



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 402 153 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1551/89

(51) Int.Cl.⁶ : A61K 38/36

(22) Anmeldetag: 26. 6.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1996

(45) Ausgabetag: 25. 2.1997

(56) Entgegenhaltungen:

EP 255771A EP 286323A

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

SCHWARZ HANS PETER
WIEN (AT).
MOLINARI EWALD DR.
MÖDLING, NIEDERÖSTERREICH (AT).
LINNAU YENDRA DR.
WIEN (AT).
PFEILER SUSANNE DIPLO.ING.
WIEN (AT).

(54) PROTEIN-S-HÄLTIGE PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATION

(57) Präparation zur Behandlung bzw. Verhinderung von Thrombosen bzw. thromboembolischen Komplikationen, mit einem Gehalt an Protein S in einer Konzentration, die mindestens das 50-fache von dem in nativem Plasma enthaltenen beträgt und frei ist von C4b-binding Protein, gegebenenfalls in Kombination mit einem Gehalt an aktiviertem Protein C.

B
402 153
AT

Die Erfindung betrifft eine Protein S-hältige pharmazeutische Präparation zur Behandlung bzw. Verhinderung von Thrombosen bzw. thromboembolischen Komplikationen, sowie die Verwendung von gereinigtem Protein S zur Herstellung von solchen Präparationen.

Derzeit zur Verfügung stehende antithrombotische Substanzen weisen als Nebenwirkung ein Blutungsrisiko auf. Somit ist deren Einsatz in klinischen Situationen, die mit erhöhter Thromboseneigung einhergehen, mit erheblichen Risken verbunden.

Protein S ist eine physiologisch vorkommende antithrombotische Substanz, die die Gerinnung hemmt und gleichzeitig profibrinolytische Eigenschaften aufweist. Natives Plasma enthält pro Milliliter zwischen 25 µg und 30 µg Protein S. Protein S ist ein nicht-enzymatischer Cofaktor für die antikoagulatorischen und profibrinolytischen Eigenschaften von aktiviertem Protein C. Aktiviertes Protein C beschleunigt die Inaktivierungsrate von aktiviertem Faktor V sowie von aktiviertem Faktor VIII.

Aus der Literatur (Blood, Vol. 64, No. 6 (December), 1984, Seiten 1297 bis 1300 sowie Progress in Hematology, Vol. XV, ISBN 0-8089-1861-3 (1987), Seiten 39 bis 49) ist des weiteren bekannt, daß Protein S ein Vitamin K-abhängiges Protein ist, welches in der Leber, im Endothel, in Megakaryozyten synthetisiert wird. Nach seiner Struktur ist Protein S ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molkulargewicht von ca. 70.000. Es besteht aus 635 Aminosäuren. Im Plasma liegt das Protein S in verschiedenen Formen vor; u. zw. zu einem geringeren Teil in freier, aktiver Form und zu einem größeren Teil, etwa zu 60 %, als nicht-kovalenter Komplex mit C4b-binding-Protein, welcher Komplex nicht aktiv ist.

Aktiviertes Protein C verlängert in dosisabhängiger Weise die Plasmagerinnungszeit. In einem Protein S-immunodepletierten Plasma kann aktiviertes Protein C seine Funktion nicht entfalten. Erst nach Rekonstitution eines Protein S-Mangelplasmas mit gereinigtem Protein S wird aktiviertes Protein C wieder voll wirksam. Die pathophysiologische Rolle wird durch Beschreibung von Individuen mit angeborenen Protein S-Mangel und Thrombophilie deutlich. Ein angeborener Protein S-Mangel wird autosomal-dominant vererbt und ist durch das Auftreten von venösen und arteriellen Thromboembolien im frühen Jugendalter gekennzeichnet.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, eine therapeutisch einsetzbare Protein S-hältige Präparation zur Verfügung zu stellen, die aufgrund eines spezifischen Reinigungsverfahrens eine vielfach höhere Konzentration aufweist als die Protein S-Konzentration in nativem Plasma und frei ist von seine Wirkung herabsetzenden Komponenten.

