



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 39/395



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

628 518

⑳ Gesuchsnummer:	7767/76	㉚ Inhaber:	Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt a.M. (DE)
㉒ Anmeldungsdatum:	17.06.1976		
㉔ Priorität(en):	18.06.1975 DE 2527064	㉚ Erfinder:	Dr. phil. nat. Wolfgang Stephan, Dreieichenhain (DE)
㉖ Patent erteilt:	15.03.1982		
㉘ Patentschrift veröffentlicht:	15.03.1982	㉚ Vertreter:	Bovard & Cie., Bern

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von intravenös verträglichem Nativ-Human-Immunglobulin mit natürlicher Halbwertszeit.**

⑤⑦ Humanplasma oder -serum wird während 30 min bis 4 h auf 50 - 60°C erwärmt und anschliessend fraktioniert. Das erhaltene Endprodukt zeigt gegenüber dem Ausgangsmaterial unveränderte Antikörperaktivität.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von intravenös-verträglichem Nativ-Human-Immunglobulin mit natürlicher Halbwertszeit und gegenüber dem Ausgangsmaterial unveränderter Antikörperaktivität durch Fraktionierung von vorbehandeltem Humanplasma oder -serum, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorbehandlung in einem Erhitzen des Humanplasmas oder -serums während $1\frac{1}{2}$ –4 h auf 50–60°C besteht, wobei die antikomplementäre Aktivität verursachenden Proteinmoleküle durch Molekülvergrößerung ausfällbar werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorbehandlung in einem Erhitzen des Humanplasmas oder -serums während 2 h auf 56°C besteht.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von für die intravenöse Anwendung geeignetem Gammaglobulin aus Humanplasma, das ohne modifizierende Verfahren erhalten werden kann.

Es ist bekannt, dass man durch Fraktionierung ein Gammaglobulin herstellen kann, das die Eigenschaft hat, unspezifisch Komplement zu fixieren (Barandun, S. «Die Gammaglobulin-Therapie», S. Karger-Verlag, Basel 1963). Diese antikomplementäre Aktivität wird mit dem Entstehen von Aggregaten in Beziehung gebracht. Unspezifisch komplementfixierendes Gammaglobulin ist für eine intravenöse Anwendung nicht geeignet, sondern lediglich für eine intramuskuläre Anwendung. Da die Antikörper-Wirksamkeit aber bei einer intravenösen Anwendung vollständiger ist und vor allem sofort eintritt, hat es nicht an Versuchen gefehlt, intravenös verträgliche Gammaglobulin-Präparate herzustellen.

Bekanntlich besteht die biologische Funktion der Antikörper in der Elimination von Bakterien und Viren sowie in der Neutralisation von Toxinen. Der antigenbindende Teil (Fab.-Teil) des Antikörpermoleküls sorgt dabei zunächst für die Erkennung und Neutralisation von Erregern. Der entstehende Antigen-Antikörper-Komplex bewirkt eine Aktivierung des komplementbindenden Teils (Fc-Teil) des Moleküls. Dadurch werden eine Reihe von immunologischen Folgereaktionen in Gang gesetzt, deren wesentlichste die Phagozytose und die spezifische Aktivierung des Komplementsystems sind. Die spezifische Aktivierung des Komplementsystems, die man klar von der unspezifischen (antikomplementäre Wirkung) unterscheiden muss, bewirkt bei bakteriellen Infektionen eine Bakteriolyse. Als weitere Folge der Komplementaktivierung werden Anaphylatoxine und chemotaktische Faktoren «dosiert» freigesetzt. Die Anaphylatoxine sorgen durch Erhöhung der Gewebedurchlässigkeit für eine gesteigerte Antikörperkonzentration am Ort der Infektion, während die chemotaktischen Faktoren die Phagozytose unterstützen. Somit kommt bei der Infektabwehr dem Fc-Teil des Immunglobulin-G-Moleküls eine übertragende Bedeutung zu. Klinisch von besonderer Bedeutung ist die in vivo Halbwertszeit der in intravenösem Gammaglobulin enthaltenen Antikörper. Je länger die in vivo Halbwertszeit ist, umso länger kreisen die zugeführten Antikörper im Blut und umso länger stehen sie für eine prophylaktische Wirksamkeit zur Verfügung. Dies ist von entscheidender Bedeutung bei Krankheiten, in deren Verlauf der Organismus nicht in der Lage ist, Antikörper zu bilden. Man ist hier gezwungen, die Antikörper laufend zuzuführen. Je weniger oft dies notwendig ist, umso einfacher ist insbesondere eine ambulante Behandlung durchzuführen.

Es sind auch bereits Verfahren bekannt, um aus unspezifisch komplementfixierendem Human-Standard-Gammaglobulin ein intravenös verträgliches Präparat herzustellen. Diese Verfahren beruhen darauf, dass das durch herkömmliche Fraktionierungsverfahren wie die Cohnsche Alkoholfractionierung oder die Rivanol-Ammonsulfat-Fraktionierung gewonnene, unspezifisch komplementfixierende Human-Standard-Gammaglobulin hydrolytisch bzw. enzymatisch in die einzelnen Fragmente gespalten und so die unspezifische Komplementfixierung beseitigt bzw. die antikomplementäre Aktivität durch chemische Modifizierung durch β -Propiolacton beseitigt wird. Es sind dies im einzelnen folgende Verfahren:

Pepsin-Abbau (Schultze, H. E. und Schwick, C. t. Dtsch. med. Wochenschrift, 87, 1643 [1962].

