

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 760609 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 760609

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)

A61K 37/06

C07G 7/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 10.03.1976

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 10.03.1976

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 11.09.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Plasmesco AG., Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Schneider, Waldemar, BRD, SAKSA, (DE)

2 •Wolter, Dietrich, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä gammaglobuliinien intravenöositoleranssin parantamiseksi

Förfarande för att förbättra gammaglobuliners intravenöstolerans

Ratiopharma Anstalt
Städtle 22
Vaduz
Liechtenstein

ei mukana

*Kts.
muut
vää.*

Menetelmä gammaglobuliinien intravenöositoleranssin parantamiseksi. -
Förfarande för att förbättra gammaglobuliners intravenöstolerans.

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä gammaglobuliinien intravenöositoleranssin parantamiseksi, jotka on saostettu verestä tai verituotteista.

Veri on nestettä, joka muodostuu kiinteistä ja nestemäisistä ainesosista. Kiinteisiin ainesosiin kuuluu punaiset ja valkeat verisolut sekä verihiutaleet. Plasma eli veren nestemäinen osa sisältää noin 90^o vettä ja 10^o kiinteitä aineita. Plasmaan liuenneiden aineiden joukossa on mm. gammaglobuliinia, jota käytetään tulehdusten käsitelyyn ja ehkäisyyn. Jotta gammaglobuliini voitaisiin eristää, täytyy siinä määrin kuin mahdollista kaikki muut plasmassa olevat aineet poistaa, jotta saataisiin niin puhdasta gammaglobuliinia kuin mahdollista.

Gammaglobuliinin saostamiseksi ja eristämiseksi verestä käytetään erityisesti ~~nimityksellä~~ COHN-metodi tunnettua menetelmää (COHN et al., J. Amer. Chem. Soc., Vol 68 ss. 459...475; Vol. 72, ss. 465..474). Tässä menetelmässä käytetään eri verinäytteistä sekoitettua plasmaa. Se käsittää periaatteessa fraktioidun saostamisen vaihtelevissa olosuhteissa. Ensimmäisessä vaiheessa erotetaan -3^oC:ssa ja pH-arvossa 7,2

8 % etanolilisäyksellä ensi kädessä ensimmäisenä sedimenttinä oleellisesti fibrinogeenia. Päällä oleva neste saostetaan toisessa vaiheessa noin 19 %:lla etanolia pH-arvossa 5,6. Tämän COHN-fraktio II-III:ksi merkityn saosteen puhdistamiseksi liuotetaan se uudelleen ja saostetaan sitten jälleen pH-arvossa 5 etanolilisäyksellä 8 %. Jäljelle jäänyt emävesi saostetaan sen vuoksi uudelleen 25 %:lla etanolia pH-arvoon 7,2. Tällöin muodostuva saoste käsittää vähintään 90 % gammaglobuliinia. Saoste pannaan sopivaan puskuriliuokseen ja on steriilisuodatuksen jälkeen valmis käytettäväksi ihmisiin.

On osoittautunut, että gammaglobuliinivalmisteella, joka on saatu edellä selostetulla tai muulla tavalla, on useissa tapauksissa ollut antikomplementtivaikutus niin, että suonensisäisesti annettuna on syntynyt komplikaatioita kehon omien reaktioiden johdosta. Sen vuoksi on aikaisemmin yritetty kohottaa gammaglobuliinien intravenöositoleranssia. Esimerkkeinä tästä viitataan seuraaviin kirjallisuudessa esitettyihin menetelmiin:

1. Käsittely sopivilla entsyymeillä.
2. Hydrolyysi korotetulla vetyionikonsentraatiolla (esim. pH-arvossa 4,0).
3. Modifioimalla betapropiolaktonilla.

