

9) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

208 918

Int.Cl.³

3(51) A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(1) WP A 61 K/ 2417 195 (22) 16.07.82 (44) 18.04.84

(1) siehe (72)

(2) GUDDAT, WERNER, DR. DIPL.-CHEM.; HILLGER, KARL, DR. DIPL.-CHEM.; DD;

(3) siehe (72)

(4) DIPL.-JUR. FRITZSCHE E. INSTITUT F. IMPFSTOFFE DESSAU 4500 DESSAU JAHNSTRASSE 8

54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES INTRAVENÖS VERTRÄGLICHEN UNMODIFIZIERTEN HUMANGAMMAGLOBULINS

57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines intravenös verträglichen Humangammaglobulins, bei welchem die komplementaktivierenden Immunglobulinaggregate durch Adsorption an polymeres Humanalbumin in Gegenwart eines wasserlöslichen, ungeladenen, kettenförmigen Polymer entfernt werden. Das Verfahren gestattet eine höhere Ausbeute an intravenös verträglichem Gammaglobulin, weil der Polymeranteil durch die Adsorption der Aggregate gesenkt werden kann und so die Mitfällung von monomeren Immunglobulinmolekülen vermieden wird. Das Verfahren ist vorzugsweise im Bereich der Humanmedizin anwendbar.

Verfahren zur Herstellung eines intravenös verträglichen unmodifizierten Humangammaglobulins

Anwendungsgebiet der Erfindung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines intravenös verträglichen, unmodifizierten Humangammaglobulins, welches mittels Polyethylenglycol in Gegenwart eines Albuminpolymeren von unerwünschten Proteinverunreinigungen befreit wird.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

10 Die humorale Immunität des Menschen beruht darauf, daß im Blut Immunglobuline zirkulieren, die von B-Zellen synthetisiert werden.

15 Immunglobuline oder auch Gammaglobuline sind hochmolekulare Eiweißstoffe, deren Molekülstrukturen entsprechend der auf den Organismus einwirkenden Fremdsubstanzen wie z.B. Viren, Bakterien bzw. deren Stoffwechselprodukte variabel angepaßt sind.

20 Immunglobuline dienen der Abwehr von Fremdsubstanzen, wobei sie in einem komplexen Mechanismus wirken. Von den 5 Klassen der Antikörper sind die der Klasse G von ihrer Menge und Wirksamkeit die wichtigsten. Immunglobulin G hat ein Molekulargewicht von ca. 160 000 Dalton. Das Molekül des Immunglobulin G besitzt einen variablen Teil $F(ab')_2$, der entsprechend der einwirkenden Fremdsubstanz strukturiert ist und einen konstanten Teil (Fc), der wichtige biologische Funktionen im Körper erfüllt wie z.B. die Komplementbindung, die Wechselwirkung mit Rezeptoren auf Zellmembranen, den transplazentaren Transport des Moleküls, katabolische Eigenschaften und
25 die passive kutane Anaphylaxie.

Die Entwicklung der humoralen Immunität wird in den ersten zwei Lebensjahrzehnten ausgebildet und ist am schwächsten zwischen dem 6. und 24. Lebensmonat. Gestört ist die humorale Immunität bei Menschen, die am Antikörpermangelsyndrom leiden oder deren Organismus infolge einer Krankheit oder anderer hoher Belastungen geschwächt ist.

Um die fehlenden Antikörper zu substituieren, die für die Abwehr von Infektionen von größter Bedeutung sind, werden dem Organismus Immunglobuline appliziert.

Es ist bekannt, daß diese Immunglobuline durch Fraktionieren von menschlichem Blutplasma nach der sogenannten Cohn-Methode durch Ethanol-fällung in reiner Form isolierbar sind

Cohn et.al., J.Amer.Chem.Soc., 68, 459 (1946)

Cohn et.al., J.Amer.Chem.Soc., 72, 465 (1950).