Zur Lösung dieser Aufgabe sieht die Erfindung eine Präparation zur Behandlung bzw. Verhinderung von Thrombosen bzw. thromboembolischen Komplikationen vor, mit einem Gehalt an Protein S in einer Konzentration, die mindestens das 50-fache von dem in natürlichem Plasma enthaltenen beträgt und frei ist von C4b-binding Protein, gegebenenfalls in Kombination mit einem Gehalt an aktiviertem Protein C.

Diese Präparation kann bevorzugt durch Reinigung mittels polyklonaler oder monoklonaler Anti-Protein S-Affinitätschromatographie hergestellt werden. Weiters ist es vorteilhaft, daß die erfindungsgemäß Protein S-Präparation zur Vermeidung von eventueller Infektiosität hitzebehandelt ist.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Protein S-Präparation, bei welchem eine Protein S-Fraktion bzw. eine Protein C-Fraktion, hergestellt aus Prothrombinkomplex-Konzentrat, mittels polyklonaler oder monoklonaler Anti-Protein S-Affinitätschromatographie gereinigt und konzentriert wird, ist dadurch gekennzeichnet, daß in einem Stadium vor der Immobilisierung das IgG-hältige Substrat bei einer Temperatur und während einer Zeitspanne, die ausreicht, um eventuell vorhandene Krankheitserreger, insbesondere Viren, zu inaktivieren, hitzebehandelt wird.

Die erfindungsgemäß durch spezifische Reinigungs- und Konzentrationsmaßnahmen gereinigte und aufkonzentrierte Protein S-Präparation läßt sich mit Vorteil zur Herstellung verschiedener therapeutischer Zubereitungen einsetzen.

Ein Verwendungsvorschlag gemäß der Erfindung ist die Verwendung von durch polyklonale Affinitätschromatographie oder durch monoklonale Anti-Protein S-Affinitätschromatographie gereinigtem Protein S zur Herstellung von therapeutischen Präparationen zu Verbindung von thromboembolischen Komplikationen bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Protein S-Mangelzuständen.

Ein weiterer Verwendungsvorschlag ist die Verwendung von durch polyklonale Affinitätschromatographie oder durch monoklonale Anti-Protein S-Affinitätschromatographie gereinigtem Protein S zur Herstellung von therapeutischen Präparationen, zur Behandlung von Patienten mit erhöhtem C4b-binding Proteinspiegel.

Ein weiterer bevorzugter Verwendungsvorschlag ist die Verwendung von durch polyklonale Affinitätschromatographie oder durch monoklonale Anti-Protein S-Affinitätschromatographie gereinigtem Protein S gegebenenfalls in Kombination mit aktiviertem Protein C für die Herstellung von an künstlichen Gefäßoberflächen immobilisierten Präparationen zur Verhinderung einer Thrombosierung.

AT 402 153 B

Die Herstellung, Reinigung und Bewertung erfindungsgemäßer Präparationen ist in den folgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1:

5

Reinigung von Protein S aus Prothrombinkomplex-Konzentrat

Menschliches Protein S wurde aus Faktor IX-Konzentrat (Prothrombinkomplex STIM-3 IMMUNO AG Vienna) mittels eines Anionenaustauschers auf Basis eines dreidimensional vernetzten Polysaccharids mit 10 quarternären Aminoethylgruppen (QAE-Sephadex) und Chromatographie an einer Matrix auf Basis modifizierter, mit 2,3-dibromopropanol quervernetzter Agarose, an welcher ein blauer Farbstoff (Cibracron Blue 3G-A) kovalent gebunden ist (Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia)) in folgender Weise hergestellt.

