



PATENTSCHRIFT 143 730

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

			Int. Cl. ³
(11)	143 730	(44)	10.09.80
(21)	AP A 61 K / 212 783	(22)	10.05.79
(31)	23336 A/78	(32)	12.05.78
		(33)	IT
		(51)	A 61 K 37/56

(71) siehe (73)

(72) Marconi, Walter; Bartoli, Francesco; Gianna, Roberto; Morisi, Franco; Spotorno, Giuseppina, IT

(73) Snamprogetti S.p.A., Milan, IT

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin, Wallstraße 23/24

(54) Verfahren zur Herstellung eines Mittels zur Verringerung des Phenylalaningehaltes

(57) Der Phenylalaningehalt im Blut oder einem anderen Medium kann wesentlich verringert und sogar völlig ausgeschaltet werden, indem man das Blut oder das sonstige Medium durch eine Masse aus porösen Fasern leitet, in denen das Enzym Phenylalaninammoniaklyase eingeschlossen ist, wobei die Fasern, soweit notwendig, vorher biologisch verträglich gemacht worden sind.

212783 - 1 -

Mittel zur Verringerung des Phenylalaningehalts im Blut

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Mittel, das imstande ist, den Gehalt an Phenylalanin im Blut zu verringern oder die Phenylalanin-Konzentration in einem phenylalaninhaltigen Medium zu verringern.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß Phenylalanin eine essentielle Aminosäure ist. Diese Aminosäure spielt jedoch nicht nur eine Rolle bei der Synthese von Proteinen, sondern sie ist auch zusammen mit Tyrosin die Grundsubstanz für die Synthese von Brenzcatechinaminen, Adrenalin, Schilddrüsenhormonen (Trijod- und Tetrajodthyrosin) und dem physiologischen Pigment Melanin.

Die erste Stufe für die Bildung dieser Substanzen ist die Oxidation von Phenylalanin und Tyrosin, die in der Leber durch die Einwirkung von Phenylalanin hydroxylase stattfindet.

Die Blockierung dieser enzymatischen Reaktion führt zu einer Ansammlung von Phenylalanin im Blut. Dadurch wird ein alternativer katabolischer Weg eingeschlagen, der nach Transaminierung von Phenylalanin zu Phenylbrenztraubensäure zu Phenylelessigsäure führt, die durch die Harnwege ausgeschie-

212783

-2-

23.8.1979

AP A 61 K/212 783

(55 474/11)

den wird.

Eine derartige metabolische Blockierung ist in der Medizin als Phenylketonurie oder Phenylbrenztraubensäurekrankheit oder auch als Föllingsche Krankheit bekannt. Dabei handelt es sich um eine angeborene, erbliche Krankheit, die einfach rezessiv vererbt wird und die ohne Unterschied beide Geschlechter befällt, insbesondere in nordeuropäischen Ländern. Sie führt zu einer Verzögerung der geistigen Entwicklung, zu Krämpfen, Ekzemen und fehlerhafter Hauptpigmentierung.

Ein zu hoher Gehalt an Phenylalanin verändert andererseits den Metabolismus sowohl von Tryptophan als auch Tyrosin.

Die Oxidation von Tryptophan wird gehindert unter gleichzeitiger Aufspaltung des Indolringes und Bildung von Formylkynurein bzw. Hydroxylierung zu 5-Hydroxytryptophan und Decarboxylierung dieser Verbindung zu 5-Hydroxytryptamin.

Tryptophan muß so einen weiteren metabolischen Weg zur Verfügung haben, der die Ausscheidung von Indolbrenztraubensäure, Indolmilchsäure und Indollessigsäure durch die Harnwege in Mengen umfaßt, die zwanzigmal höher liegen als bei gesunden Personen.

Ein Überschuß an Phenylalanin hemmt die Tyrosinase und damit die Bildung von Melanin.

Phenylbrenztraubensäure hemmt andererseits mindestens teilweise die Oxidation von Tyrosin zu Gentisinsäure und

212783 -3-

23.8.1979

AP A 61 K/212 783

(55 474/11)

die Bildung von Brenzkatechinaminen aufgrund der Hemmung der Dopa-decarboxylase.

Die Pathogenese der geistigen Störungen ist vermutlich weniger einer direkten toxischen Wirkung von Phenylalanin auf den zerebralen Metabolismus zuzuschreiben, als der verminderten Produktion von neurohumoralen Substanzen, die für eine normale Entwicklung der Hirnfunktionen wichtig sind, wie Serotonin und Brenzcatechinamine.

Die bisherige Behandlung besteht lediglich in einer Diät. Es wird eine phenylalaninarme Diät angewandt, bei der der Gehalt an Phenylalanin im allgemeinen unter 10 bis 30 mg/kg und Tag gehalten werden muß. Zu diesem Zwecke werden Proteinhydrolysate mit einem geringen prozentualen Phenylalaningehalt angewandt.

Einige Autoren vermuten, daß die Ausschaltung von Phenylalanin die Entwicklung von Leukämiezellen verringern kann. Es wäre theoretisch möglich, den Phenylalaningehalt im Blut zu verringern. Tatsächlich gibt es ein Enzym, die Phenylalanin-ammoniaklyase, die Phenylalanin zu Zimtsäure und Ammoniak umwandelt. Es ist jedoch leider nicht möglich, ein derartiges Enzym direkt in den Blutkreislauf einzuführen, da dieses Enzym einen stark antigenen Charakter besitzt, der nach ein oder zwei Verabreichungen zu einer schnellen Ausschaltung des Enzyms führt (s. z.B. R.R. Fritz, D.S. Hodgins und C.W. Abell in J. of Biol. Chem. Bd. 251, S. 4646, 1976). Diese Autoren haben das Enzym an Versuchstiere verabreicht und es hat sich gezeigt, daß die bei der ersten Verabreichung erzielten Halbwertszeiten (22 Stunden) bei anschließenden Verabreichungen wesentlich kürzer werden. Gleichzeitig wird das Vorhandensein

21 27 83

-4-

23.8.1979

AP A 61 K/212 783

(55 474/11)

eines Antikörpers, der für dieses Enzym spezifisch ist, beobachtet.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Mittels, mit Hilfe dessen der Phenylalanin Gehalt im Blut oder anderen Medien auf einfache Weise verringert werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Phenylalanin-ammoniaklyase bzw. -aminolyase in geeigneter Form in den Blutkreislauf einzuführen.

