(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **151610 B**

P.B.

(21) Patentansøgning nr.: **5745/77**

(51) Int.Cl.[4] **A 61 K 39/395**

(22) Indleveringsdag: **22 dec 1977**

(41) Alm. tilgængelig: **24 jun 1978**

(44) Fremlagt: **21 dec 1987**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **23 dec 1976 DE 2658334**

(71) Ansøger: ***BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; D-3550 Marburg/Lahn, DE**

(72) Opfinder: **Hans *Mueller; DE**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af human-immunoglobulinpræparater med formindsket komplementaktivitet og god antistofaktivitet**

(56) Fremdragne publikationer

DK freml. skrift nr. 141432 (pat. nr. 141432)
Andre Publikationer : Chemical Abstracts, vol. 61 (1964), 2088e

DK 151610 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af human-immunoglobulinpræparater med formindsket komplementaktivitet og god antistofaktivitet. Disse immunoglobulinpræparater kan anvendes som lægemidler, især til intravenøs indgivelse.

Immunoglobulinpræparater, fremstillet ved fraktionering af serum, især gående ud fra human serum, har på grund af deres antistofegenskaber en væsentlig betydning som prophylaktika og terapeutika til understøttelse af legemets afværgereaktioner.

Immunoglobulinpræparater har hidtil kun vist sig egnet til hovedsagelig intramuskulær anvendelse. Ved intravenøs indgivelse reagerer modtageren mere eller mindre udpræget med anaphylaktoide symtomformer. En intravenøs indgivelse af immunoglobulinpræparaterne er imidlertid meget ønskværdig, fordi denne hurtig kommer til virkning i organismen.

Det antages, at de anaphylaktoide bireaktioner beror på en binding af serumkomplementet ved hjælp af det indgivne immunoglobulin. Man har derfor allerede flere gange forsøgt at ændre immunoglobuliner således, at deres antistofreaktivitet bliver bevaret, men at graden af komplementbindingen imidlertid forringes så meget, at de modificerede immunoglobuliner kan anvendes til intravenøs indgivelse. Det er kendt, at immunoglobuliner ændres ved enzymatisk nedbrydning på en sådan måde, at bindingsstederne for komplementet fraspaltes, idet dog resten af molekylet stadig er i stand til at binde antigener. Et sådant præparat indgives intravenøst med godt resultat.

I nogle tilfælde anses det i sit molekyle formindskede immunoglobulin på grund af den forholdsvis forkortede halveringstid i organismen som mindre tilfredsstillende end immunoglobulinpræparater med vidtgående uforandret molekylvægt.

Også omsætningen af immunoglobuliner med alkylerende eller acylerende midler er beskrevet til fremstilling

af intravenøst indgivelige immunoglobuliner.

Desuden kendes fremgangsmåder, ved hvilke immunoglobuliner spaltes ved reduktion af de intramolekylære disulfid-bindinger, og de dannede sulfhydrilgrupper derpå alkyleres.

Man har også allerede forsøgt sulfitolytisk at spalte disulfid-bindingerne i immunoglobulin-molekylet, hvorved der skal anvendes forholdsvis høje koncentrationer af sulfit eller tetrathionat. Anvendelsen af sulfit sammen med Cu-II-ioner fører til dårligt bedømte produkter.

Fra DK-fremlæggelsesskrift nr. 141.432 er det således kendt at fremstille immunoglobulinderivater, der har nedsat antikomplementaktivitet og fremragende antistofaktivitet, under anvendelse af et sulfitolytisk middel, men i fraværelse af cupriioner. Det har nu overraskende vist sig, at ved anvendelse af meget lave koncentrationer af sulfitolytisk middel kan man anvende cupriioner som oxidationsmiddel ved sulfoneringen af immunoglobuliner uden tab af antigenbindingskapacitet. Ifølge DK-fremlæggelsesskrift nr. 141.432 går antigenbindingskapaciteten praktisk taget tabt, når der ved den der anførte fremgangsmåde anvendes cupriioner, og ved fremstilling af immunoglobulinpræparater er formålet netop at bevare antigenbindingskapaciteten.