Das lyophilisierte Konzentrat (100g) wurde in 200 ml sterilem ionenfreiem Wasser gelöst und gegen einen Puffer, bestehend aus 0,01 M 2-(N-Morpholinethansulfonsäure), pH 6,0; 0,18 M NaCl, 10 mM EDTA, 2 15 mM Benzamidin-HCl und 0,02 % NaN₃ (Startpuffer), dialysiert. Das dialysierte Material wurde dann auf eine QAE-Sephadex-Säule (8 x 19 cm) aufgetragen und mit dem genannten Puffer equilibriert. Als Waschlösung wurden 1,5 l Puffer (Startpuffer) verwendet.

Protein S wurde mit 110 ml/h mit einem linearen NaCl-Gradienten, bestehend aus 1,2 l Startpuffer und 20 1,2 l eines weiteren Puffers, der sich von dem ersten Puffer durch Zusatz von 0,5 M NaCl unterscheidet, eluiert. Die Protein S-Fraktionen wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fast Flow SDS Page (Pharmacia)) und Antigenbestimmung (Laurell) nach Protein S untersucht, und Fraktionen, die Protein S enthielten, wurden gepoolt und schließlich gegen einen Puffer dialysiert. Dieser Puffer enthielt 50 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM Benzamidin-HCl und 0,2 % NaN₃. Nach der Dialyse wurde 25 der Protein S-Pool an eine Blue Sepharose-Säule CL-6B (2,5 cm x 10,5) aufgetragen und mit dem Startpuffer equilibriert.

Die Waschung erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 15 ml/h mit 500 ml Startpuffer. Das Protein S konnte so im "void volume" eluiert werden, während Prothrombin an der Säule adsorbierte. Die Protein S-reichen Fraktionen wurden wieder mittels SDS-Page Fast Flow System (Pharmacia und Laurell, Scand. J. Clin. Invest. (Suppl) 29 (1977) 21 (suppl 124)) bestimmt.

30 Das so hergestellte Protein S hatte die für Protein S charakteristische Morphologie an einem reduzierten SDS-Page, nämlich zwei nahe Banden (Doublet) mit einem Molekulargewicht von etwa 86.000 bzw. 76.000. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt anhand eines Extinktionskoeffizienten von 0,1 bei 280 nm für menschliches Protein S und wurde durch die Methode nach LOWRY bestätigt (Lowry O., Rosebrough N., Farr AL, Randall R., Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 35 193(1951)265).

Beispiel 2:

Immunisierung von Schafen mit Protein S

40

Das nach Beispiel 1 hergestellte vorgereinigte Protein S wurde zur Herstellung von Schaf-Antiserum gegen Protein S verwendet, indem vier Immunisierungsinjektionen vorgenommen wurden, wobei bei den ersten zwei Injektionen 100 µg Protein S mit Freudschem Adjuvans subkutan appliziert wurden und bei den folgenden Boosterungen mit inkomplettem Adjuvans gearbeitet wurde. Nach weiteren Boosterungen 45 wurde das Antiserum mittels doppelter Immunodiffusion getestet und zeigte eine Präzipitation mit gereinigtem Protein S und mit Normalplasma.

Beispiel 3:

50 Reinigung von Protein S mittels polyklonaler Affinitätschromatographie

Die IgG-Faktion aus 450 ml Antiserum wurde durch Alkoholfällung und anschließende Adsorption an ein Gelfiltrationsmaterial (Sephadex A 50) in TRIS-HCl-Puffer, pH 6, 8, erhalten. Aus 450 ml Antiserum waren im Überstand 1,14 g Anti-Protein S-IgG. Die IgG-Faktion wurde an 450 ml Sepharose CL-4B (Blue 55 Sepharose CL-4B ohne Farbstoff) gekoppelt, wobei 5,7 mg Protein/ml Sepharose eingesetzt wurden. Die Kopplungseffizienz betrug 76 %. Die Anti-Protein S-Säule wurde mit Glycin-HCl, pH 3, und Adsorptionspuffer, pH 7,5, equilibriert.

