



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

O (10) 1984:101  
1984:101  
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5  
A 61K 35/42, 31/575, 37/22  
(21) Patentihakemus - Patentansökning 844844  
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 07.12.84  
(24) Alkuperäinen - Löpdag 07.12.84  
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 09.06.85  
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -  
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.06.90  
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet  
08.12.83 DD 257641 P 08.12.83 DD 257642 P  
01.11.84 DD 268981 P

(71) Hakija - Sökande

1. VEB Arzneimittelwerk Dresden, Wilhelm-Pieck-Strasse 35, Radebeul, DDR, (DD)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Lachmann, Burkhardt, Spinolastrasse 32, Berlin-Karow, DDR, (DD)
2. Rattke, Wilfried, Karl-Marx-Strasse 7, Radebeul, DDR, (DD)
3. Boyde, Peter, Coswiger Strasse 1, Dresden, DDR, (DD)
4. Pötter, Heinrich, Finstere Gasse 14, Radebeul, DDR, (DD)
5. Dauth, Christoph, Scheringer Strasse 37, Radebeul, DDR, (DD)
6. Draheim, Regina, Wasastrasse 19/7, Radebeul, DDR, (DD)
7. Illhardt, Rolf, Bernhard-Voss-Strasse 24, Radebeul, DDR, (DD)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenus & Co Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä surfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston hoitamiseksi  
tarkoitettuna farmaseuttisen aineen valmistamiseksi  
Förfarande för framställning av ett farmaceutiskt medel för behandling av andnödssyndrom  
påkallande av surfaktantbrist

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 55041 (A 61K 45/08), GB A 2050832 (A 61K 31/685), US A 4397839 (A 61K 35/12)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu farmaseuttiseen aineeseen niiden sairauksien hoitamiseksi, jotka liittyvät pulmonaaliseen surfaktantti-systeemiin, varsinkin akuutin respiratorisen vajavaisuuden hoitamiseksi, sekä tämän valmistusmenetelmään. Tuotto tapahtuu sekoittamalla jauhettua keuhkoa tai vesipohjaista keuhkouutetta veteen sekoittumattoman lipidinliuottimen kanssa. Liukene-mattomien aineosien poiserottamisen jälkeen liuotin haihdutetaan ja liuottimesta vapaa vaikutusaine sekoitetaan alkoholiin kanssa, alkoholiin liukenemattomat aineosat erotetaan pois ja alkoholi poistetaan.

Menetelmän keksinnön mukaisen muunnoksen mukaan vaikutusaine voidaan sitoa isotonisesta vesiuutteesta myös liukenemattomaan adsorbenssiin, esimerkiksi piimaahan, eluoida orgaanisilla liuottimilla ja eristää. Liuottimesta vapaa, puhdistettu vaikutusaine emulgoidaan vesifaasissa ja kylmäkuivataan. Aine voidaan annostella aerosolin muodossa tai boluksena hengitysteiden kautta annoksena 1...500 mg/ml fysiologista kantajanestettä. Sitä voidaan käyttää kaikissa hengitystiesairauksissa, jotka ovat sidoksissa surfaktanttisysteemin häiriöön. Menetelmä johtaa aineeseen, jonka pääaineosat ovat 40...70 % fosfolipidiä, 10...40 % kolesterolia ja 5...30 % neutraalilipidejä. Proteiinipitoisuus on vähemmän kuin 1,5 %.

Uppfinningen avser ett farmaceutiskt medel för behandling av sjukdomar som är förbundna med förändringar i det pulmonala surfaktantsystemet, speciellt för behandling av akuta respiratoriska insufficienser, samt ett förfarande för framställning av medlet. Produktionen sker genom att blanda malen lunga eller ett vattenhaltigt lungextrakt med ett lipidlösningsmedel som inte blandar sig med vatten. Efter avskiljande av de olösta beståndsdelarna avlägsnas lösningsmedlet genom förångning och det lösningsmedelsfria verksamma ämnet blandas med alkohol, de beståndsdelar som inte är alkohollösliga avskiljs och alkoholen avlägsnas.

Enligt en variant av förfarandet enligt uppfinningen kan det verksamma ämnet också bindas från det isotoniska vattenextraktet på ett olösligt adsorbens, t.ex. kiselgur, elueras med organiska lösningsmedel och isoleras. Det lösningsmedelsfria renade verksamma ämnet emulgeras i vattenfas och lyofileras. Medlet kan appliceras i form av aerosol eller som bolus över andningsvägarna i en dos mellan 1 och 500 mg/ml fysiologisk bärvätska. Det kan användas vid alla andningsvägssjukdomar som är förbundna med störningar i surfaktantsystemet. Förfarandet leder till ett medel med huvudinnehållet bestående av 40...70 % fosfolipid, 10...40 % kolesterol och 5...30 % neutrallipid. Proteinhalten är under 1,5 %.

Menetelmä surfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston hoitamiseksi tarkoitetun farmaseuttisen aineen valmistamiseksi

Förfarande för framställning av ett farmaceutiskt medel för behandling av andnödssyndrom påkallande av surfaktantbrist

Keksintö kohdistuu menetelmään keuhkosurfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston hoitamiseksi tarkoitetun aineen valmistamiseksi nisäkkäiden keuhkoista. Tällä aineella voidaan hoitaa potilaita, joilla joko surfaktanttikerros ei ole vielä kehittynyt tai se on muuttunut patologisesti. Tyyppiä II olevien keuhkorakkulasolujen muodostamaa vaikutusainetta voidaan käyttää surfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston kausaaliterapiaan.

Hyaliinimembraanitauti (HDM) johtuu keuhkorakkulasurfaktantin puutteesta keuhkoissa ja sen seurauksena on ilmatyhjiön (atelectasis) kehittyminen. Kausaalinen lääkehoitomahdollisuus nähdään keuhkosurfaktantin antamisessa henkitorveen. Eläinkokeet ja ensimmäiset kliiniset kokeet vastasyntyneillä suoritettiin sekä luonnollisella surfaktantilla että sen pääaineosalla, dipalmityyllilesitiinillä, etupäässä yhdessä fosfatidyyli glyserolin kanssa. Eräät tutkijat (Morley, C. N., et. al.: The Lancet 1 (1981), s. 64...68) ovat pitäneet luonnollista surfaktanttia riittämättömänä terapeuttiseen käyttöön sen epätyytyttävän ja voimakkaasti vaihtelevan aktiivisuuden takia. T. Fujiwara on kehittänyt puolisynteettisen surfaktantin, joka on luonnollisesti esiintyvän nisäkkäiden keuhkoista peräisin olevan surfaktantin ja synteettisten fosfolipidien seos. 10 keskenkasvuisella vastasyntyneellä, joilla oli HDM, saavutettiin hyviä koetuloksia (Fujiwara, T. et. al. The Lancet 1 (1980), s. 55...59).

Keuhkosurfaktantin eristys voidaan suorittaa keuhkohomogenaatista (V. Neergard, K. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 41 (1929), s. 249; Clements, J. A. Proc. Sec. exp. Biol. (N.Y.) 95 (1957), s. 170) pervasaalisella huuhdonnalla (Bondurant, S., D.A. Miller, J. appl. Physiol. 17 (1962) s. 167) tai bronki-aalisella huuhdonnalla (Clements, J.A. Proc. Soc. exp. Biol. (M.V.) 95 (1957) s. 170). Vaikutusaineen terapeuttista käyttöä varten tulee kysymykseen ainoastaan eristys voimakkaasti jauhetusta keuhkokudoksesta. Näin eristetty uute ei tosin sisällä ainoastaan pinta-aktiivisen systeemin komponentteja, vaan myös käytetyistä uutto-olosuhteista riippuen keuhkojen ja keuhkoissa olleen veren liukoisia ja emulgoituvia aineosia.

Mahdollisuus tämän HMD:n hoitoon tarkoitetun pinta-aktiivisen materiaalin eristämiseksi on kuvattu hakemusjulkaisussa DE-OS 3021006. Elektrolyyttisellä liuotuksella eristetään nisäkäs-keuhkosta raakamateriaali, johon lisätään vaadittava määrä synteettistä fosfolipidiä fosfolipidipitoisuuden 75...95,5 % saavuttamiseksi. Proteiinipitoisuus on 0,5...5,0 %. Kun solujäännökset on erotettu 500...1500 rpm:ssä raaka vaikutusaineos saadaan sedimenttinä sentrifugoimalla 12000...16000 rpm:ssä ja 0...10 c:ssa. Jatkokäsittelyssä seuraa useampikertainen lipidien sekoitus natriumkloridiliuokseen ja erotus sentrifugoimalla korkeilla kierrosnopeuksilla. Dialyysin, asetoniuuton ja fosfolipidien kloroformi-metanoliseokseen tapahtuvan sekoituksen ja liuottimen haihdutuksen jälkeen saadaan vaikutusaineseos, johon sitten lisätään fosfaattipitoisuuteen katsoen molaarisessa suhteessa 1:0,65:0,12 dipalmityyllilesitiiniä ja fosfatidyyli glyserolia.

Myös muut kirjallisuudessa kuvatut menetelmät (Brown, E. S., et. al. J. Appl. Physiol. 14 (1959), s. 717; Jobe, A., Biochem. Biophys. Acta 489 (1977), s. 440...453, King, R. J., J. A. Clements, Am. J. Physiol. 223 (1972), s. 707...714, Berggren, P. et. al., IRCS Med. Sci. 9 (1981), s. 283...284) luonnollisen surfaktantin eristämiseksi perustuvat nisäkäskeuhkojen

uuttoon tai huuhteluun elektrolyyttiliuoksella ja sitä seuraavaan erotukseen toistuvalla sentrifugoinnilla eri g-arvoissa ja lämpötiloissa, jolloin fosfolipidien erotus vaatii suurten g-arvojen ja tiheysgradienttien käyttöä, mikä tuo mukanaan korkeat kulut mittakaavaa suurennettaessa.

Scarpelli, E.M. et al. (J. Appl. Physiol. 23 (1967), s. 880.. 886) eristivät raakasurfaktanttia uuttamalla koiran ja kaniinin keuhkoja isotonisen natriumkloridiliuoksen avulla ja sitä seuraavalla useampivaiheisella sentrifugoinnilla. Analyytettiin tarkoituksiin erotettiin surfaktantin aineosat geelisuodatuksella Sephadex G 200:n avulla. Eri partikkelikokojen ja pinta-aktiivisten ominaisuuksien johdosta geelisuodatus johtaa suuriin materiaalimenetyksiin ja ei näytä sopivalta preparaatiiviin tarkoituksiin.

Morley, C.J. et al. (The Lancet 1 (1981) s. 64...68) antoivat vastasyntyneille, joilla oli HDM, synteettistä keuhkosurfaktanttia, joka koostui dipalmityylilesitiinin ja fosfatidyyli-glyserolin seoksesta suhteessa 7:3, jonka vaikutus on kuitenkin riittämätön. Synteettisen, proteiinittomon dipalmityylilesitiinistä ja heksadekanolista koostuvan surfaktantin valmistuksen kuvaa Clements US-patenttijulkaisussa 4312600.

Keksinnölle on tunnusomaista oheisissa patenttivaatimuksissa esitetty menetelmä. Keksintö ratkaisee tehtävän aikaansaada yksinkertainen, suureen tekniseen mittakaavaan muunnettavissa oleva menetelmä, jolla voidaan valmistaa farmaseuttinen aine keuhkosurfaktanttipuutteen yhteydessä ilmenevän hengenahdistusoireston substituutioterapiaan käyttäen helposti saatavia apuaineita ja luonnollisia raaka-aineita. Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetun erityisen kokoomuksen omaavan luonnollisen surfaktantin avulla on mahdollista kaikkien niiden sairauksien kausaalinen terapia, joihin kuuluu muutos keuhkosurfaktantissa, erityisesti vastasyntyneiden ja aikuisten hengenahdistusoireisto. Tällaisella terapeuttisella aineella

on erityinen lääketieteellinen ja humanitäärinen merkitys, ennen kaikkea katsoen niiden vastasyntyneiden imeväiskuolleisuuden vähentämiseen, joiden surfaktanttikerros ei ole vielä kehittynyt sekä niiden potilaiden hätätilaterapiaa varten, joiden keuhkosurfaktanttia patologiset ilmiöt ovat vahingoittaneet.