Die so gewonnenen Immunglobulin-Präparate können nur intramuskulär appliziert werden, weil während der Fraktionierung Immunglobulin-Aggregate entstehen. Die Aggregate lösen bei intravenöser Applikation eine Reihe von Unverträglichkeitsreaktionen aus, die durch Einwirkung auf das körpereigene Komplementsystem hervorgerufen werden. Die intravenöse Anwendung von Humangammaglobulin ist der intramuskulären vorzuziehen, um einen Abbau der Antikörper im Muskel vor dem Wirksamwerden zu verhindern und um im akuten Krankheitsfalle die therapeutische Wirkung rasch herbeiführen zu können.

Es ist versucht worden, die Intravenösverträglichkeit von Humangammaglobulin durch verschiedene Methoden zu erreichen. Es wurden Methoden angewendet, bei denen durch Zugabe von Enzymen (Pepsin oder Plasmin) die Immunglobulinmoleküle ganz oder teilweise gespalten oder durch Hydrolyse bei pH 4 so verändert wurden, daß eine Aggregatbildung und die damit ausgelöste Komplementaktivierung verhindert wurde.

Weiterhin wurde der gleiche Effekt der Unterdrückung der Aggregatbildung durch chemische Modifikation der Immunglobulinmoleküle mit Propiolacton, durch Sulfonierung von 4 bis 5 intramolekularen Disulfidbrücken oder durch Reduktion von 2 bis 4 intramolekularen Disulfidbrücken und anschließende

Alkylierung mit Jodacetamid erzielt. Durch diese Behandlung wird allerdings die therapeutische Wirkung der Immunglobulinpräparate nachteilig beeinflusst.

5 Die biologische Qualität der Präparate ist gemindert und die biologische Halbwertszeit der Immunglobuline verkürzt.

Ein weiteres zum Stand der Technik gehörendes Verfahren nach welchem intravenös verträgliches Immunglobulin hergestellt wird umfaßt eine Abtrennung der Aggregate durch selektive Adsorption an Kieselsäure oder an Mineralien, bei denen es sich im wesentlichen um Alumosilikate handelt in Gegenwart von Hydroxyethylstärke.

10 Zum Stand der Technik gehören auch Verfahren, die zur intravenösen Anwendung bestimmtes Immunglobulin von dem antikomplementären Aggregatanteil durch wasserlösliche, ungeladene, kettenförmige Polymere in Gegenwart von künstlich zugesetzten hochmolekularen Protein stabilisatoren (Hydroxyethylstärke, Kohlehydrate, Albumin) befreien.

15 Diese Verfahren zeichnen sich dadurch aus, daß die Immunglobulinmoleküle chemisch unverändert bleiben und so ihre volle biologische Wirksamkeit behalten.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Abtrennung der unerwünschten Immunglobulinaggregate vom nativen Immunglobulin unter Zusatz einer möglichst kleinen Menge künstlicher Substrate zu erreichen, indem als letztere lediglich vernetztes polymeres Albumin und ein geringer Zusatz eines indifferenten wasserlöslichen Polymeren eingesetzt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Bei einem bekannten Verfahren zur Gewinnung von intravenös verträglichem Gammaglobulin, bei dem die antikomplementär wirkenden Aggregate mittels Polyethylenglycol 6000 in einer Menge von 4.5 - 7 g/100 ml Lösung einer 3%igen Gammaglobulinlösung ausgefällt werden sollen (GB-PS 1372953), wird keine absolute Abtrennung der Polymeren erreicht. Ursache dafür ist die unzureichende Selektivität des PEG als Fällungsmittel,

wobei auch ein zusätzlich angefügter Fällungsschritt kein aggregatfreies Immunglobulin G liefert.

5 In der Patentschrift DE - 2856939 wird ein besseres Resultat bezüglich der Aggregatfreiheit erzielt, indem neben dem PEG Humanalbumin in einer Konzentration von 0.3 bis 3 Gew.-% der Gammaglobulinlösung zugesetzt wird. Das Albumin bewirkt einen Schutz der nicht aggregierten Immunglobulinmoleküle vor der Ausfällung. Nach Zusatz von 10% PEG werden in einem ersten Fällungsschritt die antikomplementär wirkenden Aggregate ausgefällt und abgetrennt. Der Überstand wird mit 20% PEG versetzt, wobei das Gammaglobulin ausfällt. Der Niederschlag wird in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und steht nach Sterilfiltration zur therapeutischen, intravenösen Anwendung bereit.