AT 402 153 B

Der Adsorptionspuffer bestand aus 20 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,25 M NaCl, 2 mM Benzamidin, 0,02 % Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) und 0,02 % NaN₃, pH 7,4. Die Waschpufferlösung hatte folgende Gehalte: 20 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1,0 M NaCl, 0,5 mM Benzamidin, 0,01 % Tween 20; 0,02 % NaN₃, pH 7,4.

5 Der Elutionspuffer war wie die Waschpufferlösung zusammengesetzt, mit der Änderung, daß 0,05 % Tween 20 und zusätzlich 243,3 g NaSCN, pH 7,4 (eine 3 M Rhodanid-Lösung) verwendet wurden.

Die Dialysepufferlösung enthielt 20 mM Tris, 0,15 mM Glycin, 1 mM EDTA, 2 mM Benzamidin, pH 8,3.

Zur erfundungsgemäßen weiteren Reinigung der Protein S-Fraktion, hergestellt aus Prothrombinkomplex-Konzentrat nach Beispiel 1, wurden 100 g der Fraktion in 1 l Adsorptionspuffer gelöst und über Nacht 10 gegen eine Adsorptionspufferlösung dialysiert. Die Säule wurde nach Auftragen der Probe mit Waschpuffer, ca. 5 l, proteinfrei gewaschen, anschließend erfolgte die Elution mit 3 M NaSCN in der Elutionspufferlösung. Das Eluat wurde sofort dialysiert, bis SCN unter der Nachweisgrenze lag; das Eluat hatte eine Konzentration von 500 µg/ml Protein S. Es war frei von C4b-binding Protein.

15 Beispiel 4:

Reinigung von Protein S mittels monoklonaler Anti-Protein S-Affinitätschromatographie

Monoklonale Anti-Protein S-Antikörper wurden wie folgt hergestellt:

20 BALB/C-Mäuse wurden mit 100 µg des nach Beispiel 1 hergestellten Protein S in zweiwöchigen Abständen durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Nach sechs Wochen wurden noch einmal 50 µg des menschlichen Protein S injiziert, und drei Tage später die Fusion vorgenommen. Die Myelomzelllinie (P3-X-63-AG8-653, 1,5 × 10⁷ Zellen) wurde vermischt mit 1,7 × 10⁸ Milzzellen von einer Maus, und die Fusion 25 nach modifizierter Köhler & Milstein-Methode unter Verwendung von PEG 1500 durchgeführt (Kohler G., Milstein C., Nature 256 (1975) 495-497).

Positive Klone, getestet mittels eines ELISA, wurden zweimal subgeklont. Aszitesproduktion erfolgte durch Injektion von 5 × 10⁶ Hybridomzellen je BALB/C-Maus zwei Wochen nach Pristan-Behandlung.

30 Das Immunglobulin wurde aus Aszites durch Ammoniumsulfatpräzipitation und anschließende Chromatographie mittels QAE-Sephadex und darauffolgend Chromatographie an einem unmodifizierten, dreidimensional vernetztem Dextrangel (Ausschlußgröße: zwischen 1 × 10⁶ und 6 × 10⁵) (Sephadex G200) gereinigt.

35 Die aus Aszites gewonnene und an Protein A Sepharose (Sepharose CL-4B, an die Protein A gekoppelt ist, welches eine starke, spezifische Wechselwirkung mit der F_c-Region von IgG eingeht) vorgereinigte IgG-Fraktion wurde an Sepharose CL-4B gekoppelt. Die Affinitätschromatographie Reinigung von Protein S, welche aus Prothrombinkomplexkonzentrat nach Beispiel 1 gewonnen wurde, erfolgte unter den nach Beispiel 3 für polyklonale Protein S-Antikörper beschriebene Bedingungen. Die Konzentration des Eluates an Affinitätschromatographie S betrug 600 µg/ml. Es war frei von C4b-binding Protein.

