



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 77574

C (45) Patentti myönnetty
Patenttihallitus 12.12.1999

(51) Kv.Ik.⁴/Int.Cl.⁴ A 61 K 37/02, 37/14, C 07 K 15/22

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21)	Patentihakemus – Patentansökning	830678
(22)	Hakemispäivä – Ansökningsdag	01.03.83
(23)	Alkuperäisyys – Giltighetsdag	01.03.83
(41)	Tullut julkiseksi – Blivit offentlig	03.09.83
(44)	Nähtäväksipanon ja kuul julkaisun pvm. – Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.12.88
(86)	Kv. hakemus – Int. ansökan	
(32)(33)(31)	Pyydetty etuoikeus – Begärd prioritet	02.03.82
Italia-Italien(IT) 19908 A/82		
Toteennäytetty-Styrkt		

- (71) Italfarmaco S.p.A., Viale Fulvio Testi, 330, Milano, Italia-Italien(IT)
- (72) Giancarlo Sportoletti, Milano, Pier Giuseppe Pagella, Milano,
Pietro Cremonesi, Milano, Italia-Italien(IT)
- (74) Forssén & Salomaa Oy
- (54) Menetelmä sukkinyyli-ferroproteiini-johdannaisten valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av derivat av succinyl-ferroprotein

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena ovat sukkinyloidut proteiinit, joiden sukkinylointiaste on 20-100%, jotka sisältävät 0,1-20 paino-% rautaa, ja jotka on valmistettu käsittelemällä sukkinyloituja proteiineja rautasuoloilla sopivilla pH-alueilla. Kyseessä oleville yhdisteille, jotka ovat täysin siedettäviä, on ominaista raudan optimaalinen bio-soveltuvuus.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser succinylerade proteiner vilkas succinyle-ringsgrad är 20-100 %, som innehåller 0,1-20 vikts-% järn, och som är framställda genom att behandla succinylerade proteiner med järnsalter inom lämpliga pH-områden. Ifrågasvarande föreningar som är fullständigt tolerabla, kännetecknas av en optimal biolämplighet av järn.

- 1 Menetelmä sukkinyyli-ferroproteiini-johdannaisten valmistamiseksi

Förfarande för framställning av derivat av sukkinyli-ferroproteïn

5

Keksinnön kohteena on menetelmä lääkeaineina käytettävien, rautaa sisältävien sukkinyloitujen proteiinien valmistamiseksi.

- 10 Esillä oleva keksintö liittyy sukkinyloituihin proteiineihin, joiden sukkinylointiaste on 20-100%, jotka sisältävät 0,4-6,7 paino-% rautaa ja jotka valmistetaan käsittelemällä sukkinyloituja proteiineja rautasuoloilla sopivilla pH-arvoilla. Käytetyille yhdisteille, jotka ovat täysin siedettäviä, on tunnusomaista raudan optimaalinen bio-soveltuvuus.

15

Raudalla, joka on läsnä kaikissa ruumiin kudoksissa, on täysin välttämätön fysiologinen merkitys. Se on hemoglobiinin, myoglobiinin ja entsyymien: katalaasi, fumaari-dehydrogenaasi, peroksidaasi, sytokromit, DPN-sytokromireduktaasi, ja metalloflavoproteiinien, kuten ferroflaviinin

- 20 osana ja olennaisena komponenttina. Aikuisen henkilön kudokset sisältävät 1,5-5 g rautaa, josta 60-65% on konsentroitunut punaisiin verihiukkasiin, kun taas 18-30% on sidottu ferritiiniproteiineihin ja hemosideriiniin, joita on maksassa, pernassa, luuytimessä ja endoteliallisessa retikulaarissa järjestelmässä. Loput ovat jakautuneet erilaisiin yllä mainittuihin
- 25 entsyymijärjestelmiin, myoglobiiniin (n. 4%), ja tranferriiniin (n. 0,1%),
₁-glubuliiniin suolistoperäisen raudan verenkuljetukseen. Se pystyy sitomaan fysiologisissa pH-arvoissa kaksi rauta-atomia käytännöllisesti erottamattomalla tavalla.

- 30 Raudantarve tyydytetään osittain käyttämällä endogeenista rautaa (johtuen vanhojen punaisten verihiukkasten tuhoutumisesta) ja osittain absorboimalla eksogeenista rautaa. Eksogeenisen raudan adsorptio tapahtuu pohjukaissuolta ja tyhjäsuolen yläosaa pitkin ja se kerääntyy pääasiassa maksaan. Raudan puutteen ensimmäinen patologinen oire on hyperkrominen sideropee-
- 35 ninen anemia, jonka primääriset syyt voivat vaihdella: krooninen verenvuoto, joka tapahtuu maha-pohjukaissuoli-haavoissa tai neoplasiassa; puutteelliset ravintovaliot tai huono absorptio kuten on asianlaita ripulissa;

lisääntyneet tarpeet esim. raskaudessa, imetyksessä, infektio-taudeissa jne.; huono aineenvaihdunnan käyttö; erityiset hoidot, kuten ACTH:n ja kortisonien käyttö.

- 5 Sopivin terapia on raudan antaminen. Tämä vähentää tehokkaasti aneemista tilaa, kun tämä tila johtuu ajankohtaisesta raudan puutteesta. Kuitenkin siihen liittyy yleensä ei-toivottuja sivuvaikutuksia, joihin kytkeytyy rautaan käytetyn vektorin tyyppi. Laajimmin käytetyt farmaseuttiset per os-valmisteet perustuvat hyvin vaihteleviin orgaanisiin ja epäorgaanisiin
- 10 happosuoloihin, jotka on asteittain otettu terapiaan toivottaessa vähentää yllä mainittuja sivuvaikutuksia. Tästä syystä markkinoidaan per os-erikoisuuksia, jotka perustuvat seuraavan tyyppisiin epäorgaanisiin suoloihin: ferrikloridi, ferrosulfaatti, ferrifosfaatti tai jopa orgaanisiin suoloihin, kuten sitraatit, kolinaatit, aspartaatit, fumaraatit, glukonaatit,
- 15 glysinaatit, laktaatit, oksalaatit, sukkinaatit. Annettaessa intramuskulaarisesti ehdotetaan ferro-dekstraani-kompleksia, kun taas iv.-käsittelyssä (raudanpuutosanemiassa, jossa per os-käsittely ei ole onnistunut) käytetään ferri-dekstriini-kompleksia.
- 20 Viimeksi mainitun tyyppisissä komplekseissa sivuvaikutukset voivat esiintyä allergisten reaktioiden, lämmönnousun, takykardian, leukosytoosin, lymfadenopatian (intramuskulaarisessa käsittelyssä), ja jopa anafylaktisen shokin, tromboflebiitin ja verenkiertokollapsin (i.v.-käsittelyssä) muodossa. Per os-käsittelyssä, joissa käytetään yllämainittuihin yhdisteisiin perustuvia yhdisteitä, sivuvaikutukset ovat yleensä maha-suoli-
- 25 haavoja, jolloin esiintyy nekroosia ja limakalvojen puhkeamia vakavammis- sa tapauksissa, ja ripulia ja oksentamista. Lisäksi alhainen siedettävyy- tekke raudan sopivan määrien antamisen vaikeaksi. Sivuvaikutusten minimoimiseksi on ehdotettu, että ruoka tulisi ottaa samanaikaisesti, mutta tämä
- 30 on ristiriidassa raudan absorption todistetun vaihtelevuuden kanssa itse ruokien koostumuksen funktiona. Itse asiassa on varmistettu, että raudan absorptio valmisteista on optimaalinen, kun potilas on paastonnut. Lisäksi mahanärsytystä seuraa antasidien käyttö, mikä puolestaan vähentää absorp- tiota ja pahentaa aneemista tilaa.
- 35 Huomattavaa edistystä rautaterapiassa, etenkin annettaessa sitä per os, on saatu aikaan ottamalla markkinoille ferritiiniin perustuvia erikoisuuksia.

Ferritiini on ferriglobuliini ja se edustaa tärkeintä rautaa sisältävää proteiinia nisäkkäiden kehoissa. Kaupallinen tuote uutetaan käyttämällä hevosen pernaa raaka-aineena.

- 5 Sen rautapitoisuus on 20 paino-%. Sen proteiiniosan, apoferritiinin molekyylipaino on n. 445.000 ja se ympäröi kiteisen oksidifosfaattiraudan "ydintä". Tämä sopii annettavaksi per os, koska se on veteen liukeneva.

- 10 Ferritiinin perustava käsittely ei tuota maha-suoli-sivuvaikutuksia, joita esiintyy käytettäessä yllä mainittuja rautajohdannaissia. Sen käyttö on kuitenkin rajoitettu sekä raakamateriaalin hyvin kalliiden kustannusten johdosta että etenkin uuttamislähteiden rajoitetusta käytettävyydestä.

- 15 Tekniikan taso näyttää osoittavan, että optimaalinen kantoaine raudalle absorptiota varten ilman sivuvaikutuksia voi olla proteiinikantoaine. Useilla proteiineilla on määrätty affiniteetti raudan suhteen. Eläinalkuperää olevien proteiinin määrättyjä tyyppisiä (seerumiproteiineja, organoproteiineja, ovalbumiineja, laktoproteiineja) tai kasvialkuperää olevia (soijaproteiini) on tästä syystä testattu käytettäväksi kantoaineina.

