaattien antaminen aikaansaa allergiavasta-aineiden muodostumisen täydellisen eston, olkoon kysymyksessä antigeeni tai kilpailevat vasta-aineet, ja allergiareaktion eston.

Edellä esitetyt kversitiini-glutathioni- ja kversitiini-glutathioni-proteiini-konjugaatit ovat siis tehokkaita allergiareaktion estoaineita.

Kversitiini-glutathioni-konjugaatti muodostetaan hapetus-additioreak-

tiolla käyttäen AgO:ta tai muuta sopivaa hapetinta:



Sen jälkeen saatu konjugaatti voidaan konjugoida peptidin tai proteiinin kanssa aktivoimalla glutathioniosan karboksyyli-ryhmät esimerkiksi Woodwardin reagenssilla, karbodi-imideillä tai sentapaisilla aineilla, mitä seuraa konjugaatio proteiini- tai peptidimolekyylin kanssa. Kversitiini-glutathioni sidotaan proteiiniin peptidisidoksen avulla glutathioniosan joko glutamiinihappo- tai glysiiniosan välityksellä.

Peptidinä tai proteiininä, joka on konjugoitu kversitiini-glutathioni-konjugaattiin, voi olla mikä tahansa peptidi tai proteiini, joka soveltuu annettavaksi allergiapotilaalle. Edullisia proteiineja ja peptidejä ovat ihmisen seerumalbumiini tai lyysiini ja glutamiinihapon d-amiino-

happokopolymeeri (d-GL).

On selvää, että kversitiini-glutationimolekyyli voidaan liittää proteiini- tai peptidimolekyylin eri kohtiin. Tavallisesti on edullista sitoa noin 2,0 - 30 moolia, sopivimmin 5 - 20 moolia kversitiini-glutationi-yhdistettä 1 mooliin proteiinia tai peptidiä. Moolisuhdetta voidaan vaihdella vaihtelemalla reagoivien aineiden moolisuhdetta valmistusmenetelmässä.

Edellä selostetut antigeeni-proteiinikompleksit voidaan sisällyttää mihin tahansa sopivaan väliaineeseen, kuten puskuroituun suolaliuokseen allergiapotilaalle antamista varten.

Tavallisia lisäaineita, apuaineita ja muita aineita voidaan lisätä valmisteeseen ruiskutusta varten. Kuitenkin on ymmärrettävää, että ne eivät ole välttämättömiä.

Tavallisesti valmisteet ruiskutetaan ihonalaisesti, lihaksensisäisesti tai laskimonsisäisesti.

Tavallisesti ruiskutettavat annokset, jotka sisältävät tuotetta noin 0,01 - 0,25 mg, sopivimmin 0,025 - 0,1 mg/kg kehon paino, ovat riittäviä aikaansaamaan allergiareaktion estokyvyn hyväksyttävän tason.

On ymmärrettävää, että annoksen suuruuden määräävät eri tekijät, kuten kompleksin kesto aika verenkierrossa, hoidossa olevan potilaan vasta-ainetiitteri, potilaan vastustuskyvyn tila ja IgE-vasteen hillinnän kesto aika.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut tuotteet ovat käyttökelpoisia käsiteltäessä ruoholle herkkiä potilaita allergiaoireiden vähentämiseksi. Ne ehkäisevät allergiavasta-aineiden muodostumisen ruohon siitepölyantigeeneja vastaan ja neutraloivat lisäksi potilaan elimistössä olemassa olevat vasta-aineet. On ymmärrettävää, että keksintö on käyttökelpoinen estettäessä ei ainoastaan timotein aiheuttamia allergiareaktioita, vaan myöskin pyörtäinölusteen ja muiden ruohojen siitepölyjen, jotka ristireagoivat, aiheuttamia allergiareaktioita.

Seuraavat esimerkit 1 ja 2 havainnollistavat keksinnön mukaisia valmistusmenetelmiä.

#### Esimerkki 1

##### Kversitiini-glutationin valmistus

1,5 g AgCl sekoitettiin 10 ml:n kanssa 4N NaOH 20 minuuttia. AgO-sakka suodatettiin Büchnerin suppilossa.

0,2 g glutatonia liuotettiin 4 ml:an 0,25N NaOH ja sijoitettiin jäähauteeseen. 0,2 g kversitiiniä liuotettiin 8 ml:an 0,25N NaOH. 1,2 g juuri valmistettua AgO lisättiin viimeksi mainittuun ja seosta sekoitettiin 15 - 20 minuuttia jäähauteessa.