40 Die nach der Methode der polyklonalen oder der monoklonalen Affinitätschromatographie hochgereinigten Protein S-Präparationen wurden einer SDS-PAGE (Gradientengel 8 bis 12 %) unterworfen, und sie können anhand von Coomassie-Färbung (Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680) als über 95 % rein bezeichnet werden.

Beispiel 5:

45 Die nach den Beispielen 3 oder 4 hergestellten Protein S-Eluate wurden in folgender Weise zu pharmazeutisch applizierbaren Präparationen fertiggestellt:

Die Eluate wurden zuerst einem Ultrafiltrations- und einem Diafiltrationsschritt unterworfen. Für die Diafiltration wurde ein Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet, der pro Liter 150 mM NaCl und 15 mM Trinatriumcitrat, 2H₂O enthielt. Die erhaltenen Filtrate wurden gefriergetrocknet und durch eine einstündige 50 Dampfbehandlung bei 80 °C ± 5 °C und 1375 ± 35 mbar virusaktiviert (zwecks Beseitigung eventuell vorhandener viraler Kontaminationen von polyklonalem oder monoklonalem Antikörper).

55 Das lyophilisierte virusaktivierte Material wurde sodann in einer sterilen isotonen NaCl-Lösung gelöst, und mittels Ionenaustauschchromatographie an einem Material auf Basis modifizierter Agarose (Q-Sepharose) wurden etwaig vorhandene Antikörper bzw. Serumamyloid P entfernt. Die gereinigte Lösung wurde durch einen weiteren Ultrafiltrations- und Diafiltrationsschritt konzentriert. Danach wurden zur erhaltenen Lösung pro Liter 10 g Albumin, 150 mM NaCl und 15 mM Trinatriumcitrat zugegeben. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,5. Sie enthielt 3000 µg/ml Protein S. Dieser Gehalt an Protein S entspricht einer 500-fachen Anreicherung im Vergleich zu Plasma. Maus-Immunglobulin sowie die Faktoren II, VII, IX und X konnten

nicht nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert, abgefüllt und lyophilisiert.

Die Wirkung der Präparationen zur Verhinderung von Thrombosen wird im folgenden Thrombosemodell dargestellt:

- 5 11 weiße männliche New Zealand Kaninchen mit einem Gewicht von 2,5 bis 3 kg wurden für den Test herangezogen. Die Tiere erhielten eine Anästhesie, bestehend aus Urethan (50 %ige Lösung) in einer Dosis von 2 g/kg Körpergewicht.

Nach Anästhesie wurden die Tiere auf dem Rücken liegend in eine Haltervorrichtung plaziert. Nach Rasieren der Vorderfront des Halses wurde ein Längsschnitt gemacht, um die Jugularvenen beidseits über ca. 3 cm zu präparieren. 50 s vor der Ligatur wurden 25 Einheiten "Faktor Eight Inhibitor Bypassing 10 Activity" (FEIBA) pro Kilogramm (= thrombogene Substanz, Thrombus-Stimulus) in die kontralaterale Ohrvene injiziert. Die Ligatur wurde für 10 bzw. 20 min belassen, dann anschließend das Gefäß entfernt und nach Eröffnen des Gefäßes der entstandene Thrombus nach visueller Stadieneinteilung von 0 bis 4 beurteilt, wobei "0" die Abwesenheit eines Clot und "4" einen festen, exsudatfreien Clot bedeutet.

Dieses Modell ist in der Literatur (Seminars in Thrombosis and Hemostasis 11 (1985) 155; J. Appl. 15 Physiol. 14 (1959) 943-946) für die Evaluierung von antithrombotischen Substanzen beschrieben.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde Protein S 5 min vor der FEIBA-Injektion in verschiedenen Dosierungen über die Ohrvene appliziert. Protein S wurde als wirksam im Hinblick auf Thromboseverhinderung eingestuft, wenn der Clot mit + 1 oder weniger beurteilt wurde.