On kuitenkin osoittautunut, että ennestään tunnetut menetelmät modifioivat gammaglobuliinimolekyylit ja muuttavat niiden kemiallista rakennetta sillä tavalla, että niiden vaikutus alentuu ja niiden keskimääräinen viipymisaika elimistössä lyhenee.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on tarjota uusi menetelmä gammaglobuliinien intravenöositoleranssin kohottamiseksi, jossa menetelmässä toisaalta ei ole ennen tunnettujen menetelmien epäkohtia ja joka toisaalta tarjoaa seuraavat parannukset:

- kyseisten gammaglobuliinimolekyylien rakenne muuttuu niin vähän kuin mahdollista;
- antikomplementtivaikutus tulee voimakkaasti alennetuksi verrattuna ennestään tunnettuihin gammaglobuliinivalmisteisiin;
- viipymisaika elimistössä on pitempi ja sen vuoksi valmiste on paremmin siedettävissä kuin ennestään tunnetut valmisteet.

Ves-
saostin
↓
Nämä tehtävät ratkaistaan menetelmällä intravenöositoleranssin kohot-
tamiseksi, jossa menetelmässä verestä tai verituotteista saostettu
gammaglobuliini uudelleen liuotetaan makromolekylääristen aineiden
läsnäollessa, jotka erottavat globulimolekyylit toisistaan ja tunke-
vat ne pois liuoksesta, kuten hydroksietyylitärkkelys (HES), gelatiini,
dekstraani, albumiini, polyalkoholit tai polyvinyyli, minkä jälkeen
liuos saostetaan ja saoste uudelleen pannaan mieluummin fysiologiseen
keittosuolaliuokseen.

Nykyisen käsityksen mukaan saavutetaan optimaalinen vaikutus HES:llä,
mutta on kuitenkin mahdollista saavuttaa samanlainen vaikutus lisää-
mällä muita mainittuja aineita.

Sopivimmin liuotetaan saoste uudelleen HES ja veden puskuriliuokseen,
jonka pH-arvo on 3,5 - 8,0. Käyttönäkökohdat huomioonottaen on pH-
arvo 6,5 - 6,9 osoittautunut erityisen edulliseksi.

HES-pitoisuus vesiliuoksessa voi olla 1 - 30 %, erityisen hyvä käyt-
töarvo on 8 - 10 % HES.

Sopivimmin työskennellään HES:llä, jonka molekyylipaino on 1000 ja
900.000 välillä.

Sitten, kun gammaglobuliinisaoste on liuennut HES-puskuriliuokseen,
lisätään seokseen 10 % polyetyleeniglykolia. Seos sisältää saostuneita
ja saostumattomia ainesosia. Viimeksi mainitut saostetaan polyetylee-
niglykolilla ja sentrifugoidaan sen jälkeen. Polyetyleeniglykolin
sijasta voidaan saostusaineena käyttää myös muita polymerisoituja,
moniarvoisia alkoholeja. Seos sentrifugoidaan. Jäljellä oleva päällä
oleva neste saatetaan pH-arvoon 7,0 - 7,2 lisäämällä 20 % polyetyleen-
iglykolia ja sentrifugoidaan uudelleen. Täten saatu saoste liuotetaan
sopivimmin fysiologiseen keittosuolaliuokseen ja sen valkuaisiainepito-
isuus säädetään noin 5 %:iin. Steriilin suodatuksen jälkeen on liuos
valmis terapeutista käyttöä varten.

Seuraavassa selostetaan eri menetelmävaihteita esimerkein.

Gammaglobuliinin erotus:

Lähdetään plasmamäärästä, johon lisätään 8 % etanolia ja saostetaan
pH-arvossa 7,2 lämpötilassa -3°C . Tällöin erottuu fraktio I. Nesteeseen

joka syntyy lisätään sen jälkeen 19 % etanolia lämpötilassa -5°C ja pH-arvossa 5,8. Tällöin erottuu fraktio II-III, joka muodostuu gammaglobuliineista. Saoste liuotetaan uudelleen ja saostetaan uudelleen 8 %:lla etanolia pH-arvoon 5. Jäljellä oleva emävesi saostetaan sen jälkeen uudelleen 25 %:lla etanolia pH-arvoon 7,2. Täten saatu saoste (=fraktio II) ~~muodostuu~~ ^{sisältää} vähintään 90 %:sta gammaglobuliinista.

Antikomplementtivaikutuksen pienentäminen:

Gammaglobuliinisaoste liuotetaan uudelleen vesipitoiseen puskuriliuokseen pH-arvoon 6,7 ja noin 6 % konsentraatioon, minkä jälkeen vesiliuokseen lisätään noin 10 % hydroksietyylitärkkelystä. Tämä lisäys aiheuttaa, että jo olemassa olevat kasautumat hajoavat ja se muodostaa samalla suojan kasautumattomille gammaglobuliineille.