Den foreliggende opfindelse går ud fra den tanke, at den væsentlige andel af uforenelighedsreaktioner ved indgivelse af handelsgængse gammaglobuliner ad intravenøs vej ikke fremkaldes af gammaglobulin-molekylet selv, men af den fra den native tilstand af immunoglobuliner afvigende struktur.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af human-immunoglobulinpræparater med formindsket komplementaktivitet og god antistofaktivitet, hvorved ved hjælp af sulfitolytiske foranstaltninger dannelsen af komplementbindende strukturer hindres eller allerede foreliggende strukturer ændres i en sådan grad eller fjernes

adsorptivt, at komplementet ikke eller kun lidt er i stand til at binde.

Fremgangsmåden til fremstilling af immunoglobulinpræparaterne er ejendommelig ved, at en på kendt måde ved fraktionering af blodplasma fremstillelig human-immunoglobulinfraktion behandles med mindre end $5 \cdot 10^{-2}$ M/l af et sulfitolytisk middel, i nærværelse af cupriioner i en koncentration på mindre end $5 \cdot 10^{-3}$ M/l og yderligere et i vand tungtopløseligt phosphat.

Som sulfitolytisk middel anvendes i reglen sulfit. Ifølge opfindelsen anvendes imidlertid fortrinsvis et disulfit såsom natrium-disulfit og fordelagtigt en koncentration på 2-4 $\cdot 10^{-3}$ M/liter. Sammen med sulfit kan der anvendes Cu^{2+}-ioner som oxiderende stof, i reglen 1/10 af den til molariteten henførte mængde af det sulfitolytiske middel.

Den temperatur, ved hvilken det sulfitolytiske stof sættes til immunoglobulinopløsningen, er ikke kritisk, blot der ikke foreligger temperaturer meget højere end $50^{\circ}C$. Fremgangsmåden gennemføres fortrinsvis ved en temperatur mellem 5 og $25^{\circ}C$. På trods af dette generelle udsagn skal det fastslås, at temperaturen for så vidt udøver en indflydelse på fremgangsmåden, fordi mindre koncentrationer af reaktionsmidlet er nødvendige ved højere temperaturer.

Også reaktionstiden står i omvendt forhold til koncentrationen af det sulfitolytiske middel. Sulfitolysen af immunoglobulinfraktionen gennemføres i reglen mellem 5-90 timer.

Reaktionen afsluttes ved adskillelse af det sulfitolytiske middel og immunoglobulinerne. Hensigtsmæssigt udfældes hertil immunoglobulinerne. En anden mulighed består f.eks. i fjernelsen af det sulfitolytiske middel ved dialyse.

Det er snarere gunstigere at lade det her omhandlede fremgangsmådetrin efterfølge af yderligere rensnings-

trin, som det er almindelig sædvanligt ved immunoglobulinpræparatfremstilling.

Udgangsmaterialet til fremgangsmåden ifølge opfindelsen er et ifølge teknikkens stade tilgængeligt immunoglobulin. Dette stof er i litteraturen betegnet på forskellig måde også med gammaglobulin, IgG og immunoglobulin G. Det består i overvejende grad af den såkaldte 7 S-fraktion med en molekylvægt på ca. 160.000. Man kan både anvende de fra blanding fraskillelige immunoglobuliner, men også sådanne fra særlig immuniserede donorer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Dette er de såkaldte hyperimmunoglobuliner med overgennemsnitlige høje specifikt mod bestemte antigener rettede antistofindhold. Eksempelvis skal her nævnes fåresyge-immunoglobulin, som udvindes ved udsortering af plasma fra donorer med forhøjede antistoftitere over for fåresyge og efterfølgende oparbejdning til udvinding af immunoglobulinet. De ved den her omhandlede fremgangsmåde egnede udgangsmaterialer kan udvindes på gængs måde ud fra blodplasma, f.eks. ved fraktioneret saltfældning af plasma eller ved fældning med organiske opløsningsmidler, især med ethanol, med de forskellige fremgangsmådevarianter, der går tilbage til de grundlæggende arbejder af Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946), side 449 ff.