20

Epäorgaanisten ferrisuolojen ja yllämainittujen proteiinien vuorovaikutus johtaa ferroproteiini-johdannaisten muodostumiseen, joiden terapeuttista hyötyä heikentävät kuitenkin muutamat negatiiviset ominaisuudet, nimittäin:

- 25 - saatujen johdannaisten liukenemattomuus, kun proteiinin sidotun raudan prosenttimäärät saavuttavat yli 0,5%:n arvot;
- vaikeus tai jopa mahdottomuus arvioida, mikä koko rautapitoisuuden fraktio tällaisissa liukenemattomuustiloissa todella sitoutuu proteiiniin ja mikä fraktio saostuu mukana hydrattujen oksidien muodossa, jotka voivat
30 aiheuttaa vaikeita mahahaavoja;
- homogenisuuden ja koostumusstabiliteetin puuttuminen näiden johdannaisten raudan suhteen.

- 35 Lisäksi muutamien proteiinien kohdalla, mukaanlukien maidosta johdetut, liukenevien rautajohdannaisten läsnäolo liukenemattomien johdannaisten huomattavan määrän kanssa on todettu eri pH-arvoissa, jolloin näiden liukenevien fraktioiden koostumus on erittäin vaihteleva hyvin pienien muu-

tosten funktiona kokeellisissa parametreissa.

Nyt on yllättäen varmistuttu, että suorittamalla yllä mainittujen protei-
iinien sukkinylointi sopivissa olosuhteissa (prosessi, jota normaalisti
5 käytetään proteiini-sukkinyyli-johdannaisten valmistamiseksi käytettäväk-
si ruoka-aineissa tai eläinten rehussa), on mahdollista saada saattamalla
nämä reagoimaan raudan kanssa ferroproteiinijohdannaista, joilla on kor-
kea rautapitoisuus ja jotka ovat stabiileja, liukenevia pH-arvoissa, jotka
ovat yli 5, joissa on erilaiset, mutta toistettavissa olevat rautapitoi-
10 suudet, ja jotka pystyvät toimittamaan rautaa nisäkkäille annettaessa nii-
tä oraalisesti aiheuttamatta mahahaavatyyppejä sivuvaikutuksia. Rotissa
päivittäinen oraali käyttö 20 peräkkäisenä päivänä ei saanut aikaan
yhtään mahahaavaa ja sillä oli korkea siedettävyyssaste.

- 15 Rottien yhteydessä vertailu sideremian olosuhteiden välillä, kun oli an-
nettu oraalisesti ekvivalenttisia määriä rautaa ferrosulfaatin, hevosen
pernan ferritiinin (Sigma, Saint Louis, Missouri) ja sukkinyloiduista
maitoproteiineista peräisin olevien ferroproteiinijohdannaisten muodossa,
jotka oli valmistettu esimerkissä 1 esitetyllä tavalla, osoitti, että
20 a) veren rautatasot, jotka oli valmistettu keksinnön mukaisilla johdan-
naisilla, niiden suhteen, jotka oli valmistettu ferrosulfaatilla, pitkit-
tyivät ajallisesti (ks. taulukko IX);
b) veren rautatasot, jotka oli tuotettu keksinnön mukaisilla johdannaisil-
la suhteessa vakiolla ferritiinillä tuotettuihin ovat korkeampia (n. 1,5:1
25 keskimäärin) kokeen kuuden tunnin jaksossa (ks. taulukko X).

Pitäen mielessä tuotteen korkea siedettävyyssaste, sen alhainen toksisuus
(suurempi kuin 4,000 mg/kg Swiss-hiirissä), korkeat rautatasot, jotka voi-
daan saavuttaa, ja raakamateriaalin hankinnan helppous, keksinnön mukais-
30 ten johdannaisten käyttö on selvä parannus rautakäsittelyn tekniikan ta-
sosta.

Näiden sukkinyyli-ferroproteiinien fysiko-kemialliset ominaisuudet, kuten
mainittiin, ovat toistokelpoisia ja vakaita, kuten on esitetty ei-rajoit-
35 tavissa esimerkeissä. Raudan poissaolo, joka ei ole sitoutunut, on esitet-
ty sukkinyloiduista proteiineista ja rautasuolasta valmistettujen valmis-
teiden täydellisellä liukenevuusasteella alkalisisessa väliaineessa (olosuh-

1 teissa, joissa rauta saostuu hydrattuna oksidina).

Esillä olevan keksinnön kohteena ovat siten johdannaiset, joita ei ole tähän mennessä tunnettu ja jotka on tunnettu siitä, että ne sisältävät raudan määriä, jotka voivat vaihdella prosentteina, ja eläin- tai kasviproteiinien määriä, jotka on sukkinyloitu eri asteisiin, ja että ne on suunniteltu tuottamaan bio-soveltuva rautaa nisäkkäille tuottamatta mahasuolistohaavoja annettaessa oraalisesti, kuten on esitetty seuraavilla esimerkeillä, jotka on annettu vain ei-rajoittavien viitteiden tavoin.

10 Näitä johdannaisia voidaan käyttää aktiivisena lähteenä valmistettaessa farmaseuttisia erikoisuuksia käytettäväksi raudan puutteesta johtuvan anemian hoidossa nisäkkäissä, mistä syystä tämä patentti koskee myös farmaseuttista antomuotoa, joka sisältää näitä johdannaisia aktiivisena lähteenä käytettäväksi ihmisessä tai eläimissä.

Keksinnön mukainen menetelmä näiden sukkinyloitujen proteiinien valmistamiseksi on tunnettu siitä, että sukkinyloidaan lähtöproteiini sukkiinihapon johdannaisen avulla, joka sitten saatetaan reagoimaan rautasuolojen kanssa vesipitoisessa väliaineessa pH-arvossa 7,5-8 ja että saatu tuote eristetään saostamalla pH-arvossa 2-4, jolloin viimeksi mainittu pH-alue tuotetaan spontaanisti tai tekemällä happameksi.

Vaihtoehtona reaktiotuote voidaan eristää poistamalla liuotin sen jälkeen, kun pH-arvo on säädetty lähellä neutraalia olevaan arvoon.

Esimerkki 1

5%:sten rautajohdannaisten valmistus kokomaitojauheen sukkinyloiduista proteiineista

1 kg maitojauhetta suspendoitiin 6 litraan 0.3M natriumbikarbonaattia ja sekoittamalla mekaanisesti ja valvomalla pH-arvoa lisättiin 500 g meripihkahappoanhydridiä peräkkäisinä annoksina, jolloin pH-arvo pidettiin arvossa 7,5-8 lisäämällä 4N NaOH:a. Lisäyksen jälkeen seosta sekoitettiin 2-3 tuntia ympäristön lämpötilassa. Tänä aikana suspensio liukeni täysin. Opaloiva liuos lingottiin tai suodatettiin, kunnes se oli lähes kirkas

ja tehtiin hitaasti happameksi HCl:lla pH-arvoon 3.

Muodostunut sakka erotettiin linkoamalla tai suodattamalla ja suspendoi-
tiin uudestaan veteen (n. 8 litraa). NaOH-liuosta lisättiin, kunnes se oli
5 täysin liuennut (pH n. 7,5). Suoritettiin linkoaminen ja kirkas liuos teh-
tiin uudelleen happameksi pH-arvoon 2-3 lisäämällä HCl:a.

Sakka otettiin talteen suodattamalla tai linkoamalla ja se pestiin HCl-
liuoksella, jonka pH-arvo oli 3. Jäännös, joka muodostui sukkinyloiduista
10 proteiineista (joiden sukkinylointiastetta voitiin vaihdella käytetyn
meripihkahappoanhydridin määrän funktiona; tässä kyseessä olevassa tapauk-
sessa se oli 90% suhteessa ryhmiin, jotka voitiin sukkinyloida lähtöpro-
teiinissa, kuten alla on esitetty), dispergoitiin tislattuun veteen tyh-
jössä suoritettun kuivatuksen jälkeen. Se liuotettiin lisäämällä NaOH:a
15 pH-arvoon 7,5, joka laimensi liuosta niin, että lopullinen proteiinin kon-
sentraatio oli n. 0,04 mg/ml. Rautasuolan (esimerkiksi $\text{FeCl}_3 \cdot n$) liuos,
jonka Fe^{3+} :n/sukkinylöidun proteiinin painosuhde oli 1:10, lisättiin tä-
hän liuokseen. Tämä sai aikaan suspension, joka dispergoitiin tarkoin se-
koittamalla mekaanisesti samalla, kun pH aleni arvoon n. 2,5. Sekoitusta
20 jatkettiin 3 tuntia ympäristön lämpötilassa ja sitten suspensio suodatet-
tiin. Kiintoaine suspendoitiin veteen (n. 3 tilavuutta) ja se liuotettiin
lisäämällä NaOH:a (pH 7,5).