15 Es stellt sich die Aufgabe, den aggregierten Immunglobulinanteil mit hoher Selektivität zu entfernen, ohne dabei eine Mitfällung monomerer Immunglobulinmoleküle zu verursachen, wobei eine möglichst geringe Menge an Fremdstoffen zum Einsatz kommen sollte. Das wird mit dem vorgeschlagenen Verfahren erreicht, indem die Gammaglobulinfällung mit PEG in Gegenwart von vernetztem Albumin in Form eines unlöslichen Gels vorgenommen wird. Das polymere Albumin bewirkt dabei eine Bindung der aggregierten Immunglobulinmoleküle durch hydrophobe Wechselwirkung, die schon bei PEG-Konzentrationen von unter 5 Gew.-% eintritt. Durch einfache Filtration ist das mit aggregiertem Immunglobulin angereicherte polymere Albumin abtrennbar.

Ausführungsbeispiel:

30 Zur Herstellung der Gammaglobulinlösung, aus welcher die Aggregate abgetrennt werden sollen, wird steriles Humanplasma in einer ersten Fraktionierungsstufe mit 8 Gew.% Ethanol bei einem pH-Wert von 7.2 bei -3°C versetzt. Dabei fällt die sogenannte Fraktion I nach Cohn aus.

15 Der Überstand wird bei -5°C und einem pH-Wert von 5.8 auf einen Ethanolgehalt von 19 Vol.% gebracht, wobei sich die sogenannte Fraktion II-III absetzt, die in der Hauptsache aus Humangammaglobulinen besteht.

Der Niederschlag wird angelöst. Nach Abtrennen eines Niederschlages, der sich bei pH 5.0 und 8 Vol.% Ethanol bildet, wird aus dem Überstand bei einem Ethanolgehalt von 25 Vol.% und einem pH-Wert von 7.0 bis 7.2 das Gammaglobulin als
5 Niederschlag abgeschieden. Dieser Niederschlag besteht aus mindestens 90% Gammaglobulin.

Dieser Rohniederschlag wird in einem Citratpuffer angelöst und 4 Gewichtsprozent mit Glutaraldehyd vernetztes Humanalbumin als Gel sowie 4 Gew.% PEG 4000 zugesetzt. Nach
10 2-stündigem Rühren wird das Humanalbumin-Gel abgetrennt.

Aus dem Überstand ist das aggregatfreie Humangammaglobulin in bekannter Weise zu gewinnen und als 5%ige Lösung intravenös verwendbar.

Das nach dem beschriebenen Verfahren gewonnene Gammaglobulin
15 ist ein natives Produkt, d.h. die Immunglobulinmoleküle sind gänzlich unverändert und entsprechen damit der im Serum vorliegenden Molekülform. Die geringe Komplementaktivierung sichert eine gute intravenöse Verträglichkeit.

Erfindungsanspruch.

- 5 1. Verfahren zur Herstellung eines intravenös verträglichen unmodifizierten Humangammaglobulins dadurch gekennzeichnet, daß Humangammaglobulin zur intramuskulären Anwendung oder eine Zwischenfraktion der üblichen Fraktionierungsmethoden von Immunglobulinaggregaten befreit werden, indem diese an vernetztes Humanalbumin in Gegenwart eines indifferenten wasserlöslichen Polymeren adsorbiert werden.
- 10 2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Albumin durch Vernetzung der Monomeren mit aus der Proteinchemie bekannten bifunktionellen Substanzen, vorzugsweise mit Glutaraldehyd oder durch Hitzebehandlung, gewonnen wird und in einer Konzentration von 1 - 6 Vol.% als Gel eingesetzt wird.
- 15 3. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß ein pH-Wert von 6 bis 8 eingehalten wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß als Polymer Polyethylenglycol 4000 oder Polyethylenglycol 6000 in einer Konzentration von 3 bis 7 Gew.% eingesetzt werden.