Fortrinsvis egnede udgangsmaterialer er en γ-globulinholdig fraktion, der ifølge Cohn benævnes som fraktion II og III eller ifølge Nitschmann som fraktion A. Sådanne fraktioner indeholder foruden γ-globulin yderligere α- og β-globulin samt små mængder albumin. γ-globulinandelen ligger ved 40-80 vægtprocent, henført til mængden af det samlede protein.

Det har vist sig hensigtsmæssigt at opløse en inden for rammerne af en alkoholfraktioneringsrensningsmetode dannet, endnu ikke renset γ-globulinfraktion, i reglen den ved albuminfraktionering dannede pasta, i vand eller i en kun lidt koncentreret, fortrinsvis 0,3-0,9%'s neutralsaltopløsning, såsom kogsalt. Efter opløsning skal proteinet

hensigtsmæssigt foreligge i en koncentration på 0,5-15%, fortrinsvis mellem 1 og 5% (g/rumf.). Til denne opløsning sættes det sulfitolytiske middel ved en pH-værdi mellem 4 og 8, fortrinsvis mellem 5,0 og 6,0, (f.eks. $Na_2S_2O_5$ eller Na_2SO_3) og $CuSO_4$, og herved holdes temperaturen mellem 5 og 50°C.

pH-værdien af reaktionsblandingen kan under reaktionen afvige fra sin udgangsværdi, uden at dette har uheldige resultater. Efter omsætningen med det sulfitolytiske middel tilsættes den derpå fremkomne immunoglobulinopløsning et i vand tungtopløseligt phosphat, hvorpå der eventuelt kan gennemføres en koncentrering og rensning af immunoglobulinerne. Medtagelse af en adsorption i fremgangsmådetrinene for yderligere rensning fører til en yderligere forringelse af komplementbindingen.

Således kan f.eks. i opløsningen fremstilles in situ aluminiumphosphat ud fra $AlCl_3$ og Na_3PO_4. Hertil kan foruden forureninger også komplementbindende aggregater af immunoglobulinet bindes til aluminiumphosphat. Også calciumphosphat kan anvendes til fjernelse af forureninger og komplementbindende stoffer.

5-90 timer efter tilsætningen af de sulfitolytiske midler kan immunoglobulinerne f.eks. udfældes med ethanol på kendt måde.

De herved fremstillelige immunoglobulinpræparater, er på grund af den foretagne partielle sulfitolyse, hvad angår komplementbindingskapaciteten svagere komplementbindende end udgangsmaterialet. Denne effekt kan om ønsket yderligere svækkes ved adsorption af komplementbindende aktivitet.

Uafhængig af samtidigt ønskede rensningsresultater opnås særlig gode resultater hvad angår den formindskede komplementbinding, når sulfitolytisk, i nærværelse af koberioner behandlede, immunoglobulinfraktioner som nævnt behandles med et i vand tungtopløseligt phosphat. Hertil anvendes fortrinsvis aluminiumphosphat eller calciumphosphat.

Hertil er mængder på 0,005-0,1 M/liter gunstige. De adsorberende midler fremstilles hensigtsmæssigt ved tilsætning af en vandopløselig kation og et vandopløseligt phosphat om hvilke det er kendt, at de er i stand til at danne tungtopløselige phosphater med hinanden, i immunoglobulinopløsningen selv. Hertil holdes pH-værdien hensigtsmæssigt mellem 4 og 8,5, hvorved man til adsorption af komplementbindende aktivitet ved hjælp af $AlPO_4$ foretrækker pH-værdier mellem 4 og 6, og ved alkalimetalphosphater, såsom kaliumphosphat, pH-værdier mellem 5,8 og 8,5. Gængse vandopløselige kationer, der er i stand til at danne tungtopløselige bundfald med phosphationer, er aluminium, fortrinsvis som $AlCl_3$ eller $(Al)_2(SO_4)_3$, desuden blandt de vandopløselige jordalkalimetalsalte især vandopløselige calciumsalte, såsom kalciumacetat. Til dannelsen af adsorptionsmidlet i immunoglobulinopløsningen arbejdes der hensigtsmæssigt med et ringe overskud af den kationiske komponent.