Liuos, joka ei ollut täysin kirkas, suodatettiin ja kiinteässä tilassa
25 oleva tuote otettiin talteen käyttämällä jotakin seuraavista menetelmistä:
a) liuos tehtiin happameksi ja sakka, joka saatiin pH-arvossa 2,5, suoda-
tettiin pois ja kuivattiin tyhjössä;
b) kirkas liuos dialysoitiin vettä vastaan natriumkloridin eliminoimiseksi
ja sitten jäädytyskuivattiin tai kuivattiin suihku kuivurilla.

30

Valmiin tuotteen saannot olivat samat ja niiden määrä oli noin 20 paino-%
alkuperäisestä maitojauheesta. Tuotteen ominaisuudet on esitetty taulukos-
sa I (esimerkki 1b).

35 Esimerkki 2

5%:sten rautajohdannaisten valmistus sukkinyloiduista maitoproteiineista

Kuten esimerkissä 1 on esitetty, mutta muunnettuna siten, että lähtötuote muodostui 350 g:sta maitoproteiineja, jotka oli edellä saostettu maitojauheesta dispergoimalla jauhe veteen (noin 5 litraa), tekemällä happameksi pH-arvoon 2,5 mineraalilihapolla ja suodattamalla tai linkoamalla sitten
5 proteiinikiintoaine ja kuivattamalla.

Rautapitoisuus, kuten alla on esitetty (taulukko I), oli esimerkeissä 1 ja 2 saatujen johdannaisten kohdalla noin 4-5 paino-%.

10 Esimerkki 3

Rautajohdannaisten valmistus sukkinyloiduista, erilaiset rautapitoisuudet omaavista maitoproteiineista

15 Menetelmävaiheita, kuten esimerkeissä 1 ja 2 on esitetty, käytettiin samoilla maitojauheen tai edellä saostettujen maitoproteiinien määrillä samalla, kun Fe^{3+} :n/sukkinylöidun proteiinin painosuhdetta muunnettiin arvoihin 0,1:10, 0,2:10, 0,5:10 ja 1,5:10, jolloin saatiin rautajohdannaisia, joiden ominaisuudet on esitetty taulukossa I.

20

Esimerkki 4

Rautajohdannaisten valmistus sukkinyloiduista munaproteiineista (ovalbumiinista)

25

5 g ovalbumiinia liuotettiin 100 ml:an vettä, joka sisälsi 3 g KHCO_3 :a, ja lisättiin 2,5 g meripihkahappoanhydridiä peräkkäisinä annoksina kirkkaaseen liuokseen pitämällä pH-arvot arvossa 5...8 lisäämällä NaOH:a. Seoksen annettiin reagoida 2 tuntia ympäristön lämpötilassa. Liuos tehtiin happameksi pH-arvoon 3,4, minkä jälkeen saatiin sakka, joka eristettiin linkoamalla, puhdistettiin liuottamalla pH-arvossa 7,5 NaOH:lla ja sitten se saostettiin uudestaan pH-arvossa 3,4. Kiintoaine otettiin talteen linkoamalla ja kuivattiin tyhjössä. Kuiva kiintoaine suspendoitiin tislattuun veteen ja liuotettiin lisäämällä NaOH:a (pH 8), niin että saatiin lopullinen liuos, jossa oli 0,04 g proteiinia/ml.
30
35

Fe^{3+} :n suolan (esimerkiksi ferrikloridin) liuos lisättiin hyvin viskoosiin

liuokseen, niin että saatiin sukkinyloidun proteiinin/ Fe^{3+} :n painosuhteeksi 10:1. Näissä olosuhteissa pH-arvoa alennettiin arvoon 2,6, jolloin muodostui sakka, joka otettiin talteen suodattamalla. Tämä sakka liuotettiin uudelleen veteen ja NaOH:a lisättiin, kunnes se oli täysin liuennut (pH 7,5). Dialysoitiin vettä vastaan natriumkloridin poistamiseksi, minkä jälkeen kiinteä tuote otettiin talteen jäädytyskuivattamalla ja suihku-
 5 kuivurilla. Johdannaisen saanto oli 33 paino-% lähtöproteiinista. Sen rautapitoisuus ja ominaisuudet on esitetty taulukossa I.

10 Esimerkki 5

Rautajohdannaisten valmistus naudanseerumin sukkinyloiduista proteiineista

1,5 g NaHCO_3 :a lisättiin 50 ml:an liuosta, jossa oli naudanseerumiproteiineja, ja seos käsiteltiin 6 g:lla meripihkahappoanhydridiä, joka lisät-
 15 tiin peräkkäisinä annoksina samalla, kun pH-arvo pidettiin arvoissa 7,5...8 lisäämällä NaOH:a. Kun lisäys oli suoritettu, reaktio jätettiin 2 tunniksi ympäristön lämpötilaan ja sitten muodostettiin sakka tekemällä happameksi pH-arvoon 2,4 mineraalihapolla. Sakka otettiin talteen linkoam-
 20 malla ja se puhdistettiin esimerkissä 4 esitetyllä tavalla.

Kiinteä tuote suspendoitiin veteen ja saatettiin pH-arvoon 7,5 NaOH:lla. Tällä tavalla saatuun liuokseen lisättiin rauta(III)-suolan (esimerkiksi ferrikloridin) liuos, kunnes se saavutti sukkinyloidun proteiinin/ Fe^{3+} :n
 25 painosuhteen 10:1. pH-arvo putosi spontaanisti arvoon 2,4 ja saatiin sakka, joka, kun se oli saatettu pH-arvoon 7,5, liukeni vain osittain. Liuos erotettiin jäännöksestä linkoamalla, suoritettiin dialyysi vettä vastaan natriumkloridin eliminoimiseksi ja sitten suoritettiin jäädytyskuivatus. Rautajohdannaisen painosaanto suhteessa lähtöproteiiniin oli n. 30%. Rau-
 30 tapitoisuus ja ominaisuudet on esitetty taulukossa I.

Esimerkki 6

Rautajohdannaisten valmistus porsaanmaksan sukkinyloiduista proteiineista

35

400 g tuoretta porsaanmaksaa homogenoitiin Silverson homogenointilaitteessa 0,2M KHCO_3 -liuoksen (800 ml) läsnäollessa pH-arvossa 8,3. Lingottiin

9000 rpm:ssa 5°C:ssa, minkä jälkeen pinnalla oleva kerättiin ja suodatettiin 0,45 µ:n selluloosa-asetaattikalvon läpi. 1,2 g meripihkahapponanhydridiä lisättiin peräkkäisinä annoksina 50 ml:an kirkasta liuosta ja varmistettiin, että pH-arvo pysyi arvossa 7,5...8, lisäämällä NaOH:a.

5

Liuos jätettiin tunniksi ympäristön lämpötilaan ja sitten se tehtiin happameksi mineraalihapolla pH-arvoon 3, jolloin saatiin sakka, joka käsiteltiin samalla tavalla kuin esimerkissä 4, sillä muunnoksella, että lopullinen talteenotto suoritettiin jäädytyskuivaamalla liuos, joka oli dialysoitu vettä vastaan.

10

Jäädytyskuivattu jäännös suspendoitiin veteen ja saatettiin pH-arvoon 8 käyttämällä soodaa. Tämä tuotti liuoksen, joka ei ollut täysin kirkas ja joka lingottiin. Raudan (esimerkiksi ferrikloridin) liuos lisättiin kirkkaaseen pinnalla olevaan nesteeseen siten, että (arvioitu) sukkinyloidun proteiinin/ Fe^{3+} :n suhde oli suunnilleen 10:1.

15

Liuoksen pH-arvoa alennettiin arvoon 2,6, mikä tuotti sakan, joka puhdistettiin samalla tavalla kuin edellä olevissa esimerkeissä. Kiintoaine saatiin lopullisen liuoksen jäädytyskuivatuksesta, dialysoitiin vettä vastaan ja sen ominaisuudet ja rautapitoisuus on esitetty taulukossa I.

20

Esimerkki 7

25 Rautajohdannisten valmistus sukkinyloiduista soijaproteiineista

5 g soijaproteiineja suspendoitiin 100 ml:an vettä, joka sisälsi 3 g NaHCO_3 :a. Seosta sekoitettiin, kunnes se oli täysin liuennut, jolloin pH-arvo pidettiin arvossa 7,5...8 lisäämällä NaOH:a ja lisättiin 2,5 g meripihkahapponanhydridiä peräkkäisinä annoksina. Seosta sekoitettiin kaksi tuntia ympäristön lämpötilassa ja saatettiin pH-arvoon 3,4 lisäämällä mineraalihappoa, jolloin saatiin sakka, joka puhdistettiin samalla tavalla kuin edellisissä esimerkeissä. Lopullisen jäädytyskuivatuksen kiinteä jäännös suspendoitiin 100 ml:an vettä, pH-arvo korjattiin arvoon 8 lisäämällä soodaa ja sitten liuos, joka ei ollut täysin kirkas, lingottiin.

