



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **275 463 A1**

4(51) C 07 K 15/06

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 07 K / 319 602 7	(22)	07.09.88	(44)	24.01.90
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Forschungsstelle für Medizinische Biophysikochemie im Gesundheitswesen, Senefelderstraße 26, Berlin, 1058, DD
------	---

(72)	Segal, Jakob, Prof. em. Dr. sc. nat., SU; Dehmlow, Ronald, Dr. rer. nat., DD
------	--

(54)	<b>Verfahren zur Herstellung von Serumeiweißen mit gesteigertem Dipolmoment zu therapeutischen Zwecken</b>
------	--

(55) Eiweiße, therapeutische Zwecke, Halbmoleküle, Wasserstoffbrücken, UV-Strahlung, Säureeinwirkung, thermische Behandlung, Ultraschalleinwirkung, Dipolmoment, Aufspaltung

(57) In einem Verfahren zur Herstellung von Serumeiweißen mit gesteigertem Dipolmoment zu therapeutischen Zwecken werden Verfahrensschritte beschrieben, durch die Serumeiweiße insgesamt oder einzelne von ihnen so behandelt werden, daß aus ihnen Halbmoleküle mit gezielt veränderten physikochemischen Eigenschaften entstehen, wobei die immunologischen Eigenschaften der Ausgangssubstanz voll erhalten bleiben sollen. Im Blutserum bestehen alle Eiweiße aus antiparallel angeordneten Halbmolekülen, deren Dipolmomente sich gegenseitig weitgehend kompensieren und durch eine kleine Anzahl schwacher Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Erfindungsgemäß erfolgt eine selektive Aufspaltung der Moleküle ohne Veränderung der Sekundärstruktur durch UV-Strahlung, durch Säureeinwirkung, durch thermische Behandlung, durch Ultraschalleinwirkung oder durch Kombination der angegebenen Behandlungsarten.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Serumeiweißen mit gesteigertem Dipolmoment zu therapeutischen Zwecken, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Wasserstoffbrücken, die die antiparallel angeordneten Halbmoleküle von Serumproteinen zusammenhalten, gespalten werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch UV-Bestrahlung von Serumeiweißen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die UV-Bestrahlung in einem Wellenbereich von 240 bis 400 nm, vorzugsweise zwischen 250 bis 260 nm, erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch Säureeinwirkung erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Säureeinwirkung bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch thermische Einwirkung erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die thermische Einwirkung in einem Temperaturbereich von 45°C bis 75°C erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1; 2; 3; 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger Säureeinwirkung durchgeführt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1; 2; 3; 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger thermischer Einwirkung erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 1; 4; 5; 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch Säureeinwirkung bei gleichzeitiger thermischer Einwirkung erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Spaltung durch Ultraschalleinwirkung erfolgt oder unterstützt wird.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen von Serumeiweißen zu therapeutischen Zwecken

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es sind eine Vielzahl von Verfahren zum Isolieren von Serumeiweißen aus menschlichem und tierischem Blut bekannt, bei denen die gewonnenen Serumeiweiße dann ihrer Spezifik, d. h. ihrer normalen physiologischen Wirkung entsprechend, eingesetzt werden. Dabei bleiben die Eiweiße in ihrem nativen Zustand erhalten und sind dementsprechend in ihrer therapeutischen Anwendbarkeit begrenzt.

## Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Schaffung eines technologisch einfachen Verfahrens, nach dem abgewandelte Serumproteine mit geringem Arbeits- und Kostenaufwand hergestellt werden können

## Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Serumeiweiße insgesamt, oder einzelne von ihnen in isoliertem Zustand so zu behandeln, daß aus ihnen Halbmoleküle mit gezielt veränderten physikochemischen Eigenschaften entstehen, wobei die immunogenen Eigenschaften voll erhalten bleiben sollen, wodurch schädliche immunologische Folgeaktionen ausgeschlossen werden. Die Anwendung des erfindungsgemäß hergestellten Erzeugnisses erfolgt bei Stasen der Blutzirkulation, bei bakteriellen und viruellen Infektionen und bei anderen Störungen des Zellstoffwechsels. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß die im Blutserum enthaltenen Eiweiße aufgespalten werden. Im Blutserum bestehen alle Eiweiße aus antiparallel angeordneten Halbmolekülen, deren Dipolmomente sich gegenseitig weitgehend kompensieren und die durch eine kleine Anzahl schwacher Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Die Bindungsenergie dieser Brücken liegt in einem anderen Energiebereich als die der anderen Wasserstoffbrücken im Eiweißmolekül. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer selektiven Aufspaltung, ohne daß die Sekundärstruktur, und damit die immunologischen Eigenschaften der Substanz verändert werden. Die erfindungsgemäße Lösung zeichnet sich daraus aus, daß eine Aufspaltung der Serumeiweiße erfolgt, wenn sie einer Strahlung im Ultraviolettbereich ausgesetzt werden. Je nach Dosis und Behandlungsdauer wird ein verschiedener Anteil der vorliegenden Eiweiße in eine physikochemisch neue Struktur umgebildet. Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung der Serumeiweiße wurde in der Ansäuerung im Bereich von pH 2,0 bis 4,0 gefunden. Weiterhin ist auch mittels Erwärmung und/oder Ultraschallbehandlung Aufspaltung der Serumeiweiße festzustellen. Eine Kombination der genannten Faktoren hat sich als