Nyt on keksitty menetelmä surfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston hoitamiseksi tarkoitettun, fosfolipidiä, proteiinia, kolesterolia ja neutraalilipidiä sisältävän farmaseuttisen aineen valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että jauhettu keuhko tai vesipohjainen, isotonisella elektrolyyttiliuoksella tai mono- tai disakkaridien liuoksilla valmistettu keuhkouute

a) uutetaan kloroformilla, dikloorimetaanilla, tetrakloorimetaanilla tai petroolieetterillä, uute puhdistetaan liukenemattomista aineosista, lipidiliuotin poistetaan, suoritetaan uuttaminen vesiliukoisella alkoholilla, uute puhdistetaan alkoholiin liukenemattomista aineosista, alkoholi poistetaan ja puhdistettu vaikutusaine mahdollisesti fosfolipidifraktion lisäyksen jälkeen saatetaan hengitysteiden kautta tapahtuvaan annostukseen sopivaan muotoon, tai

b) kuten yllä valmistetusta keuhkouutteesta erotetaan solujäännökset sentrifugoimalla alhaisissa g-arvoissa, sen jälkeen uute saatetaan yhteyteen liukenemattoman adsorbenssin kanssa, pestään vedellä tai asetonilla, vaikutusaine vapautetaan siitä metanolin ja kloroformin muodostamalla liuotinseoksella, vaikutusainepitoinen liuos haihdutetaan kuiviin edullisesti vakuuissa ja vaikutusaine saatetaan hengitysteiden kautta tapahtuvaan annostukseen sopivaan muotoon,

jolloin vaihtoehdon a) tai b) mukaan saadaan aine, jonka fosfolipidipitoisuus on 40...70 %, proteiinipitoisuus on < 1,5 %, edullisesti 0,5...1 %, kolesterolipitoisuus on 10...40 % ja neutraalilipidien pitoisuus on 5...30 %.

Suuri osa häiritsevistä solunosista, erityisesti proteiinit, saostuvat tällöin ja ne voidaan erottaa helposti. Tähän asti surfaktantin liuotukseen pääasiassa analyyttisiä tarkoituksia varten käytetty uuttoaaine Folchin mukaan (kloroformi/metanoli tilavuussuhteessa 2:1) korvataan näin yhtenäisellä lipidinliuottimella ilman alkoholiosaa, edullisesti kloroformilla, edullisia ovat myös muut halogenoidut hiilivedyt. Näin voidaan välttää tähän asti tavallisissa laboratoriomenetelmissä käytetyt moninaiset sentrifugointivaiheet, osittain hyvin suuressa g-arvossa ja käyttäen tiheysgradientteja. Alkoholiosan poistamisella liuottimesta on etuna huomattava vähennys proteiini-osassa, joka vieraslajisuuden johdosta saattaa johtaa allergisiin reaktioihin sitä ihmisille annettaessa (Bergmann, K.-Ch., Lachmann, B. Z. Erkr. Atm. 137 (1972), s. 55...60; Morley, C.N. et al. The Lancet, Jan. 10 (1981), s. 64...68). Toisaalta vaikutuksen aikaansaamiseen välttämätön, vaikkakin pieni lipoproteiini-osa siirtyy uuton yhteydessä keksinnön mukaisissa koejärjestelyissä liuotinfasiin. Tämän kaiken lisäksi yhtenäisen lipidinliuottimen käyttö helpottaa liuottimen takaisin-saantia uudelleentislauksen avulla verrattuna eri liuottimien seoksen käyttöön ja näin ollen edistää menetelmän taloudellisuuden parantamista.

Keksinnön mukaisen menetelmän suorituksessa nisäkkään keuhkosta, etupäässä nautan tai sian keuhkosta, poistetaan rasvakudos ja henkitorven jäännökset, ja keuhko jauhetaan lihamyllyn avulla. Näin saatu keuhkojauhe joko sekoitetaan heti lipidinliuottimen kanssa, kuten kloroformiin tai muuhun halogenoituun hiilivetyyn, tai keuhkojauheesta valmistetaan vesiuute, edullisesti isotonisten elektrolyytti- tai sokeriliuosten avulla, ja tämä sekoitetaan lipidinliuottimen, kuten kloroformin tai jonkin muun halogenoidun hiilivedyn kanssa. Suora keuhkon utto lipidinliuottimella, kuten halogenoidulla hiilivedyllä, suoritetaan 0,5...10 l:lla liuotinta, edullisesti 1,5 l:lla

liuotinta kg keuhkojauhetta kohti.

Vesiuutteen valmistus tapahtuu 0,1...0,5 kg:lla keuhkoa liuoslitraa kohti, surfaktantin uutto 1 l:sta tätä liuosta on mahdollista 0,1...2,0 l:lla, edullisesti 0,25 l:lla lipidinliuotinta, edullisesti halogenoiduilla hiilivedyillä. Keuhkojäänökset erotetaan kulloinkin uutteista suodattamalla harsokankaalla, saostuvat proteiinit erotetaan vesiliuoksen kloroformikäsittelyn jälkeen edullisesti sentrifugoimalla. Saatu kloroformifaasi konsentroidaan suodatusselkeytyksen jälkeen vaakuumissa 40 c:ssa ja tämän jälkeen liuotin voidaan poistaa kokonaan johtamalla typpikaasua 40 c:ssa niin, että jäljelle jää tahnamainen, kellertävänruskea aine. Tämän fosfolipidipitoisuus on suorassa kloroformiuutossa 20...50 %, etupäässä 30...40 %, ja liitettäessä väliin vesiuutto 30...75 %, etupäässä 50...60 %. Näin saadun biologisesti jo hyvin vaikuttavan raakasurfaktantin proteiinipitoisuus on suoraa kloroformiuuttoa käytettäessä 0,8 ja 1,5 % välillä ja liitettäessä väliin vesiuutto alle 1 %, etupäässä 0,5 %:n vaiheilla.

Saadulle surfaktantille suoritetaan seuraavaksi alkoholiuutto. Siinä raaka surfaktanttiaine sekoitetaan nopeakierroksisessa sekoittimessa siten, että 1 g tätä ainetta tulee alkoholia 1...20 ml, edullisesti 3 ml, lämpötilavälillä, joka voi olla -10 c:n ja +60 c:n välissä. Liuottimina ovat käyttökelpoisia metanoli tai etanoli. Alkoholifaasi erotetaan suodattamalla tai sentrifugoimalla ja liuotin poistetaan.

Näin saadulla kuivalla aineella on seuraava koostumus ja sillä on henkitorven sisäisessä asennuksessa poikkeuksetta hyvä siedettävyyttä:

fosfolipidit	45...65 %
neutraalilipidit	10...25 %
kolesteroli	10...25 %
proteiini	0,5...1,5 %
vapaat rasvahapot	2...5 %

Fosfolipidit esiintyvät siinä seuraavassa suhteessa:

fosfatidyylikoliini	50...60 %
fosfatidyylyglyseroli	2...3 %
fosfatidyylietanoliamiini	10...20 %
fosfatidyyliiseriini	1...2 %
sfingomyeliini	10...25 %
fosfatidyyli-inosiitti	0,5...1 %

Edelleen havaittiin, että surfaktanttiaineen alkoholiuutto voidaan toistaa useamman kerran, siinä alkoholiin liukenematon jäännös sekoitetaan uudestaan etanolin tai metanolin kanssa uutolle mainituissa olosuhteissa. Nyt jäljelle jäävän liukeneettoman materiaalin kanssa voidaan suorittaa kolmas sekoitus analogisesti ensimmäisen ja toisen mukaisesti. Saadulla materiaalilla on ensimmäisen uutteen koostumus olennaisin osin, kuitenkin fosfolipidipitoisuus vähenee 3. uuton jälkeen jyrkästi, kun taas kolesterolipitoisuus kasvaa jatkuvasti uutovaiheiden lisääntyessä. 2. ja 3. uuton avulla voidaan valmistaa kuitenkin vielä hyvin vaikuttavaa ja henkitorvensisäisessä tiputuksessa (intratrakeaalinen instillaatio) poikkeuksetta siedettävää materiaalia.

Lisäksi havaittiin, että sitomalla keuhkosta uutettu surfaktantti liukenemattomaan adsorbenssiin, erityisesti pihappogeeliin tai aktivoituihin silikaatteihin ja eluoimalla tämän jälkeen fosfolipideille soveltuvilla liuottimilla voidaan yksinkertaisella tavalla eristää surfaktanttipreparaatti, joka osoittaa suurta farmakologista tehoa hengenhädistusoireiston hoidossa.

Keksinnön mukaisen menetelmän suorituksessa surfaktantin uutto hienonnetusta nisäkkäänkeuhkosta, edullisesti naudan- tai siankeuhkosta, tapahtui mono- tai disakkaridiliuoksilla, edullisesti isotonisella glukoosi- tai sakkaroosiliuoksella tai - kuten kirjallisuudessa on tunnettua -elektrolyyttiliuoksella, esim. isotonisella natriumkloridiliuoksella. Kun solukappaleet on erotettu sentrifugoinnilla alhaisissa g-arvoissa tunnetulla tavalla, vaikutusaineseos adsorboidaan pihappogeeliin tai aktivoituun magnesiumsilikaattiin. Tehollisen surfaktantin reversiibeli sitoutuminen pihappogeeliin ei ollut odotettavissa, koska kirjallisuudessa selvästi viitataan siihen, että tämän monikomponenttiseoksen fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet saavat aikaan irreversiibelin sitoutumisen kiinteään kromatografiainmateriaaliin, ja näin ollen biologisesti aktiivien surfaktantin eristys tällä tavalla ei ole suoritettavissa (King, R.J., Federation Proceedings 33 (1974), s. 2238... 2274). Kun adsorboitumaton materiaali on pesty pois tislatus vedellä tai asetonin avulla, aktiivinen vaikutusaine liuotetaan liuotinseoksella, edullisesti Folchin mukaan kloroformi/metanolilla pois adsorptioaineesta ja eristetään haihduttamalla vakuuissa tai kuivaamalla typpikaasua sisäänjohtamalla.

Saadaan luonnollinen surfaktantti, jonka fosfolipidipitoisuus on 30 ja 70 % välillä, edullisesti 40...50 %. Preparaatille on ominaista alhainen proteiinipitoisuus ( $\leq 0,5$  %). Mahdollisiin surfaktanttivalmisteiden sivuvaikutuksiin katsoen alhainen proteiinipitoisuus näyttää merkitykselliseltä, koska uuttopahtuman aikana uutteeseen joutuvat sekä seerumiproteiini että myös elinspesifiset proteiinit, joilla voi ilmetä antigeenisia ominaisuuksia niitä ihmisille annettaessa (Bergmann, K.-Ch., Lachmann, B., Z. Erkr. Atm. 137 (1972), s. 55...60; Morley, C.N. et al. The Lancet, 1 (1981), s. 64...68).

Seuraavia analyttisiä menetelmiä käytettiin analyttisten tulosten tutkimisessa:

Fosfolipidipitoisuus määritettiin Bartlettin (N. Zöllner und D. Eberhagen "Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut"; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965) julkaiseman menetelmän mukaan ( $s = \pm 2 \%$ ). Vertailuaineena oli kaliumfosfaatti. Kolesterolipitoisuus määritettiin kolorimetrisellä menetelmällä, joka käsittää kolesterolin lisäksi myös kolesteroliesterin määrityksen ( $s = \pm 4 \%$ ). Neutraalilipidit määritettiin 2. Arzneibuch der DDR:n triglyseridimääritysmenetelmällä, menetelmä 1 A.1.1. Proteiinipitoisuus määritettiin Hessen ja Lindnerin (Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 11 (1971), s. 585...594; ebenda 15 (1975), s. 559...561) selostaman menetelmän mukaan, joka soveltuu erityisen hyvin vesiemulsioiden proteiinipitoisuuksien tutkimiseen ( $s = \pm 3 \%$ ). Yksittäisten fosfolipidien määrittäminen suoritettiin P. Genterin ja työtovereiden mukaisesti (J. of Chromatography 206 (1981), s. 200...204) suoritetun ohutkerroskromatograafisen erotuksen jälkeen kolorimetrisesti (katso N. Zöllner und D. Eberhagen "Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1965) ( $s = \pm 3 \%$  pääkomponenteille). Vertailuaineena oli kaliumfosfaatti. Fosfolipidien eluutiohäviö on hajonnan sisällä. Vapaiden rasvahappojen pitoisuuden tutkinta tapahtuu ohutkerroskromatograafisen erotuksen ja kaasukromatograafisen eluution mukaisesti ( $s = \pm 10 \%$ ).

Keksinnön mukainen preparaatti muuttaa vesifaasin pintajännitystä. Pintajännityksen mittausta ja hystereesikäyrien aikaansaanti tapahtui Wilhelmy-vaa'an avulla, tyyppi ATF 01 (valmistaja Fa. E. Biegler, 301 Mauerbach, Itävalta) tunnetun menetelmän mukaisesti.

Ainemäärä: 5 $\mu$ l	60 mg fosfolipidi/ml
Tulos: kuva 1	esimerkin 2 aine
kuva 2	esimerkin 3 aine
kuva 3	esimerkin 9 aine
kuva 4	esimerkin 10 aine
kuva 5	esimerkin 18 aine

oordinaatta  
abskissa

pintajännitys  
suhteellinen pinta

Keksinnön mukaisen menetelmän mukaan saadut preparaattit osoittivat in vivo-kokeissa eläinmalleilla korkeaa tehoa ja niillä oli henkitorvensisäisessä tiputuksessa (intratrakeaalinen instillaatio) poikkeuksetta hyvä siedettävyys.