Protein S, in Dosen von 0,5 bis 1,2 mg/kg 5 min vor der FEIBA-Applikation (25 E/kg) gespritzt, war in 20 allen 11 Tieren wirksam. Bei 20-minütiger Stase war Protein S in Dosierung von über 1,5 mg wirksam (3 Tiere). Das maximal eingesetzte Volumen betrug 7 ml. Kontrollen, bestehend aus Protein S-Puffer in 7 und 10 ml eingesetzt, hatten keine thromboseverhindernde Wirkung.

Wie bereits ausgeführt, ist eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung die Verwendung einer Kombination von erfindungsgemäß gereinigtem Protein S mit aktiviertem Protein C.

25

Beispiel 6:

Herstellung von aktiviertem Protein C

30 Hochreines aktiviertes Protein C wurde analog, wie in Beispiel 4 für Protein S beschrieben, hergestellt, indem zunächst eine rohe Protein C-Faktion aus kommerziell erhältlichem Prothrombinkomplex-Konzentrat hergestellt wurde. Monoklonale Antikörper gegen Protein C wurden, analog wie in Beispiel 4 für Protein C beschrieben, produziert und weiter gereinigt. Die monoklonalen Antikörper gegen Protein C wurden an ein mittels CNBR aktivierte Agarosegel, welches keine Tentakel aufweist und welches Liganden mit primären 35 Amingruppen bindet (CNBR-Sepharose 4B) (Pharmacia), gekoppelt. Für die Reinigung des Protein C mittels Affinitätschromatographie wurden folgende Puffer verwendet:

Als Adsorptionspuffer: 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,25 M NaCl und 5 mM Benzamidin;
als Waschpuffer wurde verwendet: 20 mM Tris, 1 M NaCl, 2 mM Benzamidin, 2 mM EDTA; der pH-Wert betrug 7,4;
40 als Elutionspuffer wurde verwendet: 3 M NaSCN, 20 mM Tris, 1 M NaCl, 0,5 mM Benzamidin, 2 mM EDTA.

Im einzelnen: Das Prothrombinkomplex-Konzentrat wurde im Adsorptionspuffer aufgelöst, wobei etwa 10 g des Prothrombinkomplex-Konzentrates für eine 20 ml monoklonale Antikörpersäule zur Verwendung kamen. Anschließend wurde das aufgelöste Prothrombinkomplex-Konzentrat filtriert, bei 20.000 rpm 15 min 45 lang zentrifugiert und durch ein 0,8 µm Filter sterilfiltriert. Das sterilfiltrierte und gelöste Prothrombinkomplex-Konzentrat wurde auf die Säule aufgetragen mit einer Flußrate von 10 ml/h. Anschließend wurde die Säule mit dem Waschpuffer proteinfrei gewaschen, und schließlich das gebundene Protein C mit dem Elutionspuffer bei einer Flußrate von 5 ml/h eluiert, und die Fraktion gesammelt. Das eluierte Protein C wurde gegen einen Puffer (0,2 M Tris, 0,15 M Glycin und 1 mM EDTA, pH 8,3) dialysiert. Der Protein C-Gehalt wurde antigenmäßig mittels der Methode nach Laurell und aktivitätsmäßig nach Aktivierung von Protein C mittels Schlangengift (Protac der Fa. Pentapharm) bestimmt.