Muuttaminen fysiologiseksi keittosuolaliuokseksi:

10 %:n polyetyleeniglykolin lisäyksen jälkeen sentrifugoidaan seos. Jäljellä oleva emävesi saatetaan pH-arvoon 7,2 lisäämällä 20 % polyetyleeniglykolia ja sentrifugoidaan. Saoste, joka syntyy, säädetään fysiologisessa keittosuolaliuoksessa 5,2 % valkuaisaineen konsentraatioon ja steriilisuodatetaan sen jälkeen. Tämän jälkeen se on valmista terapeuttisesti käytettäväksi.

Oheenliitettyssä piirustuksessa:

Kuvio 1 esittää hydroksietyylitärkkelyksen (HES) rakennekaavaa.

Kuvio 2 esittää immuuni-elektroforeesikäyrää (IEP) erilaisista gammaglobuliineista ja vast. normaaliseerumeista, jotka ovat valmistetut ennestään tunnetuilla menetelmillä ja vast. uudella menetelmällä. Käyrän yläosa esittää tällöin jokaisessa yksittäistapauksessa normaaliveriseerumin IEP-käyrää, kun taas alempi puolisko esittää seuraavien aineiden käyrää:

- a) standardi-gammaglobuliini,
- b) proteolyyttisesti modifioitu gammaglobuliini,
- c) betapropiolaktoni-modifioitu gammaglobuliini,
- d) gammaglobuliini, joka on valmistettu ~~uuden~~ ^{uuden} menetelmän mukaan.

tuotteen mukaisesti

Käyrien a) - c) mukaisissa näytteissä on jokaisessa erityistapauksessa kysymys kaupan olevasta modifioidusta valmisteesta. Nämä näytteet osoittavat paitsi gammaglobuliinilinjaa (pitkänomainen sirpin muotoinen viiva käyrän oikeanpuoleisessa osassa) myös muita *proteiin-* ihmisveren valkuaisaineosia. Gammaglobuliiniviivat ovat epätarkat näytteissä a) ja b) seurauksena kemiallisesta modifioinnista. Näyte c) esittää vertailuseerumin gammaglobuliiniviivan suhteen muuttunutta asemaa.

Huomataan selvästi, että näyte d) muodostuu käytännöllisesti katsoen puhtaasta gammaglobuliinista, koska sirpin muotoinen spektriviiva selvästi sisältyy normaaliseerumiin.

Käyristä voidaan lukea, että uuden menetelmän mukaan valmistettu gammaglobuliini on käytännöllisesti katsoen puhdasta aina 100 %:iin ja vastaa täysin alkuperäisen veriseerumin gammaglobuliinia. Viimeksi mainittu tarkoittaa, että molekyylit eivät ole modifioituja tai kemiallisesti muutettuja. Näistä ominaisuuksista käyvät selville myös näytteissä selvästi todistetut muut uuden menetelmän mukaisen gammaglobuliinin edut, nimittäin sen ehdottoman varma intravenöositoleranssi ja sen vahvasti *laentunut* antikomplementtivaikutus suhteessa kehon omiin suoja-aineisiin, mikä voitiin selvästi todistaa in-vitro-kokeissa.

toim. Erääksi eduksi on vielä osoittautunut, että varastoimiskokeissa on voitu osoittaa keksinnön mukaan valmistettujen gammaglobuliinien erityisen merkittävä stabiliteetti.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ~~gamma~~gammaglobuliinien intravenöositoleranssin parantamiseksi, ~~jotka on saostettu verestä tai verituotteista,~~ t u n n e t t u siitä että saostettu gammaglobuliini uudelleen liuotetaan makromolekyläristen ainesten läsnäollessa, jotka erottavat globulimolekyyliⁱⁿⁱ toisistaan ja tunkevat ne pois liuoksesta, kuten hydroksietyyliⁱⁿⁱtärkkelys (HES), gelatiini, dekstraani, albumiini, polyalkoholit tai polyviⁱⁿⁱnyylit.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesiliuos sisältää hydroksietyyliⁱⁿⁱtärkkelystä (HES), josta liuoksesta gammaglobuliini ensin saostetaan ja sen jälkeen uudelleen otetaan talteen, mieluummin fysiologiseen keittosuolaliuokseen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että gammaglobuliinisaoste lisätään veden ja HES:n puskuriliuokseen, jonka pH-arvo on 3,5 - 8,0.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että saoste lisätään HES-liuokseen, jonka pH-arvo on 6,5 - 6,9.