Kombineres nu sulfitolysen med et adsorptionstrin som ovenfor beskrevet, kan komplementbindingen af immunoglobulinpræparaterne bringes ned på en særlig lav værdi, ofte nær ved nul. Hvert skridt er imidlertid hver for sig egnet til at nedsætte komplementbindingen af immunoglobulinpræparater.

Da målet for fremgangsmåden består i at formindske komplementbindingen, afstemmes fremgangsmådetrinene så vidt muligt efter hinanden, at de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede produkter tilfredsstiller disse krav.

Det ligger inden for opfindelsen, når fremgangsmåden gennemføres under betingelser, som fagmanden i denne henseende erkender som særlig egnede. Dette vil sige, at en kombination af høje koncentrationer af det sulfitolytiske middel i forhold til lave proteinkoncentrationer kan forbindes med lave temperaturer og en kort reaktionstid inden for de beskrevne rammer og omvendt.

Bestemmelsen af den antikomplementære virkning sker ved et hæmolyseforsøg med sensibiliserede fåreerythrocyter og marsvineserum (komplement). Herved bringes erythrocyterne og komplementet til reaktion med immunoglobulinpræparatet. Efter tilsvarende inkubationstid kan det erkendes, at immunoglobulinpræparatet også i højere koncentrationer praktisk taget ikke påvirker hæmolysen, der kan bestemmes kvantitativt på photometrisk måde. Desuden kan det i et in vivo forsøg på kaniner påvises, at der efter intravenøs indgivelse af det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede immunoglobulinpræparat kun kan fastslås en ubetydelig og forbigående sænkning af komplementspejlet i blodplasma målt ved komplementfaktoren C1.

I en række af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede præparationer ligger komplementbindingen i alt under 10% henført til en 100% standard. Denne værdi er selv efter en opbevaring af præparatet i løbet af ca. 2 år kun uvæsentligt ændret opadtil. Aggregatandelene i immunoglobulinpræparaterne ligger ligeledes under 10%. I en 5%'s proteinopløsning kan der ved anvendelse af $CuSO_4$ påvises <1 µg/ml kobber-II-ioner.

De hvad angår antikomplementaktiviteten formindskede hidtil ukendte γ-globulinpræparater indeholder hovedsagelig uændret 7 S-immunoglobulin i sammenligning med de modificerede præparater ifølge teknikkens stade med undertiden lavere sedimentationsværdier. Antistofaktiviteten af molekylet forbliver bevaret.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede immunoglobulinpræparater er i første linie påtænkt til en intravenøs anvendelse. De svagt sulfitolytisk behandlede og derpå som beskrevet rensede immunoglobuliner kan efter sædvanlig steril filtrering anvendes i vilkårlige mængder. Når det påses, at præparaterne anvendes som 5-16%'s proteinopløsning, er en tilsvarende indstilling af den rensede og sterilfiltrerede opløsning uden videre mulig. En opløsning, der indeholder 0,3-0,9% neutralsalt, der om ønsket yderligere indeholder fysiologisk uskadelige tilsætninger, f.eks. en α-aminosyre, såsom

glycin i en mængde på 1,5-2,5%, kan frysetørres, opbevares som frysetørret produkt og før anvendelsen rekonstitueres som opløsning ved tilsætning af den ønskede mængde destilleret vand. Også denne opløsning udviser ingen forøget komplementbinding. Det rekonstituerede middel kan ligeledes indgives intravenøs.

Opfindelsen skal belyses nærmere ved hjælp af efterfølgende eksempler.

Eksempel 1.