Toteennäyttö tapahtui seuraavilla eläinmalleilla:

1. Surfaktantin vaikutus aikuisten hengenahdistusoireistoon (vrt. taul. 2, kuva 9)

Surfaktanttiputuksen vaikutusta aikuisten hengenahdistusoireistoon tutkittiin marsuilla. Ennen akuutin hengitysvajavaisuuden tuottamista eläinten henkitorvi avattiin (trakeotomia) yleisen nukuttamisen jälkeen, A. carotikseen johdettiin katetri verenpoistoa varten ja keinohengitys hoidettiin vakiopaineisesti puhtaan hapen avulla. Akuutti hengenahdistusoireisto saavutettiin eläimillä surfaktantin 8-kertaisella keuhkoputkihuhdonnalla lämpimän fysiologisen suolaliuoksen avulla. Huhdonta-tilavuudet vastasivat eläinten vitaalikapasiteettia. Huhdonta-menettelyn lopussa oli valtimon hapenpaine näillä eläimillä alle 60 mm Hg huolimatta keinohengityksestä + 30 cm H<sub>2</sub>O:n huippupaineilla, 8 cm H<sub>2</sub>O:n positiivisesta endekspiratorisesta paineesta (Positive-Endexpiratory-Pressure, PEEP) ja puhtaasta hapesta. 10 ja 40 minuuttia viimeisen keuhkohuhdontan jälkeen puolet eläimistä saivat kukin 1 ml surfaktanttia tiputuksena henkitorveen. Verikaasuanalyysit seurasivat 5, 15 ja 30 minuuttia kulloisenkin surfaktantin annon jälkeen. Optimaalinen surfaktantti johtaa ehdottoman samojen keinohengitysolosuhteiden vallitessa välittömään valtimon hapenpaineen nousuun keskimäärin 200 mm Hg:n verran.

2. Surfaktantin vaikutus keskenkasvuisiin keuhkoihin  
(vrt. taul. 2, kuvat 6, 7 ja 8)

Surfaktantin vaikutuksen testaamiseksi keskenkasvuisiin keuhkoihin saatettiin keskenkasvuiset kaniininpoikaset syntymään kohtuleikkauksella (hysterektomia) 27. raskauspäivänä (raskauden kokonaiskestoaika:  $31 \pm 1$  päivää). Eläimille suoritettiin välittömästi syntymän jälkeen henkitorven avaus (trakeotomia) ja osa sai henkitorviliitosputken kautta keskimäärin 60  $\mu$ l surfaktanttia tiputettuna henkitorveen. Saman poikueen käsittelemättömät sisareläimet toimivat kontrolleina. Tämän jälkeen eläimet sijoitettiin vakio paineiseen kokovartalopletysmografiin (38 °C) ja keinohengitys suoritettiin puhtaalla hapella rekisteröiden jatkuvasti keinohengityspaine ja hengitystilavuus. Primääritiedoista seurasi rintakehä-keuhkokimmovastuksen laskeminen (thorax-keuhko-komplianssi). Muutamissa kokeissa kaikille eläimille suoritettiin keinohengitystä syntymän jälkeen 10...15 minuuttia ja vasta sen jälkeen osa eläimistä sai surfaktanttia tiputettuna henkitorveen.

3. Henkitorvitiputuksen (trakeaalinen instillaatio)  
jälkeinen sietokoe nuorilla rotilla (vrt. taul. 2)

Sietokoe nuorilla rotilla tapahtuu terapeutin annoksen konsentraatioalueella (200 mg fosfolipidiä/kg ruumiinpainoa) kolminkertaiseen terapeutin annokseen asti. Rottaa kohti (ruumiinpaino n. 50 g) käytetään 10...30 mg fosfolipidiä. Sietotestaukseen käytetään sekä naaras- että urospuolisia eläimiä, jolloin yhteen kokeeseen (n = 10) valitaan vain samaa sukupuolta olevia rottia.

Menetelmät

10 n. 50 g painoista rottia (uros- tai naaraspuolisia) nukutetaan eetterillä, sen jälkeen seuraa kaulaviilto sekä henkitorven tynkäpreparaatio. Preparaation jälkeen eetterinarkoosia syvennetään niin, että eläimet hengittävät tästedes yhdenmu- kaisesti. Taivutetulla 20-liitosputkella injektoidaan kulloin-

kin 10...30 mg fosfolipidiä/0,3 ml fysiologista keittosuolaliuosta. Injektion jälkeen viilto ommellaan kiinni. Havaintoaika kestää kokonaisuudessaan kaksi viikkoa, jolloin 72 tunnin jälkeen todetaan lopputulos. Testisarjaa (50...60 eläintä) kohti otetaan mukaan viisi kontrollieläintä, joihin kuhunkin injektoidaan 0,3 ml fysiologista keittosuolaliuosta.

Valmisteen stabiliteetin ja emulgoituvuuden lisäparannus on saavutettavissa lisäämällä fosfolipidifraktio, joka saadaan seuraavasti: Kun kuivattu keksinnön mukainen aine, jolla on edellä kerrottu koostumus, on liuotettu lipidiinliuottimeen, edullisesti kloroformiin, jolloin 0,1...1,0 g ainetta liuotetaan ml:aa kohti lipidiinliuotinta, seuraa fosfolipidifraktion asetonisaostus. Saostaminen suoritetaan  $-20...+20$  °C:ssa, edullisesti  $+5$  °C:ssa. Kloroformipohjaisen vaikutusaineliuoksen tilavuussuhde asetoniin on arvojen 1:1 ja 1:8 välillä, edullisesti 1:4.

Kun emäliuos on erotettu suodattamalla tai sentrifugoimalla ja kiinteä faasi pesty asetonilla, jonka lämpötila tulisi säätää edullisesti välille  $-10$  °C... $-20$  °C, kuivataan fosfolipidifraktio. Näin saatu lähes valkoinen aine, joka koostuu 70...90 %:isesti fosfolipideistä ja ei osoita mitään biologista aktiivisuutta em. malleissa, voidaan lisätä alkoholiuutolla saatuun surfaktanttiin.

Näin saadulla kuivatulla valmisteella on seuraava koostumus (menetelmät vastaavat jo esitettyjä menetelmiä):

fosfolipidit	60...75 %
neutraalilipidit	5...15 %
kolesteroli	10...20 %
proteiini	0,5...1,5 %
vapaat rasvahapot	2... 5 %

Fosfolipidit ovat siinä seuraavassa suhteessa:

fosfolipidikoliini	60...70 %
fosfatidyyli glyseroli	2... 4 %
fosfatidyylietanoliamiini	5...10 %

fosfatidyyli-eriini	1... 3 %
sfingomyeliini	10...20 %
fosfatidyyli-inosiitti	2... 3 %

Tämän menetelmän mukaan saadut valmisteet osoittivat in vivo-testauksessa jo esitetyillä eläinmalleilla korkeaa tehoa (vrt. taul. 2) ja niillä oli henkitorvensisäisessä tiputuksessa (intratrakeaalinen instillaatio) poikkeuksetta hyvä siedettävyyttä (vrt. taul. 2).

Myös toistetulla alkoholiuutolla ja asetonisaostuksella saatua fosfolipidifraktiota voidaan käyttää analogisella tavalla.

#### Farmaseuttisen aineen valmistus

Saadusta luonnollisesta surfaktantista, jonka fosfolipidipitoisuus on 40 ja 70 % välillä, valmistetaan seuraavassa kuvattun menetelmän avulla farmaseuttinen aine.

Kun aine on liuotettu etanoliin tai halogenoituihin hiiliveityihin, se esipuhdistetaan suodatuksessa lasisuodattimen ja suodatinpaperin kautta ja sen perään steriilisuodatetaan liuotinaiteita kestävien kalvojen kautta. Liuottimen tyhjiöhaihdutuksen jälkeen saatu jäännös emulgoidaan veden (pro injectio) tai steriilien vesiliuosten kanssa, täytetään lasiastioihin, syväjäähdytetään ja kylmäkuivataan.

Vesiliuoksina voidaan käyttää tässä isotonisia natriumkloriditai kalsiumkloridiliuoksia tai mono- ja disakkaridien isotonisia liuoksia. Homogenointiin soveltuu edullisesti Ultra-Turrax. Tämän lisäksi on mahdollista lisätä sopivia aineita emulgoitumiskyvyn parantamiseen, stabiliteetin nostamiseen ja puskurointiin määrättyjen pH-alueiden saavuttamiseksi.

Toinen mahdollisuus saada aikaan farmaseuttinen aine on -ilman steriilisuodatusta orgaanisissa liuoksissa - emulgointi heti veteen tai vesiliuoksiin, missä yllä esitetyt liuokset ja lisäykset sopivat samoin tässä, ja emulsion autoklavointi.

Jäähdytyksen jälkeen voidaan emulgointi suorittaa tarpeen tullen vielä uudestaan. Tämän jälkeen emulsio siirretään lasiastioihin, syväjäädätetään ja kylmäkuivataan.

### **Suoritus-esimerkit**

#### Esimerkki 1

4,1 kg:sta tuoretta naudankeuhkoa poistettiin rasvakudos, suuremmat henkitorven osat sekä verijäännökset ja samassa yhteydessä suoritettiin paloittelu. Sen jälkeen seurasi keuhkopalojen hienonnus lihamyllässä 4 mm reikäkiekolla ja näin saatua 3,5 kg keuhkojauhetta uutettiin 14,0 l:lla isotonista natriumkloridiliuosta tunnin kestävässä intensiivisessä sekoituksessa 20 °C:ssa.

Dederon-harsokankaan läpi suoritettun imun jälkeen saatiin 12,4 l sameaa uutetta, jota sekoitettiin 7,6 l suuruisen kloroformimäärän kanssa tunnin ajan 20 °C:ssa. Yli kolmen päivän seisotusajan jälkeen syntynyt hieno proteiinisaostuma sentrifugoitiin pois 15 min:ssa 2000 g:ssa. Saatiin 5,81 l kirkasta kloroformifaasia, joka rotaatiokierrätysvaihduttimessa tapahtuneen konsentroidin jälkeen haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena. Ainetta saatiin 6,14 g.

#### Esimerkki 2

200 kg:sta keuhkoa poistettiin rasvakudos ja suuret henkitorven osat ja keuhko jauhettiin lihamyllässä 8 mm reikäkiekolla. Keuhkojauhetta sekoitettiin 600 l:ssa isotonista natriumkloridiliuosta teollisuusuttolaitteessa 30 min 17 °C:ssa. 15 min. seisotusajan jälkeen kerääntyi suurin osa keuhkosta vesifaasin yläpuolelle. Vesifaasi voitiin imeä uuttolaitteen pohjasta ja erottaa separaattorilla sen vielä sisältämistä keuhkonosista ja verisolusta. 410 l vesiuutetta käsiteltiin edelleen 200 l kippiastioissa. Kaksi kertaa lisättiin 130 l:aan uutetta kulloinkin 1,1 kg vedetöntä kalsiumkloridia ja sekoitettiin kulloinkin 32,0 l:n suuruisen kloroformimäärän kanssa (2. AB-DDR)

25 min 15 °C:ssa ja yhden kerran 150 l uutetta, johon lisätty 1,2 kg vedetöntä kalsiumkloridia ja 36,0 l kloroformia (2. AB-DDR) sekoitettiin 25 min.

Yön yli jatkuneen seisotusajan jälkeen kussakin tapauksessa yläpuolinen vesifaasi ja sen mukana osa saostuneesta proteiinista dekantoitiin pois ja loput erotettiin päältä kuorivalla lingolla. Saatiin noin 60 l kloroformifaasia, jota väkevöitiin vakuumikierrätysaihduuttimessa ja sen jälkeen rotaatiokierrätysaihduuttimessa. Typen avulla poistettiin liuotinjäännökset. Ainetta saatiin 513 g.

#### Esimerkki 3

2,0 kg keuhkojauhetta, joka saatiin esimerkin 1 kuvaamalla tavalla 2,2 kg:sta naudankeuhkoa, sekoitettiin 5,0 l:n suuruisen kloroformimäärän kanssa 60 min 20 °C:ssa. Keuhkon poissuodatuksen jälkeen kloroformiute haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena rotaatiokierrätysaihduuttimessa tapahtuneen konsentroidin jälkeen. Näin saatiin ainetta 2,84 g.