30

35

Kirkas pinnalla oleva aine käsiteltiin rautaliuoksella (esimerkiksi ferri-

kloridiliuoksella) siten, että sukkinyloidun proteiinin/ Fe^{3+} :n painosuhte oli 10:1. Liuoksen pH-arvo aleni spontaanisti arvoon 2,6 ja muodostui sakka, joka käsiteltiin samalla tavalla kuin edellisissä esimerkeissä. Kiintoaineella, joka saatiin lopullisesta jäädytyskuivatuksesta, oli taulukossa I esitetyt ominaisuudet ja rautapitoisuus. Painosaanto suhteessa lähtöproteiiniin oli 22%.

Kemiallis-fysikaalinen esimerkkien 1-7 mukaisesti sukkinyloiduista proteiineista valmistettujen rautajohdannaisten ominaisuuksien kuvaaminen

10

Yllä mainittujen esimerkkien mukaisesti saatuja johdannaisia analysoitiin noudattamalla alla olevia menetelmiä:

a) Sukkinylöntiaste

15

Tämä ominaisuus ilmaistaan sukkinyloitujen ryhmien prosenttimääränä suhteessa lähtöproteiinin sukkinylointiin pystyviin ryhmiin. Käytettiin menetelmää, joka on esitetty julkaisussa S. Moore & W.H. Stein, J. Biol. Chem., 211, 907, 1954, jossa käytettiin vapaiden amiiniryhmien reaktiota ninhydriinin kanssa. Tulokset on esitetty taulukossa I.

20

b) Rautapitoisuus

Rautapitoisuus määritettiin joko 2N HCl:lla suoritettun kuumauuton jälkeen tai rikkihapolla suoritettun täydellisen proteiinin hajottamisen jälkeen, kuten on esitetty julkaisussa Standard Methods, 14th Ed., 1975, s. 208, APHA-AWWA-WPCF (reaktio o-fenantroliinin kanssa). Arvot on esitetty taulukossa I.

30 c) Spektroskooppiset tiedot

1) EPR-spektroskopia

Kaikki yllä olevissa esimerkeissä esitetyt johdannaiset osoittivat samaa spektroskooppista käyttäytymistä. Esimerkin 1 mukaisesti valmistetun sukkinyli-ferroproteiinijohdannaisten EPR-spektri merkittiin esimerkkinä. Spektri tallennettiin jäädytyskuivatussa jauheessa ja sillä oli hyvin

35

laaja signaali, keskittynyt n. kohtaan $g = 2,0$, jolloin signaaliampplitudi oli noin 2000 G. Toinen hyvin analysoitu signaali oli läsnä ja se keskittyi myös kohtaan $g = 2,0$. Molempien signaalien muoto oli tunnusmerkki Fe^{3+} -paramagneettisten keskusten vuorovaikutuksesta (F. Reid et al., Inorg. Chem. 7, 119, 1968). Kaikki nämä arvot osoittivat proteiinirakenteiden läsnäolon liitännäaineen ympärille suljettuna.

2. Kiertodikroismi

Esitettyjen erilaisten johdannaisten käyttäytyminen oli myös samanlainen tässä tapauksessa. Esimerkin 1 mukaisesti saatujen sukkinyyli-ferroproteini-johdannaisten kiertodikroismi (circular dichroism) on esitetty esimerkkinä. Spektrille oli luonteenomaista negatiivinen aktiviteetti UV-alueella. Tämä osoitti intensiivisen negatiivisen kaistan, jonka piikki oli n. 200 nm:ssä ja reuna, joka oli myös negatiivinen, keskittyi n. 225 nm:ään. Nämä spektriominaisuudet osoittivat "satunnaisen" proteiinirakenteen vallitsevuutta (mm.: F. Ciardelli & P. Salvadori - Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism - Heyden & Son Ltd., London, 1973 - luku 4,5).

3. UV - näkyvä absorptiospektri

Käyttäytyminen suhteessa esitettyjen eri johdannaisten elektronispektriin oli samanlainen. Kuvio 1 esittää UV - näkyvän spektrin esimerkin 1 mukaisesti valmistetun sukkinyyli-ferroproteiini-johdannaisen suhteen.

Spektri (yhtäjaksoinen viiva) ei osoita absorptiopiikkejä, vain vain hyvin heikon reunan noin 450 nm:ssä. UV:ssä oli melko määritelty reuna, joka keskittyi noin 270 nm:ään, ja hyvin intensiivinen absorptio, jonka piikki oli alle 220 nm.

Kuvio 1 esittää myös (katkoviivoin) hevosen pernasta peräisin olevan ferritiinin spektrin vertailuna (Boehringer-Mannheim).

Näkyvällä alueella olevat absorptiospektrit on esitetty kuviossa 1 ja ne suoritettiin vedessä, pH 7. Hevosen pernan ferritiinin spektri samoissa olosuhteissa on myös esitetty vertailuna (Boehringer-Mannheim).

4. Fluoriloistesäteilyspektri

Fluoriloistesäteilyspektrit on esitetty kuviossa 2, jossa yhtäjaksoinen viiva vastaa keksinnön mukaisia sukkinyyli-ferroproteiinijohdannaisia, 5 piste-/katkoviiva laktoproteiineja sellaisenaan ja katkoviiva sukkinyloit-
tuja laktoproteiineja.

Voidaan nähdä proteiinin fluorisenssin sammuminen metallin läsnäolon joh-
dosta.

10

d) Elektroforeesi

Elektroforeettiset jäljet selluloosa-asetaatin päällä erilaisista johdan-
naisista verrattuna sukkinyloituihin proteiineihin, alkuperäisiin prote-
15 iineihin ja ferritiiniin on esitetty kuvioissa 3-6.

Kuvio 3 esittää elektroforeesin tuloksia, jotka on suoritettu soi-
japroteiineilla (jälki 1), sukkinyloiduilla soijaproteiineilla (jälki 2), suk-
kinyloitujen soijaproteiinien rautajohdannaisella (jälki 3), ei-sukkiny-
20 loitujen soijaproteiinien rautajohdannaisilla, liukeneva fraktio (jälki
4). Kuvio 4 esittää elektroforeesin tuloksien, jotka on suoritettu oval-
bumiinilla (jälki 1), sukkinyloidulla ovalbumiinilla (jälki 2), sukkiny-
loidun ovalbumiinin rautajohdannaisella (jälki 3), ovalbumiinin rautajoh-
dannaisella (jälki 4).

25

Kuvio 5 esittää elektroforeesin tuloksia, joka on suoritettu laktoprote-
iineilla (jälki 1), sukkinyloiduilla laktoproteiineilla (jälki 2), sukki-
nyloitujen laktoproteiinien rautajohdannaisella (jälki 3), hevosen pernan
ferritiinillä (jälki 4). Kuvio 6 esittää elektroforeesin tulokset (densi-
30 tometrinen lukema 550 nm:ssä), jotka suoritettiin sukkinyloitujen lakto-
proteiinien rautajohdannaisella (yhtäjaksoinen viiva), sukkinyloitujen
soijaproteiinien rautajohdannaisella (piste-katkoviiva), ja sukkinyloidun
ovalbumiinin rautajohdannaisella (katkoviiva).

35 e) Geelisuodatus

Sukkinyloitujen maitoproteiinien rautajohdannaisen (valmistettu esimer-

kissä 1 esitetyllä tavalla) geelisuodatusprofiili aineella Sephadex G 75 (Pharmacia, Uppsala) verrattuna itse sukkinyloituihin proteiineihin on esitetty kuviossa 7, missä yhtäjaksoinen viiva viittaa sukkinyloituihin laktoproteiineihin, katkoviiva vastaavaan rautajohdannaiseen. Ordinaatta osoittaa adsorptiota 280 nm:ssä, ja abskissa kerättyjen fraktioiden progressiivista numeroa. Profiilista nähdään, että raudan läsnäolo saa aikaan erillisen lähtöpiikin samanlaisella retentioajalla kuin kolonnin tyhjällä kohdalla. Pitäen mielessä, että aineen Sephadex G 75 molekyyliekskluusio on noin 75,000 daltonia, aggregaatin selvä minimimolekyylipainoarvo on suurempi kuin tämä arvo. Lisäksi eri tavoin havaittiin suuremman hajautuksen omaava kaksoispiikki, sukkinyloituilla proteiineilla. Tämä tekijä havaittiin myös elektroforeesissa (kuvio 5). Tämän tyyppinen käyttäytyminen osoittaa, että läsnäoleva rauta on proteiiniväliaineen molekyyliden välisen yhteenliittymän keskus. Muut arvot uutettiin suodatusgeelistä aineella Sephadex G 200 verrattuna ferritiiniin (kuvio 8, missä abskissa ja ordinaatta ovat samanlaiset kuin kuviossa 7, kun taas yhtäjaksoinen viiva vastaa sukkinyloitujen laktoproteiinien rautajohdannaisista ja katkoviiva koskee hevosen pernasta saatua ferritiiniä). Tässä tapauksessa piikki oli myös aivan selvä, kun taas retentioaika oli suurempi kuin ferritiinin. Tämä näyttäisi osoittavan, että näennäinen molekyylipaino on alhaisempi kuin hevosen pernasta saadun ferritiinin.

f) Stabiliteetti mahanesteessä

Tämä testi suoritettiin esimerkistä 1 saadulla rautajohdannaisella ja se suoritettiin liuottamalla 25 mg johdannaisesta 0,5 ml:an tislattua vettä ja lisäämällä tämä liuos 5 ml:an rotan mahanestettä. Saatiin sakka ja suspensiota inkuboituihin 37°C:ssa 60 min. sekoittaen. Tämän jakson jälkeen sakka erotettiin linkoamalla ja pinnalla oleva analysoitiin sen rautapitoisuuden suhteen. Mahanesteen luovuttaman raudan määrä oli 1% alkuperäisestä.

g) Rautajohdannaisen saostaminen ammoniumsulfaatilla

30% (w/v) ammoniumsulfaattia lisättiin rautajohdannaisen 10%:seen liuokseen (w/v), joka oli valmistettu esimerkin 1 mukaisesti. Saatiin raudan proteiinijohdannaisen sakka ja sen ominaisuudet olivat identtiset sen

lähtöominaisuuksien kanssa ja se oli vielä veteen liukeneva. Rautaa ei ollut läsnä liuoksessa.