Erfindungsgemäß ist Phenylalaninammoniaklyase in porösen Fasern aus Cellulosetriacetat eingeschlossen, die biologisch verträglich gemacht worden sind, wobei die Fasern durch Zugabe eines die Plättchenaggregation verhindernden Mittels biologisch verträglich gemacht worden sind.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Verringerung des Phenylalanin Gehaltes im Blut oder einem anderen Phenylalanin enthaltenden Medium, derart, daß man das Blut oder das Medium mit einem Mittel zusammenbringt, bestehend aus dem Enzym Phenylalaninaminolyase, das in porösen Fasern aus Cellulosetriacetat eingeschlossen ist, die biologisch verträglich gemacht worden sind.

Es hat sich nun gezeigt, daß es möglich ist, das Enzym im Blutkreislauf von Patienten auszunutzen, die an Phenylketonurie leiden, ohne daß das Enzym-Abstoßungs-Phänomen beobachtet wird aufgrund einer langen Verweildauer des Enzyms im Blutkreislauf.

21 27 83

-5-

23.8.1979

AP A 61 K/212.783

(55 474/11)

Das Enzym wurde entsprechend dem in der IT-PS 836 462 angegebenen Verfahren in porösen Fasern aus Cellulosetriacetat immobilisiert, die durch Zusatz eines die Plättchenaggregation verhindernden Mittels wie 4,5-Diphenyl-2-bis(2-hydroxyäthyl) aminoaxazol zu der polymeren Phase biologisch verträglich gemacht worden sind. Auf diese Weise erhält man ein Mittel, das es erlaubt, die Konzentration an Phenylalanin, die im Blut vorhanden ist zu regulieren, ohne den Proteinkatalysator (in freier Form) in direkten Kontakt mit dem Blut zu bringen.

Außerdem werden durch das hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen die Diffusionswirkungen weitgehend verringert, d.h. die Schnelligkeit, mit der das Substrat an die Katalysatorstellen gelangt (erhöht).

Das so hergestellte Material ist biologisch verträglich, d.h. es kann angewandt werden, ohne daß Probleme wie eine Plättchenadhäsion, Bildung von Thromben o.ä. auftreten.

Schließlich kann das Produkt zur Behandlung von Proteinhydrolysaten angewandt werden, die als Nahrungsmittel verwendet werden, um den Phenylalanin Gehalt auf einen Bereich zu verringern, wie er bei Patienten mit Phenylketonurie toleriert werden kann.

Bisher umfaßte die Herstellung von Nahrungsmitteln, die für Patienten mit Phenylketonurie geeignet sind, mühsame chromatographische Trennungsstufen von Proteinhydrolysaten und die anschließende Rekonstituierung eines entsprechenden proportionalen Gemisches, von dem das Phenylalanin ausgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu ist es erfindungsgemäß möglich, Phenylalanin von Proteinhydrolysaten durch einfache Behandlung dieser Hydrolysate mit den oben erwähnten Fasern zu entfernen.

21 27 83 -6-

23.8.1979

AP A 61 K/212 783

(55 474/11)

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Zu einer Lösung aus 20 g Cellulose-triacetat und 7g 4,5-Diphenyl-2-bis(2-hydroxyäthyl)aminooxazol in 930 ml Methylenchlorid wurden bei 2 °C 140 ml einer Lösung von Phenylalaninammoniaklyase in einem Trispuffer (0,05 m HCl, pH 7,5) enthaltend 30 % Glycerin, gegeben. Die Enzymlösung war erhalten worden durch Extraktion des Enzyms von Rhodotorula glutinis und Reinigung durch Ausfällen mit Protaminsulfat, Ammoniumsulfat und Natriumcitrat bis auf eine spezifische Aktivität von 2,1 $\mu\text{Mol/min mg Protein}$.

Die Aktivität der Lösung betrug 113 Einheiten/ml.

Durch Rühren wurde eine Emulsion erhalten, die dann unter Stickstoffdruck durch eine Spinddüse in ein Koagulationsbad aus Toluol extrudiert wurde. In dem Toluolbad entstand durch Koagulation des Polymers eine Faser, die auf Trommeln aufgenommen und zur Entfernung des Lösungsmittels mit Stickstoff behandelt wurde.

2 g der Faser wurden dann als Wickel in ein Nylonrohr mit einem Innendurchmesser von 7 mm und einer Länge von 500 mm eingebracht. Die Wände des Nylonrohrs waren vorher, nach dem in der DE-OS 28 33 072 beschriebenen Verfahren behandelt worden, um sie nicht-thrombogen zu machen.

212783 -7-

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Mittels zur Verringerung des Phenylalaningehalts im Blut oder anderen phenylalaninhaltigen Medien, gekennzeichnet dadurch, daß Phenylalaninammoniaklyase in porösen Fasern aus Cellulose-triacetat eingeschlossen wird,, die biologisch verträglich gemacht worden sind.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Fasern durch Zugabe eines die Plättchenaggregation verhindernden Mittels biologisch verträglich gemacht worden sind.