#### Esimerkki 4

276 kg:sta tuoretta naudankeuhkoa poistettiin rasvakudos ja suuremmat henkitorven osat ja keuhkot jauhettiin teollisuuslihamyllyssä 8 mm reikälevyllä. Näin saatua 250 kg keuhkojauhetta sekoitettiin 300 l:n suuruisen kloroformimäärän kanssa teollisuusuuttolaitteessa 22 °C:ssa 60 min. Kloroformifaasi poistettiin 50 min seisotusajan jälkeen, konsentroidiin vakuumikierrätysaihduuttimessa ja vakuumirotaatioaihduuttimessa ja haihdutettiin kuiviin typpikaasua sisäänjohtamalla. Ainetta saatiin 950 g.

#### Esimerkki 5

7,2 kg:sta tuoretta naudankeuhkoa poistettiin rasvakudos ja suuremmat henkitorven osat ja keuhko jauhettiin lihamyllyssä jäännösveren poispesun jälkeen. 6,0 kg keuhkojauhetta sekoi-

tettiin annoksittain isotonisen natriumkloridin kanssa 30 min, jolloin 2,5 kg keuhkojauhetta kohti tuli 8,0 l vesiliuosta. Keuhkojäännösten dederonharsokankaan avulla tapahtuneen erotuksen jälkeen saadusta 17,6 l:sta uutetta 8,8 l:aan lisättiin 59,0 g vedetöntä kalsiumkloridia ja sekoitettiin 2,2 l suuruisen hiilitetrakloridimäärän kanssa 30 min. Orgaanista faasia saatiin 1,97 l. Liuottimen poiston jälkeen saatiin 2,34 g ainetta.

#### Esimerkki 6

Tuoreista naudankeuhkoista poistettiin rasvakudos, suuremmat henkitorvenosat sekä jäännösveri, ja keuhkot paloiteltiin. Sen jälkeen seurasi keuhkokappaleiden jauhaminen lihamylyssä 4 mm reikäkiekolla, ja näin saatu 65,0 kg keuhkojauhetta sekoitettiin 5 erässä, kukin 13,0 kg, kulloinkin 15,6 l suuruisen kloroformimäärän kanssa 30 min huoneenlämpötilassa. Keuhkojen poissuodattamisen jälkeen saatiin 10,5...11,5 l kloroformiuutetta. Nämä 5 uutetta yhdistettiin, konsentroitiin rotaatiokierrätysaihduuttimessa ja haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena. Raakasurfaktanttia saatiin 254 g. Tästä 55 g sekoitettiin 105 ml:n kanssa 96 % etanolia huoneenlämmössä Ultra-Turraxin avulla 5 min. Lämpötila kohosi tällöin 62 °C:een. Liukenematon jäännös suodatettiin pois ja kirkas etanoliuute konsentroitiin rotaatiokierrätysaihduuttimessa ja liuotin poistettiin kokonaan typpikaasun alaisena. Puhdasta surfaktanttia saatiin 11,9 g.

#### Esimerkki 7

12,0 kg:sta keuhkojauhetta, joka valmistettiin vastaten esimerkkiä 1, saatiin 15,0 l:n suuruisen kloroformimäärän kanssa suoritettuna 30 min. huoneenlämpöisen sekoituksen jälkeen 10,2 l uutetta. Liuottimen poiston jälkeen jäi jäljelle 50,24 g raakasurfaktanttia.

20 g tätä surfaktanttia sekoitettiin 80 ml:n suuruisen etanolimäärän kanssa 5 min  $-10^{\circ}\text{C}$ :ssa. Esimerkkiä 6 vastaavan käsittelyn mukaisesti saatiin 3,89 g puhdasta surfaktanttia.

#### Esimerkki 8

16,0 kg:sta keuhkojauhetta, joka valmistettiin esimerkin 6 mukaisesti, saatiin 18,2 l suuruisen kloroformimäärän kanssa tapahtuneen huoneenlämpöisen 30 min. sekoituksen jälkeen 14 l uutetta. Liuottimen poistamisen jälkeen jäi jäljelle 63,1 g raakasurfaktanttia. 26 g tätä raakasurfaktanttia sekoitettiin 80 ml suuruisen etanolimäärän kanssa 5 min. ajan  $15...20^{\circ}\text{C}$ :ssa. Esimerkkiä 6 vastaavan käsittelyn mukaisesti saatiin 8,45 g puhdasta surfaktanttia.

#### Esimerkki 9

125,0 kg:sta keuhkojauhetta, joka valmistettiin esimerkin 6 mukaisesti, saatiin eräkohtaisten yhteensä 150 l:lla kloroformia suoritettujen huoneenlämpöisten 30 min sekoitusten jälkeen 102,6 l uutetta. Liuottimen poiston jälkeen jäi jäljelle 520 g raakasurfaktanttia.

500 g tätä raakasurfaktanttia sekoitettiin 1500 ml suuruisen etanolimäärän kanssa 15 min ajan  $10...20^{\circ}\text{C}$ :ssa. Saatu uute käsiteltiin esimerkin 6 mukaisesti. Puhdasta surfaktanttia saatiin 198 g.

#### Esimerkki 10

150 g:sta esimerkin 9 puhdasta surfaktanttia saostettiin, kun aine oli liuotettu 320 ml:aan kloroformia ja jäädytetty  $0^{\circ}\text{C}$ :een, lisäämällä 960 ml syväjäädytettyä asetonia ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fosfolipidifraktio. Saostuma suodatettiin pois 3 h seisotusajan jälkeen, saostettiin ja kuivattiin. Fosfolipidifraktiota saatiin 97,0 g.

12 g tätä fosfolipidifraktiota ja 12 g esimerkin 9 puhdasta surfaktanttia emulgoitiin yhdessä ja niistä valmistettiin farmaseuttinen aine esimerkin 24 mukaisesti.

#### Esimerkki 11

39,4 g esimerkin 8 raakasurfaktanttia sekoitettiin 117,6 ml suuruisen metanolimäärän kanssa 15 min. ajan 28...34 °C:ssa. Esimerkin 6 mukaisen käsittelyn jälkeen saatiin 13,83 g puhdasta surfaktanttia.

#### Esimerkki 12

196,0 kg:sta keuhkojauhetta saatiin esimerkissä 6 kuvatulla menetelmällä 723 g raakasurfaktanttia. 603 g raakasurfaktanttia sekoitettiin 1809 ml suuruisen etanolimäärän kanssa 15 min. 15...20 °C:ssa. Etanoliutteesta saatiin liuottimen poiston jälkeen 240 g puhdasta surfaktanttia. Jäljelle jäi 365 g suuruinen etanoliin liukenematon jäännös.

#### Esimerkki 13

Esimerkin 12 365 g suuruinen jäännös sekoitettiin uudestaan 1200 ml:n suuruisen etanolimäärän kanssa samoissa olosuhteissa. Uutteesta saatiin vielä 59 g puhdasta surfaktanttia. Jäljelle jäi 314 g suuruinen etanoliin liukenematon jäännös.

#### Esimerkki 14

40 g esimerkin 13 puhdasta surfaktanttia liuotettiin 100 ml:aan kloroformia ja liuos jäädytettiin 8 °C:een. Tästä liuoksesta saostettiin fosfolipidifraktio lisäämällä 300 ml syväjäädytettyä asetonia. Sakka imettiin pois ja kuivattiin. Fosfolipidifraktiota saatiin 16,9 g.

Esimerkki 15

4,5 kg:sta tuoretta naudankeuhkoa poistettiin suuremmat verisuonet, henkitorven osat ja rasvakudos ja keuhkot paloitetiin. Keuhkokudoksen jauhaminen lihamylyssä 4 mm reikäkiekol-la seurasi keuhkonpalojen pesua, jossa poistettiin ennen muuta niihin jäänyt veri. Näin saatua keuhkojauhetta ravisteltiin intensiivisesti 500 g erissä kulloinkin 2,0 l suuruisen sakka-roosiliuoksen kanssa (114 g/l) 10 min. ajan. Suodattamalla muovisiivilällä ja sentrifugoimalla sen jälkeen suodos 500 g:ssa ja 20 °C:ssa saatiin 15,4 l vesiutetta.

7,0 l tätä uutetta sekoitettiin 420 g suuruisen määrän kanssa piihappogeeliä 60 min 20 °C:ssa pylväskromatografiaa varten. 16 tunnin 4 °C:isen seisotusajan jälkeen kirkas pintakerros juoksutettiin pois ja hylättiin. Piihappogeeli, jossa oli adsorboitu surfaktantti, pestiin lopun pintakerroksen poisime-misen jälkeen G 2 -sintterin päällä 1 l:lla tislattua vettä. Surfactantin eluointi tapahtui 1,5 l:lla kloroformi-metanoli-seosta (2:1). Kloroformifaasi erotettiin ja haihdutettiin kuivaksi typpikaasun alaisena. Tulokseksi saatiin 515 mg ai-  
netta.

Esimerkki 16

8,4 l esimerkissä 15 kuvattua vesiutetta sekoitettiin 500 g suuruisen Florisil<sup>R</sup>-määrän kanssa 30 min, 20 °C:ssa. 16 tunnin 4 °C:isen seisotusajan jälkeen kirkas pintakerros juoksutet-tiin pois ja hylättiin. Jatkokäsittely seurasi, kuten esimer-kissä 15 on kuvattu. Näin saatiin 600 mg ainetta.

Esimerkki 17

2,5 kg keuhkojauhetta, valmistettu kuten esimerkissä 15 on kuvattu, kylmäkuivattiin ja 3-viikkoisen kylmävarastoinnin jälkeen muokattiin vesiutteeksi samoin kuin esimerkissä 15 on

kuvattu. Keuhkolyofilisaatti lisättiin tällöin sen alkuperäisen tuorepainon mukaisesti. Esimerkistä 15 poiketen uuttoa-ineena toimi glukoosiliuos (55 g/l).

7,1 l vesiutetta sekoitettiin 420 g suuruisen pihappogeeli-määrän kanssa 60 min 20 °C:ssa pylväskromatografiaa varten. Esimerkissä 15 esitettyjen varianttien mukaisen adsorbaatin käsittelyn jälkeen saatiin 310 mg ainetta.

#### Esimerkki 18

36,0 kg tuoretta naudankeuhkoa muokattiin, kuten on kuvattuna esimerkissä 1, keuhkojauheeksi. Kutakin 500 g:aa tätä jauhet-tua keuhkoa sekoitettiin kulloinkin 2,0 l kanssa isotonista natriumkloridiliuosta 60 min 20 °C:ssa intensiivisesti. Dede-ronharsokankaan läpi tapahtuneen suodatuksen ja suodoksen 500 g:saa ja 20 °C:ssa tapahtuneen sentrifuoginnin jälkeen saatiin 120 l vesiutetta.

Kutakin 30 l uutetta sekoitettiin 2,5 kg suuruisen Florisil<sup>R</sup>-määrän kanssa 60 min 20 °C:ssa. Adsorptioaineen asetuttua pintakerros (kulloinkin 26...28 l) dekantoitiin pois ja sekoitettiin uudestaan 2,0 kg suuruisen Florisil<sup>R</sup>-määrän kanssa 60 min 20 °C:ssa. Yksittäiset Florisil-adsorbaatit pestiin kul-loinkin 5 l:lla tislattua vettä ja eluoiitiin kulloinkin 6,4 l:lla kloroformi-metanoli-seosta (2:1).

Kloroformifaasit yhdistettiin ja typpikaasun alaisen haihdu-tuksen jälkeen saatiin 12,2 g ainetta.

#### Esimerkki 19

9,35 kg:sta tuoretta naudankeuhkoa saatiin esimerkin 15 mukai-esti intensiivisesti sekoittamalla 500 g erissä kulloinkin 2,0 l suuruisen määrän kanssa isotonista natriumkloridiliuosta 20 °C:ssa 31,7 l vesiutetta, 23,0 l tätä uutetta sekoitettiin 1,5 kg suuruisen Florisil<sup>R</sup>-määrän kanssa 60 min 20 °C:ssa. Pintakerroksen erottamisen jälkeen surfaktanttipitoinen Flori-

sil<sup>R</sup> jaettiin kahteen yhtä suureen erään. Toinen puoli pestiin 4 l:lla vesijohtovettä, toinen 3 l:lla asetonia. Kumpikin osa eluoiitiin sen jälkeen 2 l:lla kloroformi-metanoli-seosta (2:1), kloroformifaasit erotettiin ja haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena. Vedellä pesty adsorbaatti tuotti 1,0 g, asetonilla pesty adsorbaatti 0,62 g ainetta.

#### Esimerkki 20

8,0 l esimerkissä 19 saatua uutetta sekoitettiin 1,2 kg suuruisen määrän kanssa pihhappogeeliä 60 min 20 °C:ssa. Pintakerroksen erottamisen jälkeen surfaktanttipitoinen pihhappogeeli pestiin 4 l:lla vesijohtovettä ja eluoiitiin 2 l:lla dikloorimetaani-metanoliseosta (2:1). Kuiviin haihdutettu dikloorimetaanifaasi tuotti 422 mg ainetta.