Die Aktivierung des gereinigten Protein C erfolgte dadurch, daß 70 ml Thrombin (500 NIH Einheiten/ml, etwa 2000 NIH Einheiten/mg Protein entsprechend) an CNBR Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt wurden, worauf Protein C mit dem Thrombingel in einem Verhältnis von etwa 6 Einheiten Protein C zu 1 Einheit 55 Thrombin bei 37° C gemischt und unter kontinuierlichen Schütteln 3 h in Reaktion belassen wurden. Die Protein C-Aktivität wurde anschließend mit einem chromogenen Substrat, welches von aktiviertem Protein C gespalten wird und dadurch eine Farbbildung bewirkt, welche proportional zur Aktivität von Protein C ist, (S 2366 der Fa. Kabi (Chromogenix)) bestimmt. Das aktivierte Protein C wurde anschließend sterilfiltriert

AT 402 153 B

und gegebenenfalls eingefroren.

Beispiel 7:

5 Hochgereinigtes Protein C kann auch analog, wie in Beispiel 3 für Protein S beschrieben, mittels polyclonaler Affinitätschromatographie bereitet werden, indem Protein C-Antiserum durch Immunisierung von Schafen und Plasmapherese der Tiere hergestellt wird.

Nach der folgenden Arbeitsweise wurden 40 mg monoklonal gereinigtes Protein C an CNBR Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. 150 ml der Schaf-anti-Protein C-IgG-Fraktion wurden in folgendem Puffer auf die 10 Protein C-Säule aufgetragen: 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM Benzamidin, 10 mM CaCl₂.

Anschließend folgte eine Proteinfreiwashung der Säule mit demselben Puffer. Die calciumabhängige Antikörperfraktion wurde durch Elution mit folgendem Puffer erhalten: 100 mM NaCl, 20 mM Tris, 3 mM EDTA.

Etwa 6 % der gesamt aufgetragenen Schaf-IgG-Fraktion wurden unter diesen Bedingungen eluiert. Die 15 calciumunabhängige IgG-Fraktion wurde mit 4 M Guanidin von der Säule getrennt. Die gewonnene calciumabhängige (metallionenabhängige) Protein C-Antikörperfraktion wurde anschließend an eine CNBR Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt.

Prothrombinkomplex-Konzentrat wurde gelöst in 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 mM Benzamidin, 20 mM CaCl₂ und auf die calciumabhängige polyclonale anti-Protein C-Sepharose (CNBR Sepharose 4B an 20 die Antikörper, die gegen Protein C gerichtet sind, gebunden sind) aufgetragen, anschließend mit demselben Puffer gewaschen und mit folgendem Puffer: 100 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM Benzamidin, 3 mM EDTA, eluiert. Das eluierte Protein C wurde dann in ähnlicher Weise, wie für monoklonal gereinigtes Protein C nach Beispiel 6 beschrieben, weiterbehandelt und aktiviert.

Die Formulierung des nach Beispiel 6 bzw. 7 hergestellten hochgereinigten Protein C zu einer 25 pharmazeutisch verabreichbaren Präparation erfolgte in gleicher Weise, wie für das Protein S gemäß Beispiel 5 beschrieben.

Beispiel 8:

30 Hitzebehandlung der gegen Protein C oder Protein S gerichteten Antikörper

25 ml einer nach Beispiel 7 hergestellten, wässrigen Lösung eines monoklonalen Antikörpers gegen Protein C wurden gegen das 6-fache Volumen einer 0,75 %igen Glycinlösung diafiltriert, worauf 0,45 g Sorbit zugesetzt wurden. Danach wurde die Lösung eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 35 Wasser auf 7,6 % befeuchtet und in einer N₂-Atmosphäre 10 Stunden bei 80 °C erhitzt und damit eventuell vorhandene Krankheitserreger inaktiviert.

100 mg dieses Antikörpers wurden an 25 ml eines aktivierten Harzes zur Bindung von Antikörpern (Affi-Gel der Firma Bio-Rad) immobilisiert, wobei über 99 % des eingesetzten Proteins gebunden wurden. Zur Gewinnung von Protein C wurde aus einem Prothrombinkomplex-Konzentrat, wie im Beispiel 6 beschrieben, 40 das Protein C an den immobilisierten monoklonalen Antikörper gebunden und eluiert. Die Ausbeute betrug 600 µg Protein C pro ml Gel.