- Yllä esitetyt tiedot osoittavat, että sukkinyloitujen proteiinien kompleksinmuodostuskyky raudan suhteen ei ole ainoastaan tyypillistä sukkinyloituille maitoproteiineille, vaan se on ominaista eri alkuperää olevien ja erilaisia fysiologisia toimintoja, joko eläinperäisiä tai kasvipäisiä, omaaville sukkinyloituille proteiinijohdannaisille.
- 10 Kuten yllä on mainittu tyypiltään muuntamattomat useat eläin- tai kasvi-proteiinit ovat sopivia liitettäväksi raudan kanssa. Kun muuntamattomat maitoproteiinit, ovalbumiini, soijaproteiinit, seerumiproteiinit, elimistä uutetut proteiinit (maksa) saatetaan reagoimaan raudan kanssa esitetyissä olosuhteissa vastaavien sukkinyyliproteiinijohdannaisten valmistamiseksi, saadaan tuote, jolla on samanlainen rautapitoisuus, mutta jolla on täysin erilaiset liukenevuus- ja stabiliteettiominaisuudet, Esimerkiksi, kuten taulukossa I on esitetty, soijaproteiini saa aikaan lopputuotteen, joka jäädytyskuivatettaessa on liukenematon 75%:n yli ja luovuttaa rautansa käsiteltäessä mahanesteellä. Kompleksinmuodostuskäyttäytymisen
- 15 lisäksi raudan suhteen keksinnön sukkinyloitujen ferroproteiinijohdannaisten käyttäytyminen (so. liukenevuus alkalisessa väliaineessa, stabiliteetti happamassa väliaineessa ja läsnäolossa mahanesteissä jopa korkeissa rautapitoisuuksissa) ei johdu perusproteiineista ja tästä syystä sitä ei voitu ennakoida.

25

TOKSISUUS

- a) Akuutti toksisuus testattiin oraalisesti Swiss-hiirissä mahakokeella maitoproteiinien ferrosukkinyyliproteiinin suhteen, joka oli valmistettu
- 30 esimerkin 1 mukaisesti, käyttämällä tislattua vettä kantoaineena. LD₅₀ oli yli 4,000 mg/kg.
- b) Rottien toksisuus annettaessa toistuvasti samaa esimerkin 1 mukaista johdannaista (nimitetään seuraavassa nimellä Ferrolat) per os tallennettiin 20 päivän ajan käsiteltäessä peräkkäin koiraspuolisia Wistar-rottia,
- 35 joiden alkupaino oli 200 g, jotka oli pantu häkkiin 14 päivää ennen käsittelyä ja sitten erotettu satunnaisesti 10 rotan ryhmään (ryhmä I:

kontrollit; II, III ja IV Ferrolat 30-100-300 mg:ssa/kg/die.

Valmistetta, joka oli liuotettu käytön aikana tislattuun veteen, annettiin päivittäin ilman välejä samaan aikaan joka päivä kokeella. Kontrollit saivat samanlaisen määrän vesijohtovettä (10 ml/kg). Käsittelyn aikana rotat punnittiin päivittäin ennen annoksen antamista ja niitä tarkkailtiin useita tunteja tuotteen antamisen jälkeen. Ruoankulutus mitattiin käsittelyn lopussa ja 24 tuntia lopullisen tuotteen antamisen jälkeen ja 20 tunnin paaston jälkeen rotat nukutettiin eetterillä ja ne tapettiin leikkaamalla kaulavaltimo. Osa verestä kerättiin testiputkeen, joka sisälsi EDTA:a (2 pisaraa 4%:sesta liuoksesta), ja jäljelle jäävä jätettiin seerumiksi. Hemokromosytometriset testit suoritettiin koko verellä ja hematokemialliset testit suoritettiin seerumilla.

15 TULOKSET

Painon ja ruoankulutuksen vaihtelut

Kuvio 9 esittää painonkasvun käyriä, jotka saatiin käsittelyn aikana tappamista edeltävään päivään asti.

Taulukot II ja III osoittavat arvoja, jotka koskevat painon kasvua ja eläinten ruoankulutusta käsittelyn aikana.

Rottien ryhmän painonkasvukäyrä, joka oli käsitelty Ferrolatilla 300 mg:n/kg annostuksessa, esitetään olevan huomattavasti hitaampi suhteessa rottien kontrolliryhmän painonkasvukäyrään 15. päivästä alkaen käsittelyn aloituksen jälkeen; rottien sama ryhmä kulutti vähemmän ruokaa keskimäärin (-11,7%).

Pieniä eroja, jotka eivät ole merkittäviä statistiselta kannalta, voidaan havaita rottien jäljellä olevien ryhmien suhteen, joita käsiteltiin Ferrolatilla.

35 Hematologiset testit

Tulokset on esitetty taulukossa IV.

Hematokemiaalliset testit

Tulokset on esitetty taulukossa V. Pientä alentumista alkalisessa fosfa-
taasissa havaittiin rotissa, joita käsiteltiin Ferrolatilla, 300 mg/kg/
5 "die".

Virtsatestit

Tulokset on esitetty taulukossa VI.
10

Elintestit

Taulukko VII osoittaa rotan pääelinten absoluuttisia keskimääräisiä pai-
noja ja taulukko VIII vastaavia keskimääräisiä painoja suhteessa ruumiin
15 painoon.

Merkittävä kasvu pernan ja keuhkojen suhteellisessa painossa todettiin
rottien ryhmässä, jota käsiteltiin Ferrolatilla 100 mg/kg/kuolema. Ruu-
miinpainon merkittävän alentumisen lisäksi todettiin kiven keskimmäi-
20 sen painon kasvu rottien ryhmässä, jota käsiteltiin Ferrolatilla 300 mg/
kg/"die".

VERITASOT TUOTTEEN ORAALISEN ANTAMISEN JÄLKEEN25 a) Ferrolat-ferrosulfaatti-vertailu

Käytettiin koiraspuolisia Wistar-rottia, jotka painoivat noin 200 g ja
joita pidettiin nälässä 18 tuntia, hajotettiin ja erotettiin ne 5 rotan
ryhmiin; jokainen ryhmä tapettiin määrättynä tuntina ja veri otettiin jo-
30 kaisesta eläimestä leikkaamalla kaulavaltimo; ryhmän jokaisen eläimen
veressä olevan raudan määrä määritettiin spektrofotometrisesti batofe-
nantrolisulfonihapon avulla (Fe-testi, Wako). Tuotteen anto suoritettiin
vesipitoisessa liuoksessa olevalla näytteellä (5 ml/kg). Sukkinyyli-
ferroproteiinijohdannainen, jota käytettiin, oli valmistettu esimerkissä
35 l esitetyllä tavalla (Ferrolat). Annokset ja tulokset on esitetty taulu-
kossa IX. Voidaan nähdä, että raudan määrä/kg oli sama molempien johdan-
naisten kohdalla (Fe: 1 mg/kg).

b) Ferrolat-ferritiini-vertailu

Käytettiin koiraspuolisia Wistar-rottia, jotka painoivat noin 200 g ja joita pidettiin nälässä 18 tuntia, hajotettiin ja erotettiin ne 9 rotan
5 ryhmiin; jokainen ryhmä tapettiin määrättynä tuntina ja veri otettiin jokaisesta eläimestä leikkaamalla kaulavaltimo. Ryhmän jokaisen eläimen veressä olevan raudan määrä määritettiin spektrofotometrisesti Iron Colorimetric Method-menetelmällä (Boehringer-Mannheim). Tuotteen antaminen suoritettiin vesipitoisessa liuoksessa olevalla näytteellä (5 ml/kg). Annokset ja tulokset on esitetty taulukossa X. Voidaan nähdä, että raudan
10 määrä/kg sukkinyyli-ferroproteiinijohdannaisten kohdalla (Ferrolat) oli sama kuin ferritiinin (Sigma, St. Louis Missouri) ja määrältään 1 mg/kg.

c) Vertailu erityyppisistä proteiineista saatujen sukkinyyli-ferroproteiinijohdannaisten välillä

Käytettiin koiraspuolisia Wistar-rottia, jotka painoivat n. 200 g ja joita pidettiin nälässä 18 tuntia, hajotettiin ja erotettiin ne 5 rotan ryhmiin (yksi johdannaisten annosta kohden ja yksi kontrolliryhmä). Jokainen ryhmä
20 tapettiin kaksi tuntia tuotteen antamisen jälkeen leikkaamalla kaulavaltimo, otettiin veri jokaisesta eläimestä ja määritettiin veren rautapitoisuus batofenantrolisulfonihapolla (Fe-testi, Wako). Tuotteen oraalinen anto suoritettiin vesipitoisessa liuoksessa olevalla näytteellä (5 ml/kg). Yksittäisten johdannaisten annokset, joita käytettiin, valittiin siten,
25 että annettiin aina 1 mg/kg Fe:tä.