5. Patenttivaatimusten 2 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että HES-pitoisuus vesiliuoksessa on 1 - 30 %.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että HES-pitoisuus vesiliuoksessa on 8 - 10 %.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että HES:n molekyylipaino liuoksessa on välillä 1000 ja 900000.

P a t e n t k r a v

1. Förfarande för att höja intravenöstoleransen hos ur blod eller blodprodukter utfällda gammaglobuliner, k ä n n e t e c k n a t a v a t gammaglobulinfällningen återigen löses i en vattenlösning i vilken det förligger makromolekylära substanser som avskärmar globulinmolekylerna från varandra och förtränger dem ur lösningen, såsom hydroxyletylstärkelse, gelatin, dextran, albumin, polyalkoholer eller polyvinylter.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, kännetecknat därav, att vattenlösningen innehåller hydroxyletylstärkelse (HES), ur vilken lösning gammaglobulinet först utfälls och sedan återigen upptages, helst i en fysiologisk koksaltslösning.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, kännetecknat därav, att gammaglobulinfällningen överföres i en buffertlösning i vatten av HES med ett pH-värde av 3,5 - 8,0.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, kännetecknat därav, att fällningen överföres i en HES-lösning, som har ett pH-värde av 6,5 - 6,9.

5. Förfarande enligt patentkraven 2 - 4, kännetecknat därav, att HES-halten i vattenlösningen uppgår till 1 - 30%.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, kännetecknat därav, att HES-halten i vattenlösningen uppgår till 8 - 10%.

7. Förfarande enligt patentkravet 2, kännetecknat därav, att molekylvikten på HES i lösningen ligger mellan 1.000 och 900.000.

Patenttivaatimus

Patentin (patenttihakemuksen 770290) mukainen menetelmä gammaglobuliinien intravenöositoleranssin parantamiseksi, jotka on saostettu verestä tai verituotteista, jossa menetelmässä saostettu gammaglobuliini uudelleen liuotetaan, t u n - n e t t u sellaisesta yhdistelmästä, että gammaglobuliinisaoste lisätään veden ja hydroksietyyliitärkkelyksen (HES) puskuriliuokseen, jonka pH-arvo on 3,5 - 8,0, sopivimmin 6,5 - 6,9, että HES-pitoisuus vesiliuoksessa on 1 - 30 %, sopivimmin 8 - 10 %, että HES:n molekyylipaino liuoksessa on välillä 1000 - 900 000 ja että liuoksesta gammaglobuliini ensin saostetaan ja sen jälkeen uudelleen otetaan talteen, mieluummin fysiologiseen keittosuolaliuokseen.

Patentkrav

Förfarande enligt patent (patentansökan 770290) för höjning av intravenös toleransen hos ur blod eller blodprodukter utfällda gammaglobuliner, i vilket förfarande gammaglobulinfällning löses ånyo, k ä n n e t e c k n a d av en kombination, att gammaglobulinutfällningen överföres i en buffertlösning av vatten och hydroxyl-etylstärkelse (HES), vars pH-värde är 3,5 - 8,0, lämpligen 6,5 - 6,9, att HES-halten i vattenlösningen uppgår till 1 - 30 %, lämpligen 8 - 10 %, att molekylvikten på HES i lösningen ligger mellan 1000 - 900 000 och att ur lösningen gammaglobulinet först utfälles och sedan återigen upptages helst i en fysiologisk koksaltlösning.