#### Esimerkki 21

9,0 l:sta vesiuutetta, joka valmistettiin, kuten esimerkissä 19 on kuvattu, saatiin, kun se oli sekoitettu 2 kg suuruisen piimaamäärän kanssa, adsorbantti pesty 10 l:lla vesijohtovettä ja surfaktanttimateriaali eluoiu 60 minuutin pituisella sekoituksella 2,8 l:ssa kloroformi-metanoliseosta (2:1), 600 ml kloroformifaasia. Tämä haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena ja tuotto oli 1,3 g ainetta.

#### Esimerkki 22

3,0 l:sta vesiuutetta, joka oli valmistettu, kuten esimerkissä 19 on kuvattu, saatiin, kun sitä oli sekoitettu 0,68 kg suuruisen ja esimerkissä 19 jo käytetyn ja 2N NaOH-käsittelyllä regeneroidun pihhappogeelimäärän kanssa ja adsorbantti pesty 2 l:lla asetonia ja surfaktanttimateriaali eluoiu 60 minuutin pituisella sekoituksella 1000 ml:ssa kloroformi-metanoli-seosta, 960 ml kloroformifaasia. Tämä haihdutettiin kuiviin typpikaasun alaisena ja tuotto oli 0,6 g ainetta.

Esimerkki 23

9,0 kg keuhkojauhetta, joka oli valmistettu kuten esimerkissä 1 on kuvattu, uutettiin 18:ssa 0,5 kg erässä kulloinkin 2,0 l:lla isotonista keittosuolaliuosta 10 minuutin voimakkaalla ravistelulla ja keuhkojännökset erotettiin muovisiivilällä ja dederonharsokankaalla. Saadut 34 l uutetta kaadettiin 2,0 kg:lla Florisil:a täytettyyn pylvääseen (läpimitta 15 cm, täyttökorkeus 25 cm). Sen jälkeen suoritettiin pesu 10,0 l:lla tislattua vettä ja vaikutusaine eluoiitiin 7,5 l:lla kloroformi-metanoliseosta (2:1). Yön yli jatkuneen seisotuksen jälkeen voitiin eluaatin metanolifaasi imeä pois. Kloroformifaasi haihdutettiin kuiviin vakuuissa. Surfaktanttia saatiin 2,65 g.

Esimerkki 24

20 g keksinnön mukaista vaikutusainetta (fosfolipidipitoisuus: 60,1 %) liuotettiin denaturoimattomaan etanoliin, esisuodatettiin G 4-sintterin kautta (päällepanu lasikuitusuodatinpaperi NK VIII) ja steriloitiin sen jälkeen sartorius-suodattimen SM 116-07 kautta. Steriilin liuoksen vakuuimirotaatiohaiduttimes- sa tapahtuneen konsentroinnin jälkeen liuotinjäänteet poistettiin johtamalla steriiliä typpikaasua samanaikaisesti imettäessä tyhjiö astiaan. Näin saatu steriili aine emulgoitiin 180 ml:lla steriiliä vettä Ultra-Turraxin avulla ja emulsio täytettiin 25 ml:n pyöreäreunaisiin pulloihin (Rollrandflasche) niin, että 17 pulloa sisälsi kukin 400 mg fosfolipidiä. 3 päivän pituisen - 50 c:isen jäädytyksen jälkeen koenäytteet kylmäkuivattiin vastalämmityksen ollessa asetettuna maksimi 20 c:een. Kylmäkuivatuksen jälkeen pullot suljettiin pistotulpilla (Durchstechstopfen) B 180 ja Alu-capsolut-sulkimilla.

Esimerkki 25

5,0 g keksinnön mukaista vaikutusainetta (fosfolipidipitoisuus: 56,8 %) liuotettiin 50,0 ml:aan kloroformia (2. Arzneibuch der DDR), esisuodatettiin lasikuitusuodatinpaperin (ker-

rospaksuus 1,80 mm) ja suodatinpaperin kautta sekä sen jälkeen steriilisuodatettiin selluloosasteriilisuodattimen (0,2 um huokosläpimitta, 90 um kerrospaksuus) ja päällä olevan lasikuituesisuodattimen (kerrospaksuus 450 um) kautta. Steriilin liuoksen vakuuimirotaatiohaiduttimessa tapahtuneen konsentroidinnin jälkeen liuotinjäännökset poistettiin johtamalla steriiliä typpikaasua samanaikaisesti imettäessä tyhjiö astiaan. Näin saatu steriili aine emulgoitiin 40,0 ml:lla steriiliä vettä Ultra-Turraxin avulla ja emulsio täytettiin 25 ml pyöreäreunaisiin pulloihin (Rollrandflasche) niin, että 7 pulloa sisälsivät 400 mg fosfolipidiä. Kolmen päivän pituisen - 50 c:isen jäädytyksen jälkeen koenäytteet kylmäkuivattiin vastalämmityksen ollessa asetettuna maksimi 20 c:een. Kylmäkuivauksen jälkeen pullot suljettiin pistotulpilla (Durchstechstopfen) S 180 ja Alu-capsolut-sulkimilla.



Kokonais-		PL	PC	PE	PG	Sph	PS	PI	Prote- iini	Neutraali- lipidi	Koles- teroli	Vapaat rasva- hapot	Vesi
<hr/>													
Esimerkki	19												
vesi- muunnos	34,2	ei määritetty							0,3	16,2	40,2	ei määritetty	
asetoni- muunnos	40,1	ei määritetty							0,1	12,3	37,3	ei määritetty	
Esimerkki	20	21,2	ei määritetty						0,3	28,7	39,3	ei määritetty	
Esimerkki	21	40,0	ei määritetty						0,4	17,4	31,6	ei määritetty	
Esimerkki	22	50,0	ei määritetty						0,4	11,8	29,4	ei määritetty	
Esimerkki	23	38,2	ei määritetty						0,5	18,3	33,7	ei määritetty	

**x** fosfolipidifraktio

Lyhenteet:	PL	fosfolipidi
	PC	fosfatidyylikoliini
	PE	fosfatidyylietanoliini
	PG	fosfatidyyli glyseroli
	Sph	Sfingomyeliini
	PS	fosfatidyyliiseriini
	PI	fosfatidyyli-inosiitti

Taulukko 2

Biologinen teho ja siedettävyyys

	Siedet- tävyys	Kimmovastus (ml/cm H <sub>2</sub> O · kg <sup>-1</sup> ) + 25 cm H <sub>2</sub> O keinohengitys- paineessa, 30 minuuttia synty- män jälkeen		Valtimon hapenpaine (mm Hg) kokeelli- sessa keuhkokuuhdonnalla aikaansaadu- sa hengenahdistusoireistossa ennen ja jälkeen surfaktanttiiputuksen.
Esimerkki 1	ei määrit.	1,18 ± 0,24	4	ei määritetty
Esimerkki 2	ei määrit.	1,01 ± 0,32	5	ei määritetty
Esimerkki 3	ei määrit.	1,36 ± 0,21	5	51 ± 8      224 ± 40      3
Esimerkki 4	ei määrit.	1,12 ± 0,24	8	ei määritetty
Esimerkki 5	ei määrit.	1,75 ± 0,31	4	ei määritetty
Esimerkki 6	1,0	1,4 ± 0,3	5	53 ± 4      365 ± 44      5
Esimerkki 7	0,9	1,6 ± 0,4	7	61 ± 8      306 ± 28      5
Esimerkki 8	1,0	1,6 ± 0,3	6	ei määritetty
Esimerkki 9	1,0	1,1 ± 0,4	4	48 ± 5      254 ± 73      6
Esimerkki 10x	1,0	0,2 ± 0,1	5	54 ± 8      125 ± 38      4
Esimerkki 10	1,0	1,4 ± 0,3	7	52 ± 4      283 ± 51      4
Esimerkki 11	0,9	1,3 ± 0,2	6	56 ± 10      311 ± 61      5
Esimerkki 12	1,0	1,8 ± 0,4	6	46 ± 6      243 ± 45      5
Esimerkki 13	1,0	1,6 ± 0,4	7	71 ± 15      226 ± 38      4
Esimerkki 14x	1,0	0,3 ± 0,1	4	ei määritetty
Esimerkki 15	ei määrit.	1,01 ± 0,73	4	ei määritetty

Taulukko 2

Biologinen teho ja siedettävyyys

Siedet- tävyys	Kimmovastus (ml/cm H <sub>2</sub> O · kg <sup>-1</sup> ) + 25 cm H <sub>2</sub> O keinoherkkyys- paineessa, 30 minuuttia synty- män jälkeen	n	Ennen tipu- tusta	30 minuuttia tiputuksen jälkeen	Valtimon hapenpaine (mm Hg) kokeelli- sessa keuhkokuudonnalla aikaansaatus- sa hengenahdistusoireistossa ennen ja jälkeen surfaktanttitiputuksen.
Esimerkki 16 ei määrit.	1,60 ± 0,51		7	55 ± 3	280 ± 33
Esimerkki 17 ei määrit.	1,20 ± 0,24		3	42 ± 11	238 ± 96
Esimerkki 18 ei määrit.	1,53 ± 0,02		2	51 ± 6	272 ± 52
Esimerkki 19					
vesi- muunnos ei määrit.	1,27 ± 0,33		6	46 ± 2	225 ± 81
asetoni- muunnos ei määrit.	1,14 ± 0,23		4	ei määritetty	
Esimerkki 20 ei määrit.	1,01 ± 0,02		5	38 ± 14	218 ± 35
Esimerkki 21 ei määrit.	1,19 ± 0,41		8	49 ± 8	284 ± 25
Esimerkki 22 ei määrit.	ei määrit.			60 ± 17	252 ± 62
Esimerkki 23 ei määrit.	1,26 ± 0,46		4	ei määritetty	
Kontrollieläimet					
Esim. 1...5 ei määrit.	0,095 ± 0,061		124	56 ± 18	88 ± 59
Esim. 6...14 1,0	0,07 ± 0,04		62	49 ± 5	98 ± 74
Esim. 15...23 ei määrit.	0,08 ± 0,06		98	61 ± 15	90 ± 51

27

81261

x fosfolipidifraktio

Siedettävyyden laskeminen: Siedettävyyys on eloonjääneiden eläinten määrän suhde eläinten kokonaismäärään (n=10), s.o. 1,0 tarkoittaa kaikkien 10 eläimen eloon-  
jäämistä. Ainetta sanotaan siedettäväksi, kun vähintään 9 eläintä jää eloon.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä surfaktanttipuutteen aiheuttaman hengenahdistusoireiston hoitamiseksi tarkoitetun, fosfolipidiä, proteiinia, kolesterolia ja neutraalilipidiä sisältävän farmaseuttisen aineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että jauhettu keuhko tai vesipohjainen, isotonisella elektrolyyttiliuoksella tai mono- tai disakkaridien liuoksilla valmistettu keuhkouute

a) uutetaan kloroformilla, dikloorimetaanilla, tetrakloorimetaanilla tai petroolieetterillä, uute puhdistetaan liukenevimmista aineosista, lipidiliuotin poistetaan, suoritetaan uutaminen vesiliukoisella alkoholilla, uute puhdistetaan alkoholiin liukenemattomista aineosista, alkoholi poistetaan ja puhdistettu vaikutusaine mahdollisesti fosfolipidifraktion lisäyksen jälkeen saatetaan hengitysteiden kautta tapahtuvaan annostukseen sopivaan muotoon, tai

b) kuten yllä valmistetusta keuhkouutteesta erotetaan solujäännökset sentrifugoimalla alhaisissa g-arvoissa, sen jälkeen uute saatetaan yhteyteen liukenemattoman adsorbenssin kanssa, pestään vedellä tai asetonilla, vaikutusaine vapautetaan siitä metanolin ja kloroformin muodostamalla liuotinseoksella, vaikutusainepitoinen liuos haihdutetaan kuiviin edullisesti vakuuimissa ja vaikutusaine saatetaan hengitysteiden kautta tapahtuvaan annostukseen sopivaan muotoon, siten, että saadaan aine, jonka fosfolipidipitoisuus on 40...70 %, proteiinipitoisuus on < 1,5 %, edullisesti 0,5...1 %, kolesterolipitoisuus on 10...40 % ja neutraalilipidien pitoisuus on 5...30 %.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään vesipohjaista keuhkouutetta, joka on valmistettu sekoittamalla jauhettua keuhkoa 2...10-kertaisen painomäärän kanssa isotonista keittosuolaliuosta tai mono- tai disakkaridien liuoksia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kg:aa jauhettua keuhkoa kohti käytetään 0,5...10 l, edullisesti 1,5 l lipidiliuotinta, tai vesipohjaista keuhkouutetta uutetaan 0,1...2-kertaisella tilavuudella lipidinliuotinta.
4. Patenttivaatimuksen 1 kohdan a) mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että uutto vesiliukoisella alkoholilla toistetaan.
5. Patenttivaatimuksen 1 kohdan a) tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesiliukoisena alkoholina käytetään edullisesti etanolia ja/tai metanolia, ja että uuttolämpötila on  $-20^{\circ}\text{C}$ :n ja  $+60^{\circ}\text{C}$ :n välillä, edullisesti 10 ja  $30^{\circ}\text{C}$ :n välillä.
6. Patenttivaatimuksen 1 kohdan a), 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että raa'an vaikutusaineen uutto suoritetaan suhteessa 1...30 ml alkoholia/g raakaa vaikutusainetta, edullisesti 2...20 ml/g.
7. Patenttivaatimuksen 1 kohdan a) mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistettu vaikutusaine sekoitetaan mahdollisesti fosfolipidifraktioon kanssa suhteessa 10:1...1:2, edullisesti 1:1, jolloin fosfolipidifraktio on tuotettu liuottamalla 0,05...2 g vaatimuksen 1 kohdan a) mukaisesti saatua vaikutusainetta 1 ml:aan lipidiliuotinta ja saostamalla se seuraavaksi asetonin avulla suhteessa 1:0,5...1:10, edullisesti välillä 1:3...1:5.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosfolipidifraktioon saostus suoritetaan  $-20^{\circ}\text{C}$ ... $+40^{\circ}\text{C}$ :ssa, edullisesti  $2^{\circ}\text{C}$ ... $10^{\circ}\text{C}$ :ssa.
9. Patenttivaatimuksen 1, kohdan b) mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorbenssina käytetään aktivoitua piihappogeeliä tai magnesiumsilikaattia.