Testatut tuotteet: 1) sukkinyloidut soijaproteiinit + Fe (4. 42%)
2) sukkinyloitu ovalbumiini + Fe (3. 57%)
3) sukkinyloidut naudanseerumiproteiinit + Fe (5. 78%)
30 4) sukkinyloidut maitoproteiinit + Fe (4. 5%)
(Ferrolat)

Tulokset on esitetty taulukossa XI.

TAULUKKO I

Proteiini- lähde	Sukkinylöinti (% ryhmistä, jot- ka voidaan sukki- nylöida)	Fe (% g)	Saanto (% sukkinylöi- duista proteiineista)	Liukenevuus pH:ssa 5 ^{f)}
a)	95	6.7	30	+ -
Maito b)	"	4.6	20	+
" c)	"	3.2	18	+
" d)	"	2.5	18	+
" e)	"	0.8	13	+
Laktoproteiinit	95	4.5		+
Ovalbumiini	95	3.6	33	+
Seerumiproteiinit	82	5.8		+
(nauta)		5.5	30	+ -
(Soija)	92	4.4	22	+
(Elin)	n.a.	8.4	n.a.	+ -
(Maksa)				
Maito	35	4.3	26	+
Laktoproteiinit	0	4.8		-
Ovalbumiini	0	7.7		-
		0.4		+
Soija	0	4.5		-
		0.4		+ -
Seerumiproteiinit	0	0.5		+ -
(nauta)				
(Elin)	0	n.a.	n.a.	-
(Maksa)				

a), b), c), d), e) näytteet, joiden Fe³⁺:n: sukkinylöityjen proteiinien suhde 0,1:1-5:1 (w/v).

f) täydellinen (+); osittainen (+ -); liukenematon (-)

TAULUKKO II

PAINON KASVU

Käsittely mg/kg/die	Keskimääräinen alkupaino	Lopullinen keskimääräinen paino	Painon kasvu keskimäärin
Kontrollit	224.10 $\pm$ 2.83	343.60 $\pm$ 8.87	119.50 $\pm$ 7.66
Ferrolat 30	224.40 $\pm$ 3.03	325.50 $\pm$ 4.56	101.20 $\pm$ 4.35
Ferrolat 100	224.40 $\pm$ 2.30	326.10 $\pm$ 8.06	101.70 $\pm$ 8.08
Ferrolat 300	224.30 $\pm$ 3.71	307. [*] 00 $\pm$ 10.15	82. ^{**} 77 $\pm$ 8.28

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Merkitys kontrollin suhteen (laskettu Student's 't':llä)

TAULUKKO III

RUOANKULUTUS

Käsittely mg/kg/die	Keskimääräinen kokonaiskulutus	Vaihtelu
Kontrollit	32.33	-
Ferrolat 30	30.42	- 5.91
Ferrolat 100	30.98	- 4.18
Ferrolat 300	28.54	- 11.72

TAULUKKO IV

HEMATOLOGISET TIEDOT

	Käsittely			
	mg/kg/die			
	Kontrollit	Ferrolat 30	Ferrolat 100	Ferrolat 300
Hemoglobiini g%	12.11 $\pm$ 0.47	11.77 $\pm$ 0.37	12.39 $\pm$ 0.30	12.93 $\pm$ 0.25
Hematokriitti %	66.88 $\pm$ 2.06	61.44 $\pm$ 1.96	66.90 $\pm$ 2.77	64.16 $\pm$ 1.80
Leukosyytit 10 ³ /mm ³	16.95 $\pm$ 2.25	16.55 $\pm$ 1.65	23.46 $\pm$ 2.16	19.93 $\pm$ 2.58
Erytrosyytit 10 ⁶ /mm ³	5.76 $\pm$ 0.51	6.12 $\pm$ 0.68	5.91 $\pm$ 0.68	6.22 $\pm$ 0.31

TAULUKKO V

HEMATOKEMIAALLISET TIEDOT

	Käsittely			
	Kontrollit	Ferrolat 30	Ferrolat 100	mg/kg/die Ferrolat 300
Glukoosi mg%	55.33 $\pm$ 5.75	52.81 $\pm$ 4.38	63.61 $\pm$ 5.58	60.74 $\pm$ 4.97
Atsotemia mg%	32.73 $\pm$ 1.33	34.59 $\pm$ 2.25	28.68 $\pm$ 2.34	32.33 $\pm$ 2.52
GOT μ m /ml	110.51 $\pm$ 7.10	130.81 $\pm$ 8.59	109.09 $\pm$ 5.21	113.36 $\pm$ 7.29
GPT μ m /ml	19.58 $\pm$ 1.52	26.86 $\pm$ 3.43	30.14 $\pm$ 6.02	23.15 $\pm$ 2.57
Alkalinen fosfaatti μ m /ml	255.65 $\pm$ 13.82	229.53 $\pm$ 17.03	257.53 $\pm$ 22.35	213.80 $\pm$ 12.72 [*]
Koko proteiinit g%	6.19 $\pm$ 0.12	6.02 $\pm$ 0.17	6.37 $\pm$ 0.12	6.21 $\pm$ 0.16

Merkitys

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

TAULUKKO VI

VIRTSATESTIT

	Käsittely			
	mg/kg/die			
	Kontrollit	Ferrolat 30	Ferrolat 100	Ferrolat 300
pH	8.15 $\pm$ 0.17	8.55 $\pm$ 0.14	8.40 $\pm$ 0.18	8.50 $\pm$ 0.12
proteiinit	21.- $\pm$ 3.78	24.- $\pm$ 3.05	63.- $\pm$ 12.47**	53.33 $\pm$ 11.66*
glukoosi	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään
ketoniaineet	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään
bilirubiini	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään
veri	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään	ei yhtään

Merkitys

- * p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

TAULUKKO VII

ROTTIEN ELINTEN ABSOLUUTTINEN TUOREPAINO

	Käsittely			
	mg/kg/die			
	Kontrollit	Ferrolat 30	Ferrolat 100	Ferrolat 300
Ruumiin paino g	310.60 $\pm$ 7.53	300.33 $\pm$ 3.64	296.8 $\pm$ 6.16	278. [*] 44 $\pm$ 8.89
Sydän g	1.15 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.03	1.14 $\pm$ 0.04	1.09 $\pm$ 0.07
Keuhkot g	1.55 $\pm$ 0.05	1.70 $\pm$ 0.20	1.68 $\pm$ 0.05	1.57 $\pm$ 0.12
Maksa g	9.14 $\pm$ 0.35	8.89 $\pm$ 0.35	8.78 $\pm$ 0.28	8.35 $\pm$ 0.44
Perna g	1.38 $\pm$ 0.13	1.36 $\pm$ 0.08	1.65 $\pm$ 0.12	1.37 $\pm$ 0.09
Munuaiset g	2.28 $\pm$ 0.07	2.21 $\pm$ 0.09	2.22 $\pm$ 0.08	2.09 $\pm$ 0.10
Lisämunuais- rauhaset mg	50.30 $\pm$ 4.55	56.33 $\pm$ 7.69	51.80 $\pm$ 6.07	37.44 $\pm$ 5.56
Aivot g	1.77 $\pm$ 0.03	1.70 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.05	1.68 $\pm$ 0.06
Kivekset g	3.30 $\pm$ 0.05	3.12 $\pm$ 0.10	3.08 $\pm$ 0.16	3.25 $\pm$ 0.07
Maha g	1.77 $\pm$ 0.09	1.77 $\pm$ 0.05	1.75 $\pm$ 0.07	1.53 $\pm$ 0.09

Merkitys

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

TAULUKKO VII

ROTTIEN ELINTEN SUHTEELLINEN TUOREPAINO

	Käsittely mg/kg/die			
	Kontrollit	Ferrolat 30	Ferrolat 100	Ferrolat 300
Ruumiin paino	310.60 $\pm$ 7.53	300.33 $\pm$ 3.64	296.80 $\pm$ 6.16	278. [*] 44 $\pm$ 8.89
Sydän %	0.37 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.09	0.39 $\pm$ 0.02
Keuhkot %	0.50 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.06	0. [*] 57 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.06
Maksa %	2.94 $\pm$ 0.04	2.96 $\pm$ 0.10	2.96 $\pm$ 0.06	2.99 $\pm$ 0.08
Perna %	0.44 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.03	0. [*] 56 $\pm$ 0.04	0.49 $\pm$ 0.03
Munuaiset %	0.73 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.02
Lisämunuais- rauhaset %	0.016 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.002
Aivot %	0.57 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.02	0.60 $\pm$ 0.01
Kivekset %	1.06 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.05	1. [*] 18 $\pm$ 0.04
Maha %	0.56 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.02