En ved albuminfraktionering ifølge Cohn ved hjælp af ethanol dannet gammaglobulinfraktion opløses i en 0,3% kogsaltopløsning, hvorved der til 1 kg gammaglobulinpasta anvendes 10 liter kogsaltopløsning. Temperaturen holdes ved ca. 5°C. Til opløsningen sættes 0,07% (g/rumfang) $Na_2S_2O_5$ i form af en 10%'s natriumdisulfitopløsning og 0,007% (g/rumfang) $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ i form af en 1%'s kobbersaltopløsning. Efter endt tilsætning tilsættes der pr. liter opløsning 200 ml af en 0,2 molær $AlCl_3$- og 200 ml af en 0,2 molær Na_3PO_4-opløsning. Tilsætningen sker under pH-kontrol, der skal sikre en pH-værdi på ca. 5. Opløsningen omrøres natten over ved 5°C. Aluminiumphosphat-adsorbensen fraskilles derpå ved centrifugering.

Opløsningen, der indeholder immunoglobulinerne, udfældes ved tilsætning af 25% (rumfang/rumfang) ethanol. Bundfaldet fraskilles ved centrifugering. Det opløses i en tilstrækkelig mængde destilleret vand, og der tilsættes 0,2% ethylendiamintetraeddikesyre, og pH-værdien indstilles til 7,0. Ved tilsætning af 25% ethanol fældes immunoglobulinerne på ny og centrifugeres, og bundfaldet opløses i en tilstrækkelig mængde 0,85%'s kogsaltopløsning. Til denne opløsning sættes 2,5% (g/rumfang) glycin. Herpå lyophiliseres præparatet.

Færdiggørelsen til det intravenøst indgivelige immunoglobulin kan foretages på følgende måde: lyophilisatet opløses i destilleret vand, bringes til et proteinindhold på 5%, fyldes i en slutbeholder og lyophiliseres på ny.

Eksempel 2.

En ved albuminfraktionering ifølge Cohn ved hjælp af ethanol dannet gammaglobulinfraktion opløses i en 0,3%,s kogsaltopløsning, hvortil der til 1 kg gammaglobulinpasta anvendes 10 liter kogsaltopløsning. Temperaturen holdes ved ca. $5^{o}C$. Til opløsningen sættes 0,2% (g/rumfang) $Na_2S_2O_5$ i form af en 10%'s natriumdisulfitopløsning og derpå 0,02% (g/rumfang) $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ i form af en 1%'s kobbersulfatopløsning. Efter afsluttet tilsætning tilsættes der pr. liter opløsning under omrøring 120 ml af en 1 molær calciumacetatopløsning og 120 ml af en 1/3 molær sekundær natriumphosphatopløsning. pH-værdien holdes ved $8 \pm 0,1$ med 0,1 molær natriumhydroxidopløsning. Blandingen omrøres i 20 timer ved $5^{o}C$. Efter dette tidsrum fraskilles det dannede calciumphosphat ved filtrering, og den filtrerede immunoglobulinopløsning udvindes.

Den videre oparbejdning af immunoglobulinerne kan gennemføres svarende til eksempel 1.

Patentkrav.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af human-immunoglobulinpræparater med formindsket komplementaktivitet og god antistofaktivitet, kendetegnet ved, at en human-immunoglobulinfraktion behandles med mindre end $5 \cdot 10^{-2}$ M/l af et sulfitolytisk middel, i nærværelse af cupriioner i en koncentration på mindre end $5 \cdot 10^{-3}$ M/l og yderligere et i vand tungtopløseligt phosphat.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at

a) en human-immunoglobulinfraktion bestående af 40 til 80% immunoglobulin og 20 til 60% andre plasmaproteiner i en koncentration på 1-5% protein, i 5 til 90 timer behandles med $2\text{-}4 \cdot 10^{-3}$ M/l $Na_2S_2O_5$ og $2\text{-}4 \cdot 10^{-4}$ M/l $CuSO_4$, ved en pH-værdi på 5-8, og

b) immunoglobulinfraktionen behandles med 0,005-0,15 M/l af et i immunoglobulinopløsningen fremstillet, i vand tungt opløseligt phosphat, hvorpå proteinerne fraskilles, eventuelt under berigelse og rensning af immunoglobulinerne.