10. Patenttivaatimuksen 1 kohdan b) tai 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaikutusaineen poisliuottamiseen adsorbenssista käytetään liuotinseosta, joka koostuu kloroformista ja metanolista suhteessa 2:1.

11. Menetelmä lääkemuodon valmistamiseksi farmaseuttisesta aineesta, jossa on 40...70 %:n fosfolipidipitoisuus, < 1,5 %:n, edullisesti 0,5...1,0 %:n proteiinipitoisuus, 10...40 %:n kolesterolipitoisuus ja neutraalilipidien pitoisuus 5...30 % ja joka sisältää 1...500 mg, edullisesti 70...150 mg vaikutusaineseosta ml:a fysiologista kantajanestettä kohti, t u n n e t t u siitä, että vaikutusaineseos liuotetaan etanoliiin tai kloroformiin, mahdollisesti puhdistetaan liukene-mattomista aineosista, steriilisuodatetaan, haihdutetaan kuiviin vakuumissa, emulgoidaan tislattulla vedellä ja kylmä-kuivataan.

#### Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett farmaceutiskt preparat för behandling av andningssyndrom som förorsakats av surfaktantbrist, vilket preparat innehåller fosfolipid, protein, kolesterol och neutrallipid, k ä n n e t e c k n a t därav, att finfördelat lunga eller ett vattenhaltigt lungextrakt, som framställts med isotoniska elektrolytlösningar eller lösningar av mono- eller disackarider,

a) extraheras med kloroform, diklormetan, tetraklormetan eller petroleumeter, extraktet befrias från olösta beståndsdelar, lipidlösningsmedlet avlägsnas, extraktion utförs med en vattenlöslig alkohol, extraktet befrias från de alkohololösliga beståndsdelarna, alkoholen avlägsnas och det renade verk-samma ämnet bringas efter en eventuell tillsats av en fosfo-lipidfraktion i en form som är lämplig för applikation via andningsvägarna, eller

b) cellresterna separeras ur det som ovan erhållna lungextraktet genom centrifugering vid låga g-tal, varefter extraktet bringas i kontakt med en olöslig adsorbens, tvättas med vatten eller aceton, det verksamma ämnet frigörs därur med en lösningsmedelsblandning av metanol och kloroform, lösningen som innehåller det verksamma ämnet intorkas fördelaktigt under vakuum och bringas i en form som är lämplig för applikation via andningsvägarna,

så, att man erhåller ett ämne, vars fosfolipidhalt är 40...70 %, proteinhalt är < 1,5 %, fördelaktigt 0,5...1 %, kolesterolhalt är 10...40 % och neutrallipidhalt är 5...30 %.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder ett vattenhaltigt lungextrakt, som framställts genom att blanda in finfördelad lunga med en 2...10-faldig viktmängd av en isotonisk koksaltlösning eller lösningar av mono- eller disackarider.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man per kg finfördelad lunga använder 0,5...10 l, fördelaktigt 1,5 l lipidlösningsmedel, eller att det vattenhaltiga lungextraktet extraheras med en 0,1...2-faldig volym av lipidlösningsmedel.

4. Förfarande enligt patentkravet 1 punkt a), k ä n n e t e c k n a t därav, att extraktionen med den vattenlösliga alkoholen upprepas.

5. Förfarande enligt patentkravet 1 punkt a) eller 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man som vattenlöslig alkohol använder företrädesvis etanol och/eller metanol och att extraktionstemperaturen är mellan - 20°C och + 60°C, fördelaktigt mellan 10 och 30°C.

6. Förfarande enligt patentkravet 1 punkt a), 4 eller 5 k ä n n e t e c k n a t därav, att extraktionen av det råa verksamma ämnet utförs i förhållandet 1...30 ml alkohol/g rått verksamt ämne, fördelaktigt 2...20 ml/g.

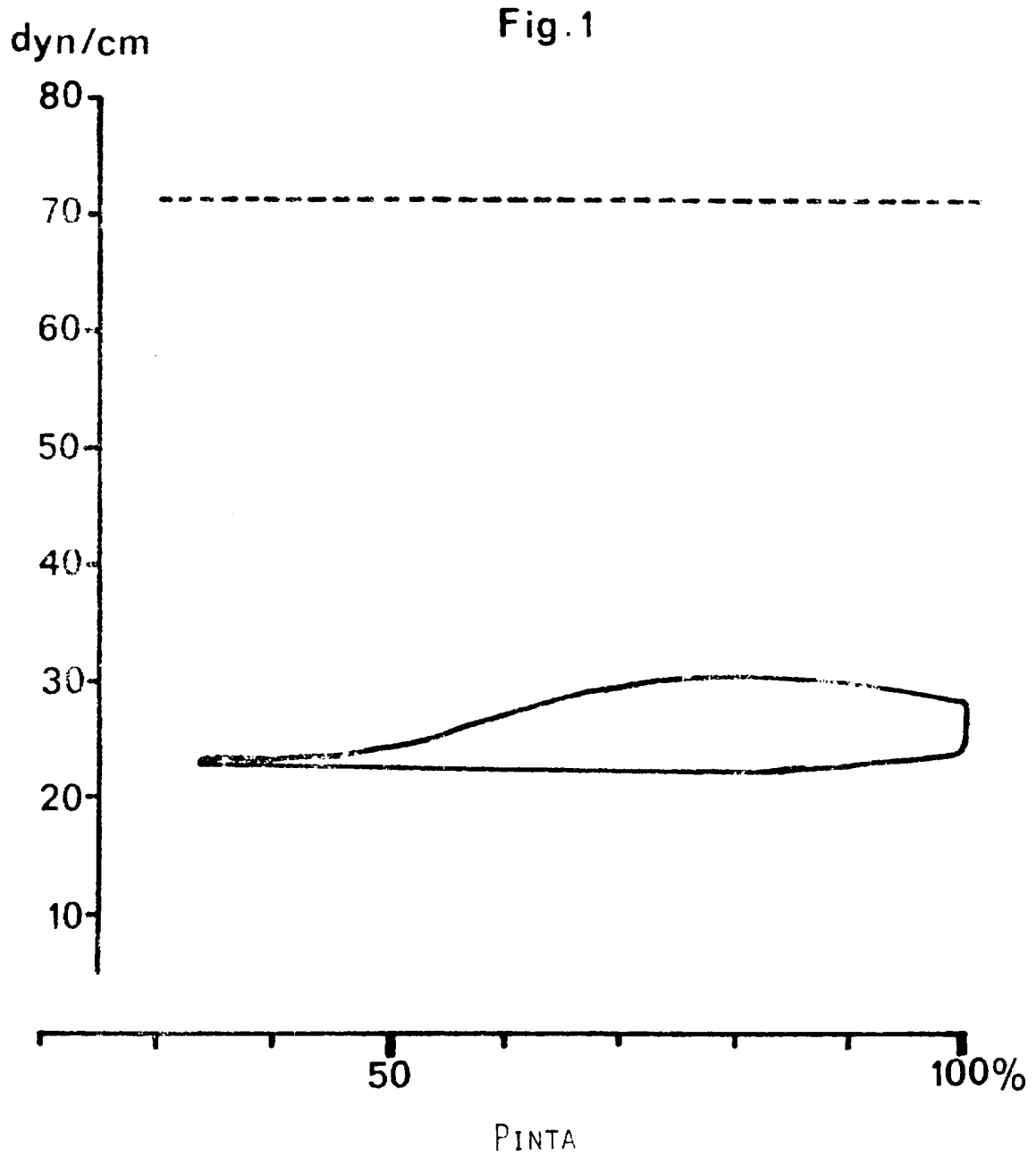
7. Förfarande enligt patentkravet 1 punkt a), k ä n n e t e c k n a t därav, att det renade verksamma ämnet eventuellt blandas med en fosfolipidfraktion i förhållandet 10:1...1:2, fördelaktigt 1:1, varvid fosfolipidfraktionen framställts genom att lösa 0,05...2 g av det enligt patentkravet 1 punkt a) erhållna verksamma ämnet i 1 ml av lipidlösningsmedel och därefter utfälla detsamma med aceton i förhållandet 1:0,5...1:10, fördelaktigt 1:3...1:5.

8 Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att utfällningen av fosfolipidfraktionen utförs vid  $-20^{\circ}\text{C} \dots +40^{\circ}\text{C}$ , fördelaktigt 2...10°C.

9. Förfarande enligt patentkravet 1, punkt b), k ä n n e t e c k n a t därav, att man som adsorbens använder aktiverad kiselsyragel eller magnesiumsilikat.

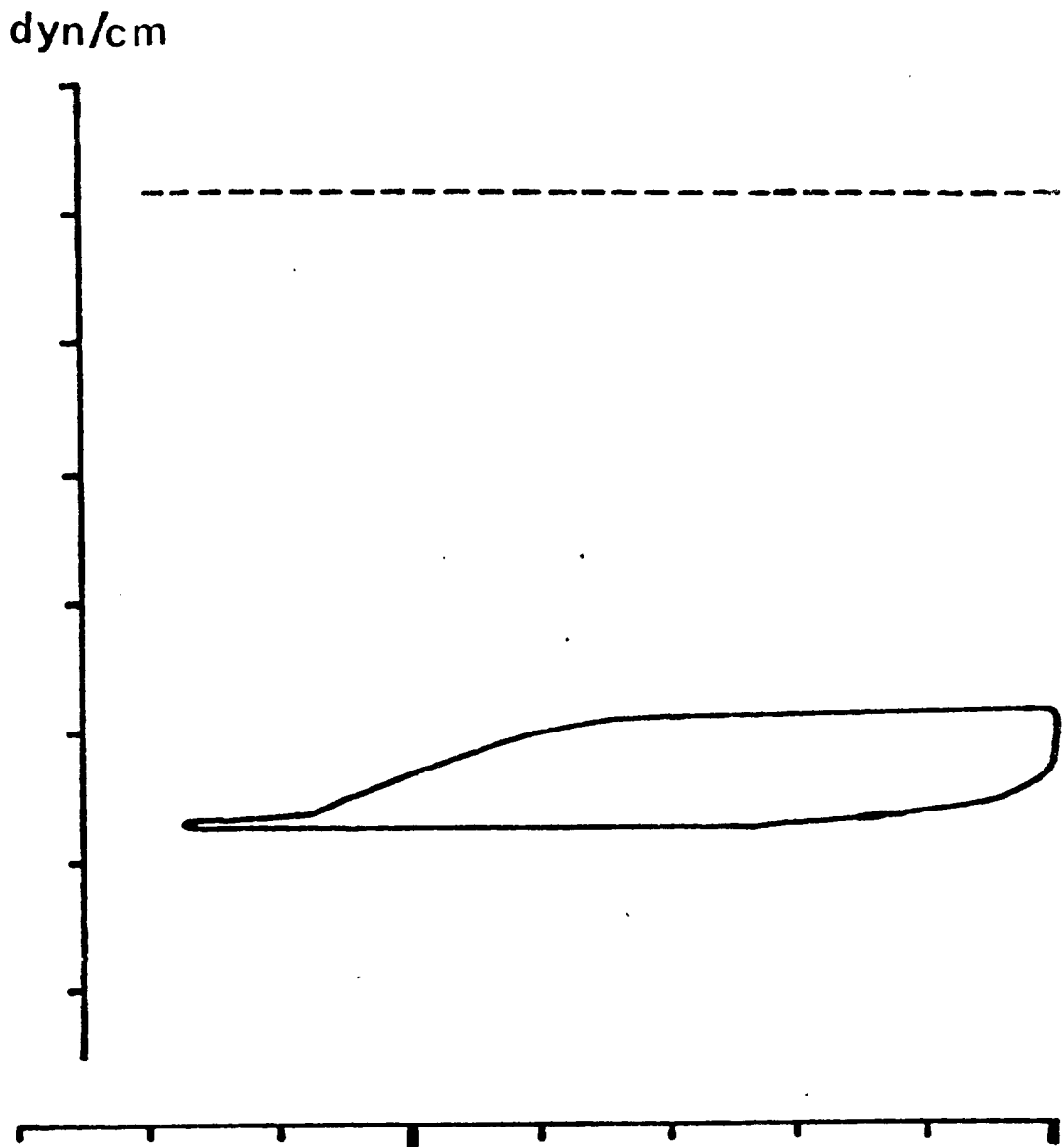
10. Förfarande enligt patentkravet 1 punkt b) eller 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att man för lösande av det verksamma ämnet ur adsorbensen använder en lösningsmedelsblandning av kloroform och metanol i förhållandet 2:1.