Merkitys

- ^{*} p < 0.05
^{**} p < 0.01
^{***} p < 0.001

TAULUKKO IX

VERITASOT : VERTAILU FERROLAT - FERROSULFAATTI

Käsittely	Seerumin rauta g%				
	tuntia käsittelyn jälkeen				
	30'	1	2	4	6
Kontrollit H ₂ O 5 ml/kg	99.22 +24.92 (5)	59.91 ± 6.85 (5)	98.25 +13.28 (5)	80.17 ± 6.37 (5)	74.- +10.10 (5)
Ferrolat 22.37 mg/kg (Fe = 1 mg/kg)	227.**45 +16.40 (5)	275.**28 +18.91 (5)	269.**61 +22.51 (5)	203.**16 +22.74 (5)	148.**18 +16.75 (5)
FeSO ₄ 7H ₂ O: 4.98 mg/kg (Fe = 1 mg/kg p.os)	336.**27 +27.79 (5)	272.**28 +24.09 (5)	273.**50 +19.32 (5)	129.**50 + 6.21 (5)	80.52 + 5.65 (5)

Merkitys kontrollin suhteen:

- * p < 0.05
- ** p < 0.01
- *** p < 0.001

Kahden rautavalmisteen merkitys:

30': < 0.01; 4 h: < 0.05; 6 h: p < 0.01

TAULUKKO X

VERITASOT: VERTAILU FERROLAT - FERRITIINI

Käsittely	Seerumin rauta g/100 ml tuntia käsittelyn jälkeen			
	1	2	4	6
Ferritiini (F-4503 Sigma laimennus 1.081% v/v, 5 ml/kg = 1 mg/kg di Fe)	168.79 +15.35	170.66 +14.70	148.08 +18.69	89.22 +12.75
Ferrolat 21.46 mg/kg (= 1 mg/kg di Fe) 5 ml/kg	302.07 ^{***} +15.59	269.81 ^{**} +29.94	223.72 +18.51	106.24 +11.30
Kontrollit, tislattua vettä 5 ml/kg	80.40 ^{***} + 6.39			

Merkitys laskettu Student's "t":llä ferritiinin suhteen.

- *
p < 0.05
- **
p < 0.01
- ***
p < 0.001

TAULUKKO XI

VERITASOT : VERTAILU ERITYYPPISISTÄ PROTEIINEISTA VALMISTETTUIJEN
SUKKINYYLIFERROPROTEIINIEN VÄLILLÄ

5		
	Käsittely	Seerumin rauta g/100 ml keskimääräiset arvot $\pm$ SE
10	Kontrollit	83.99 $\pm$ 7.56
	Sukk.soija	260.68 $\pm$ 29.52 ***
	Sukk.ovalbumiini	235.82 $\pm$ 46.06 *
	Sukk. seeruminproteiini	277.63 $\pm$ 49.35 **
	Ferrolat	305.81 $\pm$ 23.20 ***

15 Merkitys kontrollin suhteen

- * p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001

20

Esillä olevan keksinnön kohteena ovat siis kaikki käyttökelpoiset teolliset muodot, joita käytetään esitetyissä sukkinyyli-ferroproteiini johdannaisissa ja jotka on esitetty vaatimuksina tässä aineena, jotka sopivat raudanpuutosanemian hoitoon. Eräs keksinnön olennainen muoto muodostuu tästä syystä ihmisille ja eläimille tarkoitetuista farmaseuttisista valmisteista, jotka sisältävät ennalta määrättyjä määriä näitä johdannaisia. Viimeksi mainitut voidaan antaa oraalisesti, esimerkiksi tablettien, kapselien, ampullien, rakeita sisältävien pikkupussien, siirappien, eläinten ruokaan lisättävien jauheiden jne. muodossa.

30

Seuraavat valmisteet on esitetty vain esimerkkinä:

- ampullit, jotka sisältävät 5-10-40 mg rautaa ferrosukkinyyliproteiinien muodossa, vesipitoisten liuottimien, stabilaattoreiden, makuaineiden jne. lisäksi, kuten tavallisesti käytetään farmasiassa;
- 35 - tabletit, jotka sisältävät 5-10-40 mg rautaa ferrosukkinyyliproteiinien muodossa, täyteaineiden, dispergointiaineiden jne. lisäksi, joita yleisesti käytetään apteekkitavaroissa;

- kapselit, jotka sisältävät 5-10-40 mg rautaa ferrosukkinyyliproteiinien muodossa;
- yksikköannospussit, jotka sisältävät kuohuvaa granulaattia, joissa on 5-10-40 mg rautaa ferroproteiinien muodossa, lisäksi sokeria, makuaineita, stabilaattoreita jne., joita yleisesti käytetään farmasiassa;
- 5 - jauhettua maitoa, jota lisätään vierotettavien eläinten ruokaan, 5-20 paino-% aktiivista ainetta.

1 Patenttivaatimukset

1. Menetelmä lääkeaineina käytettävien, rautaa sisältävien sukkinyloitujen proteiinien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sukkinyloidaan lähtöproteiini sukkiinihapon johdannaisen avulla, joka sitten saatetaan reagoimaan rautasuolojen kanssa vesipitoisessa väliaineessa pH-arvossa 7,5-8 ja että saatu tuote eristetään saostamalla pH-arvossa 2-4, jolloin viimeksi mainittu pH-alue tuotetaan spontaanisti tai tekemällä happameksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sukkinyloidun proteiinin ja rautasuolojen välinen reaktio tapahtuu lähellä neutraalipistettä olevassa pH-arvossa.
3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisten, rautaa sisältävien sukkinyloitujen proteiinien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sukkinyloitu proteiini saatetaan reagoimaan rautasuolojen kanssa vesipitoisessa väliaineessa pH-arvossa 7,5-8 ja että reaktiotuote eristetään poistamalla liuotin sen jälkeen, kun pH-arvo on säädetty lähelle neutraalipistettä oleviin arvoihin.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan sukkinyloituja proteiineja, jotka sisältävät 0,4-6,7 paino-% rautaa vaihtelemalla rautasuolan ja sukkinyloidun proteiinin painosuhdetta välillä 0,4-6,7.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöproteiini sukkinyloidaan sukkinylointiasteeseen 20-100% vaihtelemalla sukkiinihapon johdannaisen määrää suhteessa lähtöproteiiniin sukkinyloitaviin ryhmiin.
6. Jonkin patenttivaatimuksien 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähtöproteiini on alkuperältään kasvi- tai eläinproteiini.
7. Jonkin patenttivaatimuksien 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan maitoproteiini, jonka sukkinylointiaste on yli 70% ja joka sisältää yli 4 paino-% rautaa.

1 8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että valmistetaan ovalbumiini, jonka sukkinylointiaste on yli 70%
ja joka sisältää yli 4 paino-% rautaa.

5 9. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että valmistetaan soijaproteiini, jonka sukkinylointiaste on yli
70% ja joka sisältää yli 4 paino-% rautaa.

10

15

20

25

30

35

1 Patentkrav

1. Förfarande för framställning av succinylerade järninnehållande proteiner som är användbara som läkemedel, k ä n n e t e c k n a t därav, att man succinylerar ett utgångsprotein med hjälp av ett derivat att succininsyra som man bringar att reagera med järnsalter i ett vattenmedium vid ett pH-värde från 7,5 till 8, och att man separerar den erhållna produkten genom utfällning vid pH-värdet 2-4, varvid sistnämnda pH-område alstras spontant eller genom surgörning.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att reaktionen mellan det succinylerade proteiner och järnsalterna sker vid ett pH-värde nära neutralpunkten.
3. Förfarande för framställning av succinylerade järninnehållande proteiner enligt patentkraven 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man bringar succinylerat protein att reagera med järnsalter i vattenmedium vid ett pH-värde från 7,5 till 8, och att reaktionsprodukten separeras genom att avlägsna lösningsmedlet efter det att pH-värdet reglerrats till värden nära neutralpunkten.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer succinylerade proteiner som innehåller 0,4-6,7 vikt-% järn, genom att variera förhållandet mellan järnsaltet och det succinylerade proteinet mellan 0,4-6,7.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att utgångsproteinets succinyleras till en succinyleringsgrad på 20-100 %, genom att variera mängden succininsyraderivat i förhållande till grupperna i utgångsproteinets som kan succinyleras.
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att utgångsproteinets är vegetabiliskt eller animaliskt protein till sitt ursprung.
7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer mjölkprotein vars succinyleringsgrad är över

1 70 % och som innehåller över 4 vikt-% järn.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t
därav, att man framställer äggalbumin, vars succinyleringsgrad är över
5 70 % och som innehåller över 4 vikt-% järn.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t
därav, att man framställer sojaprotein vars succinyleringsgrad är över
70 % och som innehåller över 4 vikt-% järn.
10