Sitten lisättiin glutationiliuos ja seosta sekoitettiin yksi tunti jäähauteessa. Ylimäärä AgO poistettiin suodattamalla. Saadun liuoksen pH säädettiin arvoon 1 - 2,5 HCl:llä ja liuosta sekoitettiin 30 minuuttia.

Liuos suodatettiin vapaan kversitiinin poistamiseksi ja pH säädettiin arvoon 7 NaOH:lla. Vapaa glutationi määrättiin DNTB-menetelmällä (Anal. Biochem. 48, 1557, 1972).

#### Esimerkki 2

##### Kversitiini-glutacioni-proteiinikonjugaatin valmistus

40 mg kversitiini-glutacionia lisättiin 100 mg:an Woodwardin reagenssia ja sekoitettiin 10 minuuttia huoneen lämpötilassa. pH säädettiin arvoon 6,2 0,3 M kokodylaattipuskurilla (pH 6,8).

Sitten lisättiin 100 mg ihmisen seerumalbumiinia (HSA) samalla pitäen pH arvon 6,2 yläpuolella. Seoksen annettiin seisoa huoneen lämpötilassa 10 - 15 minuuttia ja sen jälkeen yön yli 4°C:ssa. Liuos väkevöitiin alipaineessa. Dialyysin avulla poistettiin vapaa kversitiini-glutacioni sen konjugaatista proteiinin kanssa.

Seuraavat kokeet havainnollistavat keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettujen tuotteiden esto-ominaisuuksia allergiareaktioita vastaan.

#### Biologisia kokeita

##### Koe 1

Histamiinin vapautuminen apinan keuhkokudoksesta, joka oli passiivisesti herkistetty allergiapotilaiden seerumilla, määrättiin menetelmän mukaan, jonka Malley et al on esittänyt julkaisussa J. Immunol. 100, 915 (1968). Verihera, jota käytettiin herkistämään apinan keuhkokudosta, oli saatu 20:n timoteille herkän potilaan ryhmästä, joiden potilaiden keskimääräinen allerginen vasta-ainetiitteri oli 1:750. Sitten apinan keuhkokudosta inkuboitiin kaksi tuntia 37°C:ssa seerumin kanssa. Ennen herkisteellä vaikuttamista kudosta inkuboitiin 10 minuuttia 37°C:ssa estoaineen kanssa. Antigeeninen vaikutus aikaansatiin inkuboimalla raa'an siitepölyuutteen (WST) optimiväkevyydellä 15 minuuttia 37°C:ssa.

Tulokset on esitetty taulukossa 1, jossa:

WST tarkoittaa koko timoteisiitepölyn vesiuutetta, joka on dialysoitu pienen molekyyllipainon omaavien fragmenttien poistamiseksi;

HSA tarkoittaa ihmisen seerumalbumiinia.

Kuten taulukossa 1 esitetyistä tuloksista käy selville, keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut konjugaatit ovat tehokkaasti vaikuttavia estoaineita allergiareaktioita vastaan.

Taulukko 1

| Valmiste                            | Konjugointi-<br>menetelmä                                     | Konjugointi-<br>suhde | Konjugaatin<br>väk.          | WST<br>antigeenin<br>väk.<br>(µg) | Välittöm.<br>antigeeni<br>vaikuttava<br>(µg) | Esto %         |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|----------------|
| WST                                 | -                                                             | -                     | -                            | 40                                | 2,7                                          | -              |
| Kversitiini-<br>glutathioni         | Hapetus ja<br>additio                                         | 1:1                   | 1,5 mg<br>0,75 mg<br>0,37 mg | 40<br>40<br>40                    | 0,32<br>0,86<br>1,2                          | 88<br>68<br>55 |
| Kversitiini-<br>glutathioni-<br>HSA | Hapetus ja<br>additio,<br>sitten<br>Woodwardin<br>reagenssi K | 20:1                  | 1,6 mg<br>0,80 mg<br>0,40 mg | 40<br>40<br>40                    | 0,37<br>0,70<br>1,13                         | 90<br>74<br>58 |

Koe 2

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettujen tuotteiden passiivista siirtoihoreaktiivisuutta verrattiin niihin antigeeneihin, jotka ovat läsnä timotein siitepölyssä.