11. Förfarande för framställning av en läkemedelsform av ett farmaceutiskt medel som har en 40...70-procentig fosfolipidhalt, en < 1,5-procentig, fördelaktigt 0,5...1,0-procentig proteinhalt, en 10...40-procentig kolesterolhalt och en 5...30-procentig neutrallipidhalt, och som innehåller 1...500 mg, fördelaktigt 70...150 mg av verksamt ämne per ml fysiologisk bärarvätska, k ä n n e t e c k n a t därav, att den verksamma ämnesblandningen löses i etanol eller kloroform, eventuellt befrias från olösliga beståndsdelar, sterilfiltreras, intorkas i vakuum, emulgeras med destillerat vatten och lyofiliserar.



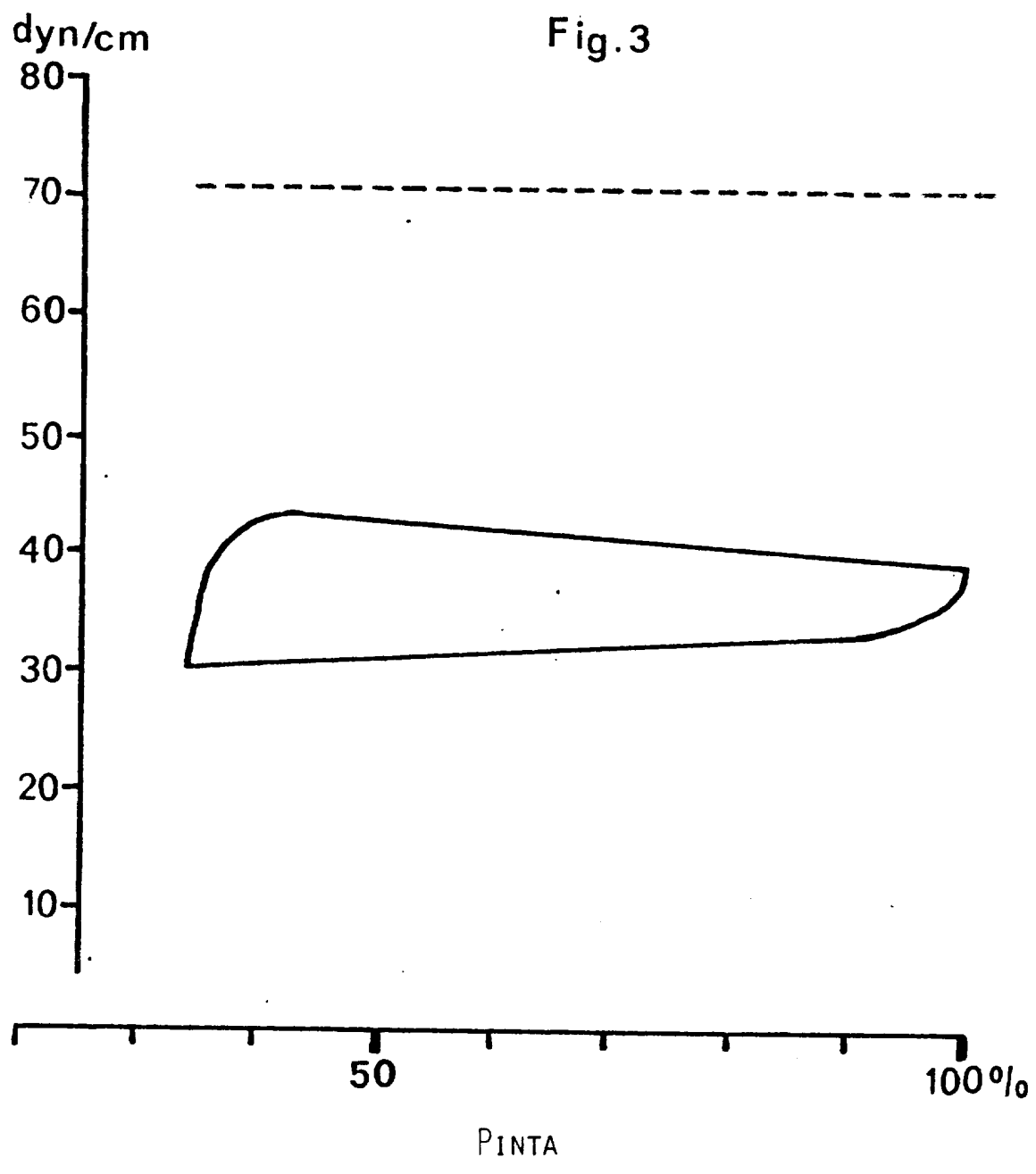