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—

15

20

25

30

35

Fig. 1

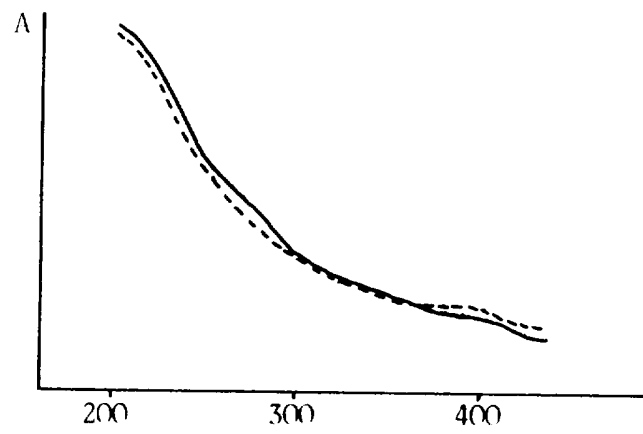


Fig. 2

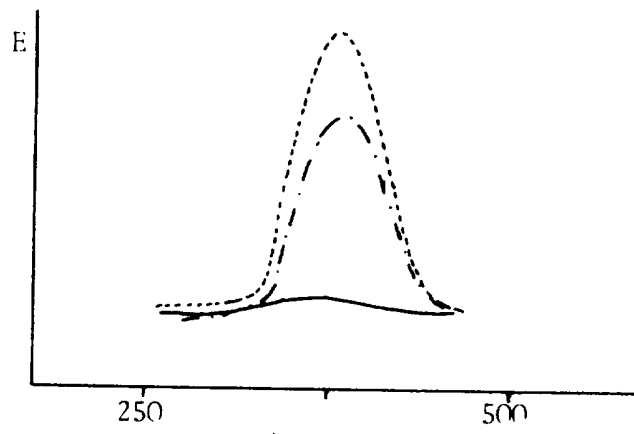


Fig. 3

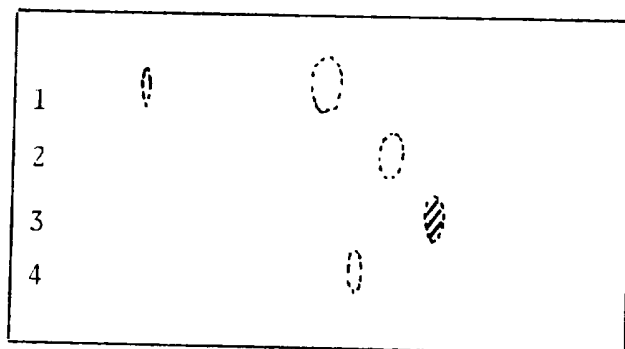


Fig. 4

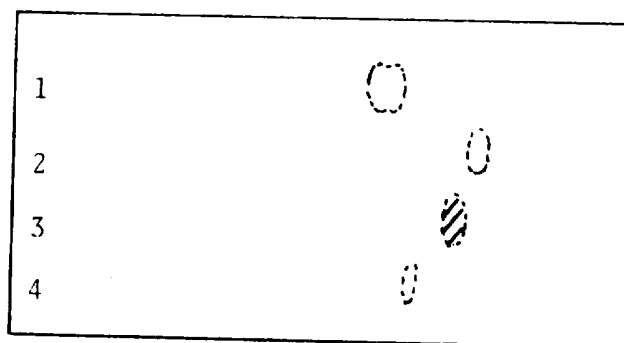


Fig. 5

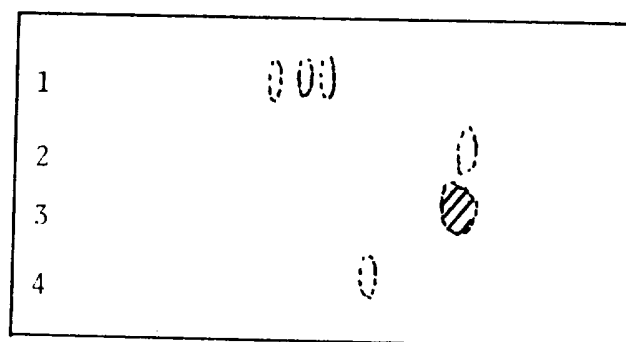


Fig. 6

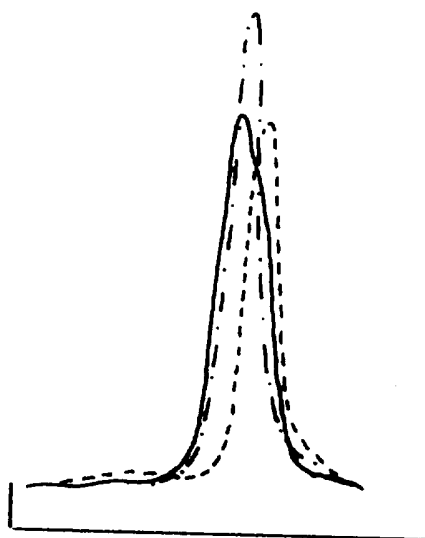


Fig. 7

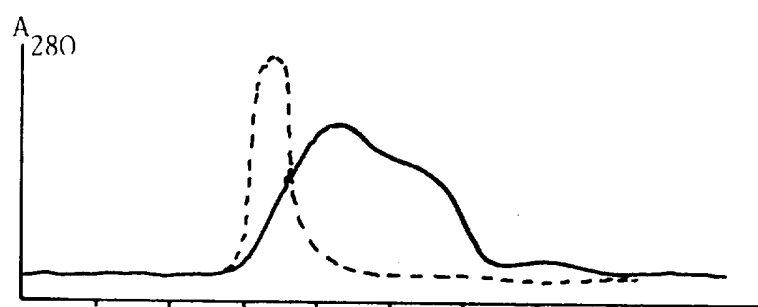
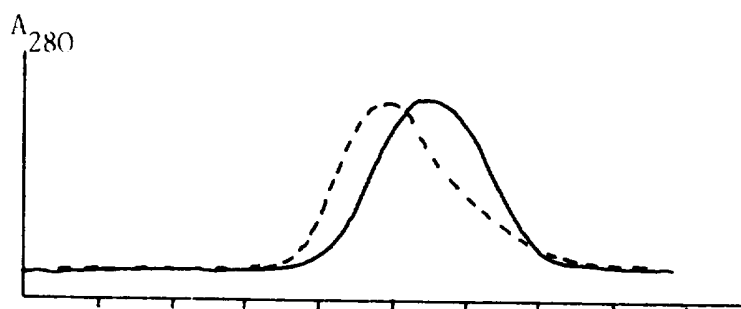


Fig. 8



77574

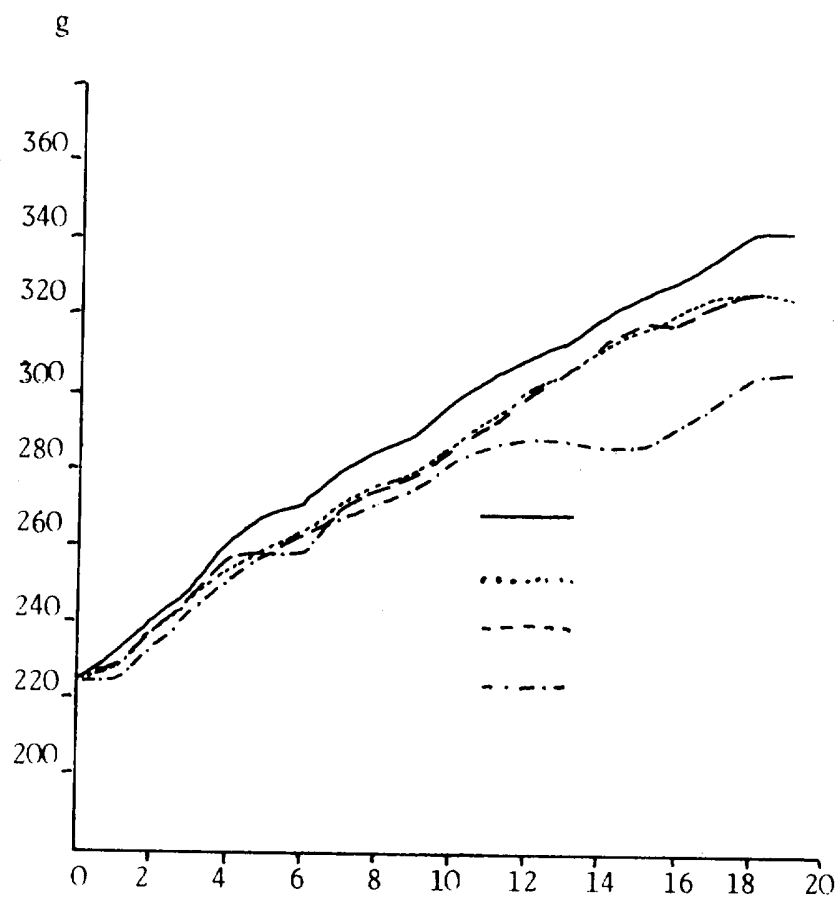


Fig. 9