In gleicher Weise konnte auch Protein S mit Hilfe von Antikörpern gegen Protein S gewonnen werden, welche Antikörper vor der Immobilisierung hitzebehandelt worden waren.

45 Beispiel 9:

Wirksamkeit von aktiviertem Protein C zur Verhinderung von Thrombosen im Kaninchen-Thrombosemodell

Aktiviertes Protein C wurde als wirksam im Hinblick auf Thromboseverhinderung eingestuft, wenn der 50 Clot mit + 1 oder weniger beurteilt wurde. Aktiviertes Protein C in Dosen von 500 bis 1000 µg/kg 5 min vor der FEIBA-Applikation (25 E/kg) gespritzt, war in 18 von 18 Tieren wirksam. Die nicht aktivierte Form hatte keine thromboseverhindernde Wirkung in diesem Modell.

Beispiel 10:

Bei kombinierter Applikation von Protein S und aktiviertem Protein C kamen 280 µg aktiviertes Protein 55 C und 500 µg Protein S pro kg zur Anwendung.

Eine solche Kombination ist im Thrombose-Modell im Hinblick auf Thromboseverhinderung voll wirksam; die eingesetzten Mengen der einzeln wirksamen Substanzen zeigten in der kombinierten Anwendung in deutlich verringriger Menge eine thromboseverhindernde Wirkung. Somit ist ein synergistischer oder additiver Effekt anzunehmen. Verlängerte Blutungen aus den gesetzten Wunden wurden nicht beobachtet.

5 Aus Sicherheitsgründen kann bei der beschreibenen Reinigung mittels polyklonaler oder monoklonaler Anti-Protein S-Affinitätschromatographie das IgG-hältige Substrat hitzebehandelt werden, u. zw. bei einer Temperatur und während einer Zeitdauer, die ausreicht, um eventuell vorhandene Krankheitserreger, insbesondere Viren, zu inaktivieren.

10 **Patentansprüche**

1. Protein S-haltige Präparation zur Behandlung bzw. Verhinderung von Thrombosen bzw. thromboembolischen Komplikationen, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Protein S-Gehalt mindestens das 50fache von dem in nativem Plasma enthaltenen Protein S beträgt, daß die Präparation frei von C4b-binding Protein ist und daß sie gegebenenfalls auch aktiviertes Protein C enthält.
2. Protein S-haltige Präparation nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein S durch polyklonale oder monoklonale Anti-Protein S-Affinitätschromatographie gereinigt ist.
- 20 3. Protein S-haltige Präparation nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein S zur Vermeidung von eventueller Infektiosität hitzebehandelt ist.
4. Verfahren zur Herstellung einer Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem eine Protein S-Fraktion bzw. eine Protein C-Fraktion, hergestellt aus Prothrombinkomplex-Konzentrat, mittels 25 polyklonaler oder monoklonaler Anti-Protein S-Affinitätschromatographie und durch Eluieren gereinigt und konzentriert wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem Stadium vor der Immobilisierung das IgG-hältige Substrat bei einer Temperatur und während einer Zeitdauer, die ausreicht, um eventuell vorhandene Krankheitserreger, insbesondere Viren, zu inaktivieren, hitzebehandelt wird.
- 30 5. Verwendung einer Präparation nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung von therapeutischen Präparationen zur Verhinderung von thromboembolischen Komplikationen bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Protein S-Mangelzuständen.
- 35 6. Verwendung einer Präparation nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung von therapeutischen Präparationen zur Behandlung von Patienten mit erhöhtem C4b-binding Proteinspiegel.
7. Verwendung einer Präparation nach den Ansprüchen 1 bis 3, gegebenenfalls in Kombination mit aktiviertem Protein C, zur Herstellung von an künstlichen Gefäßoberflächen immobilisierten Präparaten zur Verhinderung einer Thrombosierung.

40

45

50

55