0,1 ml veriheraa, joka sisältää vasta-aineita (20:n timoteille herkän potilaan ryhmän herasta keskimääräisen P-K tiitterin ollessa 750) ruiskutettiin ihonsisäisesti ei-allergisen vapaaehtoisen ihoon. 48 tuntia myöhemmin jokaista kohtaa, joka aikaisemmin oli herkistetty ko. veriheralla, käsiteltiin erilaisilla konjugaateilla. Annetussa veriherassa olevat allergiavasta-aineet reagoivat allergeenisten antigeeniaineiden kanssa paikallisena allergiareaktiona. Ellei antigeeniaine aloittanut allergiareaktioita, mitään paikallista reaktiota ei todettu.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetuilla tuotteilla sekä timotein siitepölyssä olevalla antigeeniaineella suoritettujen eri kokeiden tulokset on esitetty taulukossa 2, jossa dGL tarkoittaa glutamiinihapon ja lysiinin d-aminohappokopolymeeriä, jonka molekyylipaino on noin 40 000.

Taulukko 2

| Valmiste                      | Konjugointimenetelmä   | Konjugointisuhde | Antigeeni väk. | P-K reaktio |
|-------------------------------|------------------------|------------------|----------------|-------------|
| WST                           | -                      | -                | 1 µg           | 4 +         |
| Kversitiini<br>glutationi     | Hapetus ja additio     | 1:1              | 1,5 mg         | neg.        |
| Kversitiini<br>glutationi-dGL | Woodwardin reagenssi K | 12:1             | 100 µg         | neg.        |
| Kversitiini<br>glutationi-HSA | Woodwardin reagenssi K | 20:1             | 1,6 mg         | neg.        |

Taulukossa 2 esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetut tuotteet eivät aloita allergiareaktioita.

Seuraava koe havainnollistaa keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettujen tuotteiden kykyä ehkäistä allergiavasta-aineiden muodostumista.

### Koe 3

Alustavat tutkimukset osoittivat, että  $LAF_1$  hiiret kehittivät hyvän IgE:n (allergiavasta-aineet) timotein siitepölyä vastaan.

Eläimiin ruiskutettiin vatsakalvon sisäisesti 10  $\mu$ g WST:ä alunassa ja kolmen viikon kuluttua ne saivat toisen vatsakalvon sisäisen ruiskeen 10  $\mu$ g WST:ä alunassa. IgE tiitterit kohosivat alkuimmunoinnin jälkeen arvoihin välillä 1/100 ja 1/200 mitattuna PCA:na. IgE tiitterit antigeenin toisen ruiskeen jälkeen kohosivat arvoihin välillä 1/600 ja 1/800 mitattuna PCA:na.

Passiivinen ihon anafylaksia (PCA) mitattiin ruiskuttamalla 0,025 ml laimennettua seerumia hiiren tai rotan kylkeen. 72 tuntia (hiiri) tai 3 tuntia (rotta) myöhemmin ruiskutettiin eläimiin laskimonsisäisesti WST:tä Evansin sinisessä väriaineessa.

Kiertävän antigeenin ja kudoksen kiinnittyneen IgE:n välinen reaktio aikaansai paikallisen allergiareaktion ja tämä kohta tuli näkyväksi sinisen värin tihkumisena reagoivaan alueeseen. IgE tiitteri määrättiin alimpana laimennuksena, joka antaa positiivisen PCA-reaktion.

Se keksinnön mukainen tuote, joka valittiin koetarkoituksia varten, oli:

Kversitiini-glutathioni-dGL (Q-G-dGL): valmistettu konjugoimalla kversitiini-glutathioni dGL:ään keskimäärin 12 - 20 Q-G ryhmää/mooli dGL.

Q-G-dGL annettiin vatsakalvon sisäisesti 3 päivää ennen WST:n toista immunisointia.

|        |                 |         |                 |            |
|--------|-----------------|---------|-----------------|------------|
| päivä  | 0               | 18      | 21              | 28         |
| ruiske | WST<br>alunassa | Q-G-dGL | WST<br>alunassa | tihkuminen |

Tulokset: Kontrollieläimillä, jotka saivat suolaliuosta 18 päivänä, on seuraava IgE tiitteri-600; keskimääräinen reaktio 18 eläimessä.