vorteilhaft erwiesen. Dabei ist es unerheblich, ob die Behandlung an frischem menschlichen oder tierischen Vollblut erfolgt, das durch Heparin, Citrat oder ähnliche geeignete Maßnahmen vor Koagulation geschützt sein kann, oder ob frisches bzw. konserviertes Blutplasma oder frisches bzw. konserviertes Blutserum als Ausgangssubstanz eingesetzt wird. Auch Lösungen einzelner Serumproteine, die vorher in bekannter Weise aus Blut abgetrennt wurden, können den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten unterzogen werden. Je nach Dosis und Behandlungsdauer kann ein verschiedener Anteil der in der Ausgangssubstanz vorliegenden Eiweiße in eine physikochemisch neue Struktur übergeführt werden. Da die veränderten Moleküle sich durch ein höheres Dipolmoment von der Ausgangssubstanz unterscheiden, läßt sich das Produkt mit bekannten Methoden wie Ausfällung, Säulentrennung, Elektrophorese u. a. m. auch in reiner Form isolieren. Die in erfindungsgemäßer Weise hergestellten modifizierten Serumproteine sind befähigt, sich an entzündlich veränderten Zellen anzulagern und dem Entzündungsprozeß entgegenzuwirken.

#### Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

1. 50 ml Vollblut, das durch Citrat vor Koagulation geschützt wurde, wurde durch eine Quarzküvette gepumpt und dabei der UV-Strahlung eines Niederdruckstrahlers über einen Zeitraum von 5 min ausgesetzt. Der Wellenbereich wurde mit  $\lambda = 250 \text{ nm}$  gewählt. Dabei wurden etwa 6% gespaltene Albuminmoleküle hergestellt, die eine hohe Stabilität aufwiesen und ein gegenüber der Ausgangssubstanz ein um ein mehrfaches erhöhtes Dipolmoment aufwiesen.
2. Zusätzlich zum Beispiel 1 erfolgte die Bestrahlung bei gleichzeitigem Rühren. Dabei stieg die Gesamtmenge der gespaltenen Albuminmoleküle gegenüber Beispiel 1.
3. Die gleiche Verfahrensweise wie im Beispiel 1 wurde unter Verwendung von frischem und konzentriertem Blutserum praktiziert. Die Ausbeute an gespaltenen Albuminmolekülen konnte weiter erhöht werden.
4. Der Verfahrensablauf nach Beispiel 1 wurde mit verschiedenen konzentrierten Humanalbuminlösungen durchgeführt. Es wurden Konzentrationen von 2%, 5% und 10% mit gutem Erfolg eingesetzt.
5. 5 ml Vollblut oder frisches oder konserviertes Blutserum wurden einer Säurebehandlung unter Verwendung von HCl,  $\text{pH} = 2,8$ , über einen Zeitraum von 5 min ausgesetzt. Wie im Beispiel 1 konnten gespaltene Albuminmoleküle nachgewiesen werden.
6. In einer weiteren Verfahrenserprobung wurde eine 5%ige Albuminlösung einer Erwärmung von  $65^\circ\text{C}$  ausgesetzt. Wie im Beispiel 1 konnten gespaltene Albuminmoleküle nachgewiesen werden.

Eine Kombination der einzelnen Behandlungsarten, beispielsweise UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger Erwärmung oder Ansäuerung auf Werte zwischen  $\text{pH} 2$  bis  $\text{pH} 4$ , sind ebenfalls ohne nachteilige Wirkungen auf Verfahrensablauf und -ergebnisse geblieben.