Fig.1

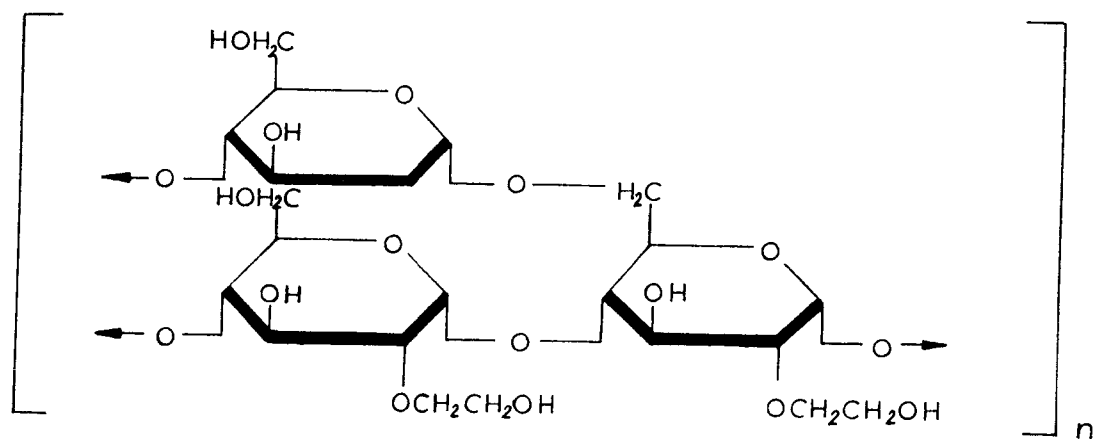
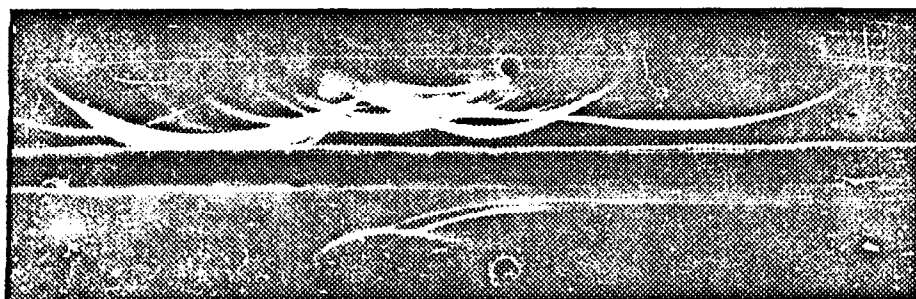


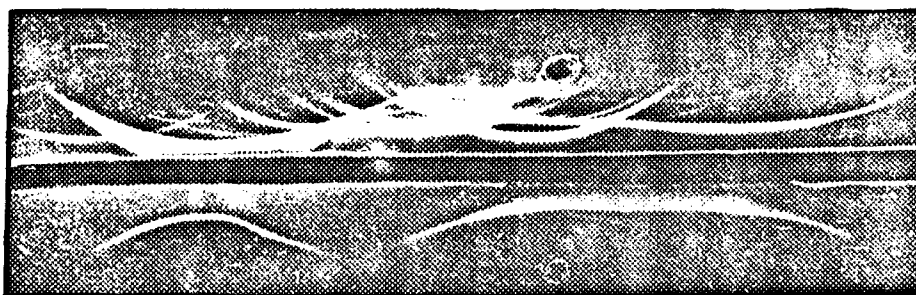
Fig.2



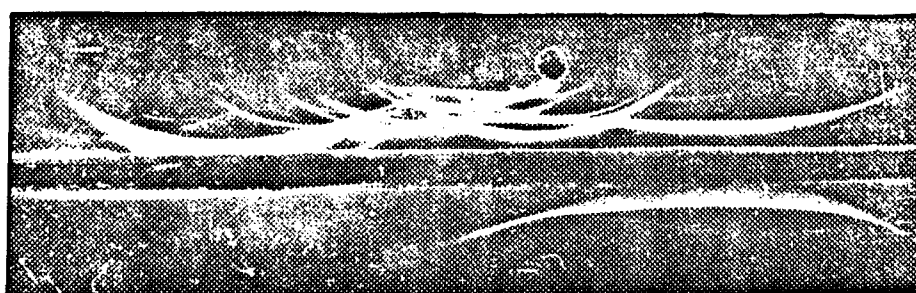
a)



b)



c)



d)