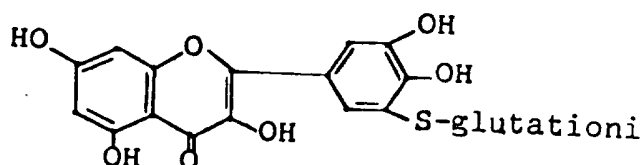
Q-G-dGL:llä käsiteltyt eläimet:

|                                              | <u>PCA tiitteri</u> | <u>Eläinryhmä</u> |
|----------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Pieni annos (0,24 mg<br>kversitiiniä)        | 600                 | 6                 |
| Keskikokoinen annos<br>(1,8 mg kversitiiniä) | 300                 | 6                 |
| Suuri annos (3,6 mg<br>kversitiiniä)         | 100                 | 6                 |

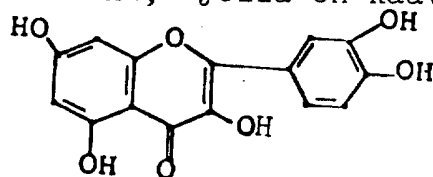
Nämä arvot osoittavat, että konjugaatti alentaa huomattavasti IgE-tasoa, kun antaminen tapahtuu 3 päivää ennen toista antigeeniruisketta, mikä osoittaa vasta-aineen neutralointia ja häviämistä. Samanlaiset kokeet ovat osoittaneet, että antaminen vieläpä 7 päivää ennen toista antigeeniruisketta antaa pääasiallisesti samat tulokset.

## Patenttivaatimus

Menetelmä konjugaatin valmistamiseksi allergiareaktioiden estämistä varten, jolla konjugaatilla on seuraava rakenne



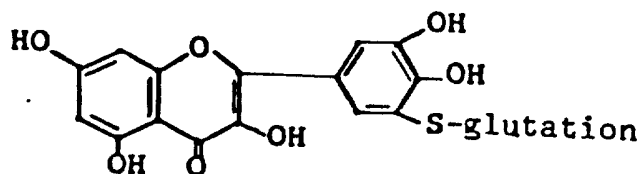
tai sama rakenne kovalenttisesti sidottuna proteiiniin tai peptidiin peptidisidoksen avulla glutationiosan välityksellä, t u n n e t t u siitä, että kversitiini, jolla on kaava



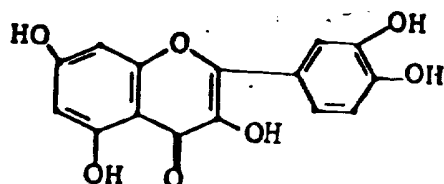
saatetaan reagoimaan glutationin kanssa hapettavan aineen, esimerkiksi hopeaoksidin läsnäollessa, minkä jälkeen muodostuneelle aineelle haluttaessa suoritetaan glutationiosan karboksyyli ryhmien aktivointi esimerkiksi Woodwardin reagenssilla tai karbodiimidillä, ja sen jälkeen konjugoidaan se glutamiinihappo- tai glysiiniosan välityksellä proteiinilla tai peptidillä, kuten humaanilla seerumialbumiinilla tai lysiinin ja glutamiinihapon d-aminohappokopolymeerillä, jolloin kversitiini-glutathioni-konjugaatin ja peptidin tai proteiinin moolisuhde on sopivimmin 2 - 30 moolia konjugaattia peptidi- tai proteiinimoolia kohti.

# Patentkrav

Förfarande för framställning av ett konjugat för blockering av allergireaktioner, vilket konjugat har följande struktur



eller samma struktur kovalent bunden till ett protein eller en peptid med hjälp av en peptidbindning via glutationdelen, k ä n n e - t e c k n a t därav, att quercitin med formeln



bringas att reagera med glutation i närvaro av ett oxidationsmedel, exempelvis silveroxid, varefter den bildade produkten om önskas underkastas aktivering av karboxylgrupperna i glutationdelen, till exempel med Woodwards reagens eller en karbodiimid, med påföljande konjugering med ett protein eller en peptid såsom humant serumalbumin eller en d-aminosyrakopolymer av lysin och glutaminsyra, via glutaminsyra- eller glycindelen, varvid molförhållandet quercitin-glutation-konjugat till peptid eller protein företrädesvis är 2 - 30 mol konjugat per mol peptid eller protein.

## Viitejulkauja-Anförda publikationer

-