81261

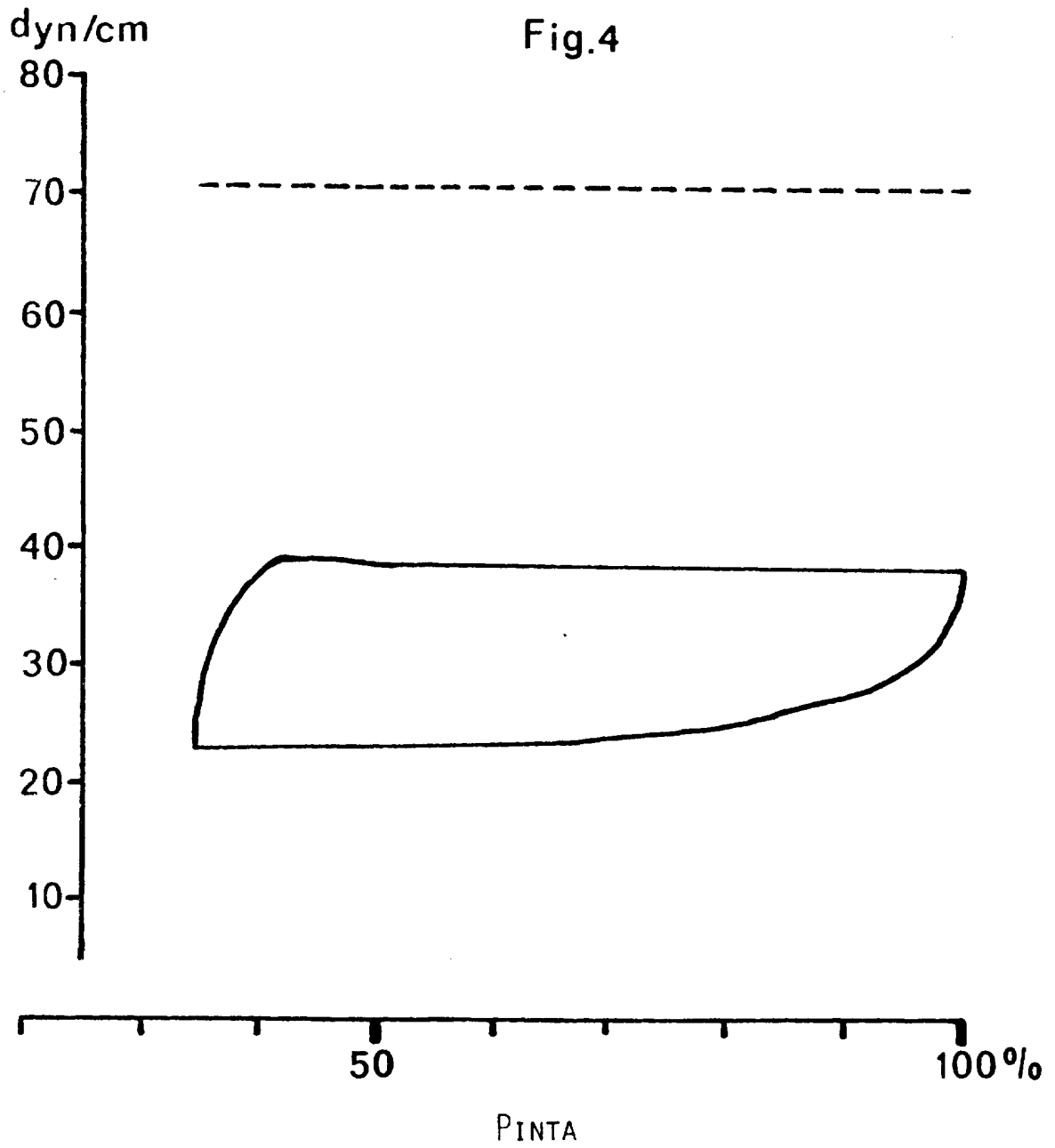
Fig.2



PINTA

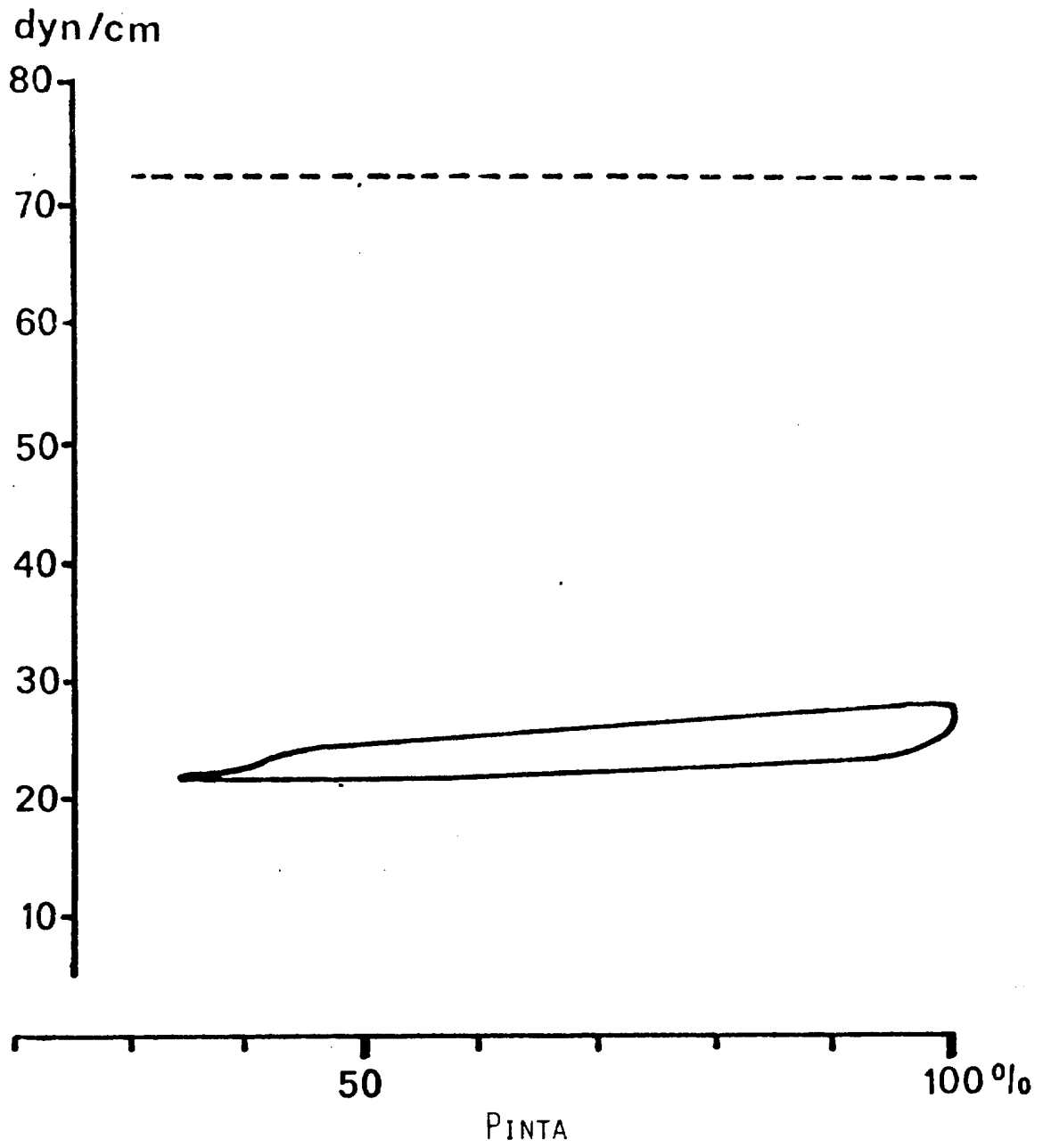
Fig.3



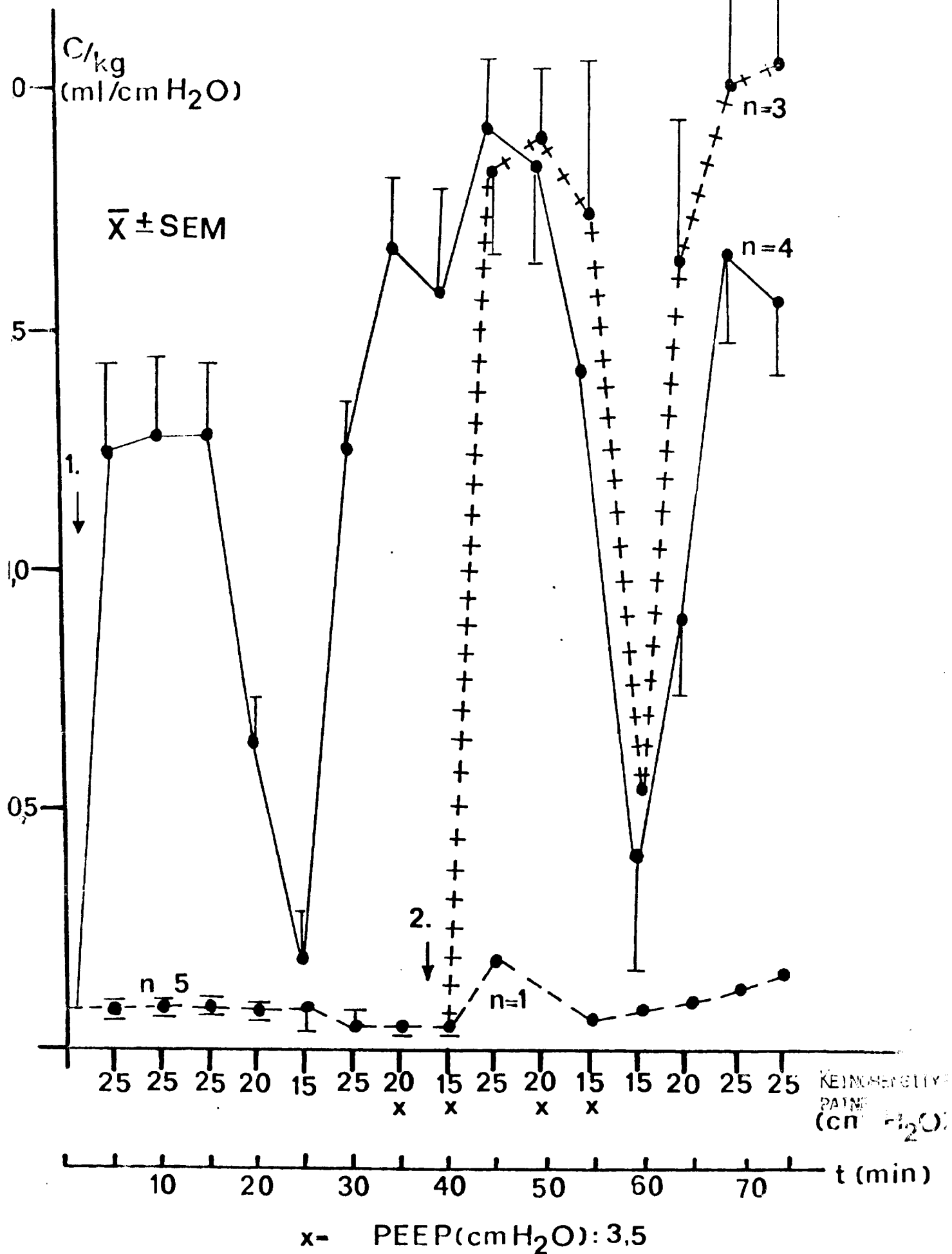


81261

Fig.5

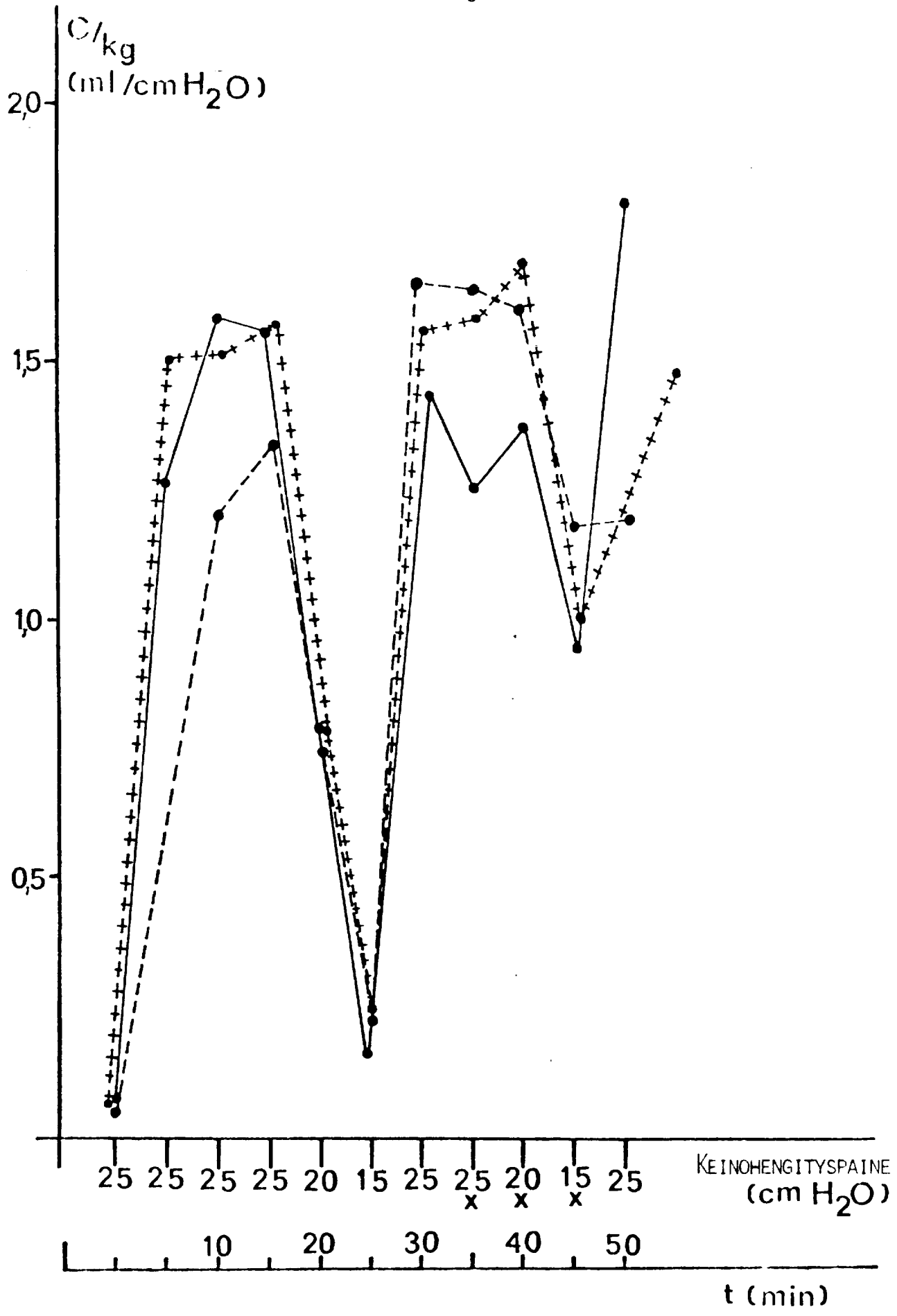


- 1. 0,06 ML SURFAKTANTTIA VALMISTETTUNA ESIMERKIN 23 MUKAISESTI
- 2. 0,07...0,10 ML SURFAKTANTTIA " " " "



— VALMISTETTU ESIMERKIN 6 MUKAISESTI  
 --- " " 7 "  
 +++ " " 8 "

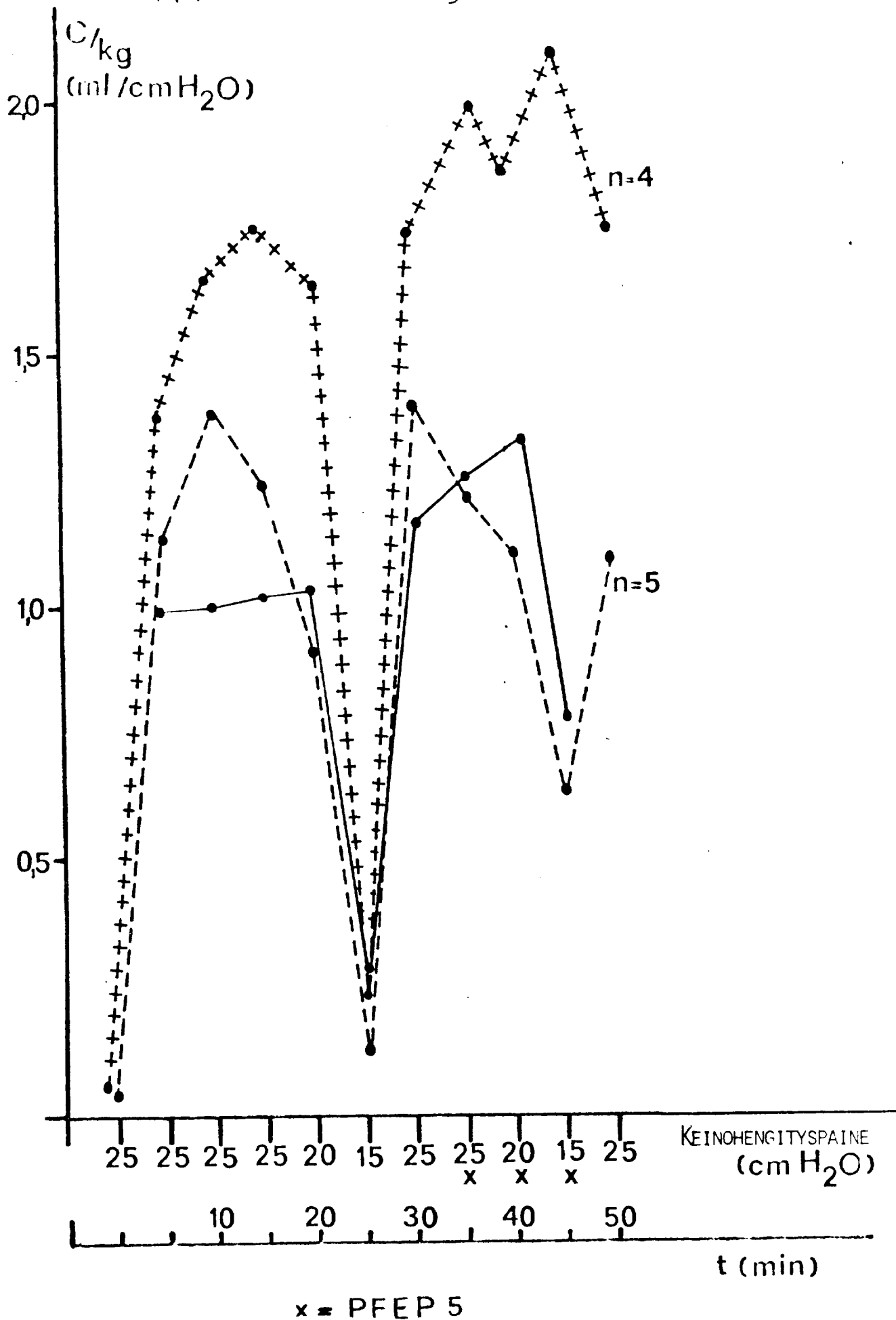
81261 FIG. 7



x = PEEP 5

FIG. 8

— VALMISTETTU ESIMERKIN 1 MUKAISESTI  
 --- " " 3 "  
 +++ " " 5 "



1. → 1,0 ML SURFAKTANTTIA, VALMISTETTU ESIMERKIN 22 MUKAISESTI

2. → 0,75 ML SURFAKTANTTIA " " " "