Pepsin-Abbau (Barandun, S. et al.: Vox Sang. 28, 157 [1975]).

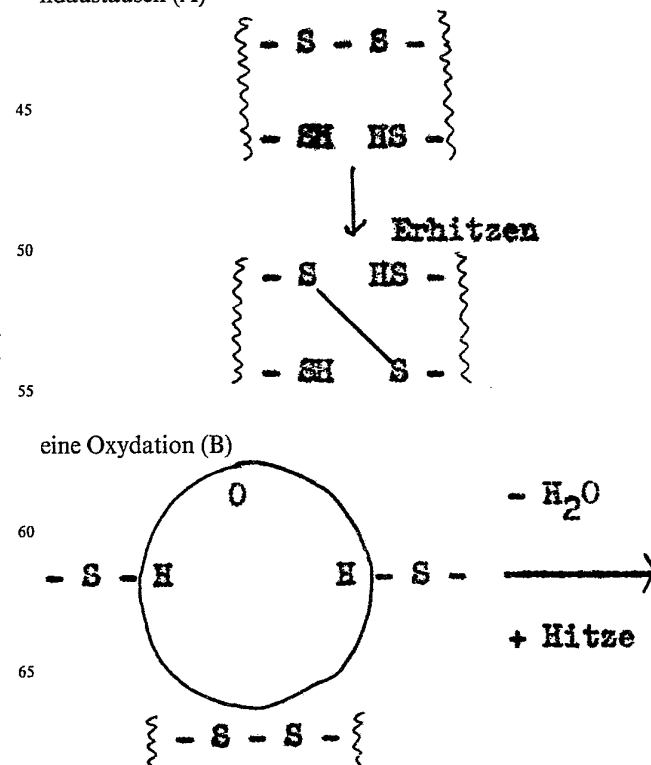
HCl-Behandlung (Barandun, S. et al.: Vox Sang. 7, 187 [1962]).

β -Propiolacton-Behandlung (Staphan, W.: Z. klin. Chem. klin. Biochimie 7, 282 [1969]).

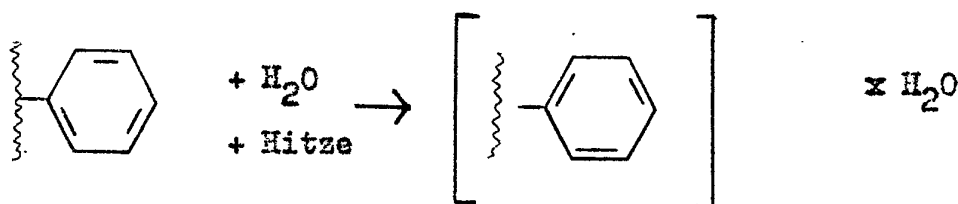
Betrachtet man die Halbwertszeiten, so liegen die Halbwertszeiten aller bekannten Präparate unter der natürlichen Halbwertszeit von 18–22 Tagen. Dies liegt an der drastischen Molekülveränderung durch den enzymatischen Abbau: Es entstehen Antikörper-Bruchstücke, die eine hohe Eliminationsgeschwindigkeit haben. Die gezielte chemische Modifizierung durch β -Propiolacton liefert ein deutlich besseres Produkt mit einer Halbwertszeit von 15 Tagen. Das erfindungsgemäße Ziel wird dadurch jedoch noch immer nicht erreicht: Die Isolierung und Ankonzentrierung menschlicher Immunglobuline mit natürlicher, unveränderter Halbwertszeit von 18–22 Tagen, frei von antikomplementärer Aktivität und daher intravenös anwendbar.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass sich ein intravenöses Immunglobulin mit natürlicher Halbwertszeit und frei von antikomplementärer Aktivität aus Humanplasma oder -serum herstellen lässt.

Gegenstand der Erfindung ist das im Patentanspruch definierte Verfahren. Bei dieser Behandlung findet ein Disulfidaustausch (A)



und eine Hydratisierung von hydrophoben Resten (aromatische Reste, aliphatische Ketten) (C)



statt.

Die günstigen Eigenschaften des erfindungsgemäss hergestellten Produktes wurden durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen belegt, die mit einer 5%igen Lösung durchgeführt wurden.

1. Klinische Verträglichkeit

Es wurden 36 Patienten, davon 12 Erwachsene und 24 Kinder, jeweils einmal mit einer Dosis von 0,1–0,5 ml/kg behandelt. Davon hatten 2 Patienten das Antikörpermangel-syndrom, Typ Bruton. Solche Patienten sind bekanntlich ge-

genüber intravenösem Gammaglobulin besonders empfindlich. Das Präparat wurde in allen Fällen reaktionslos vertragen.

2. Antikomplementäre Aktivität

Der antikomplementäre Titer ist nicht höher als maximal 1 : 5, verglichen mit der NaCl-Kontrolle beim Hämolysetest nach Kabat und Mayer, und entspricht weitgehend dem handelsüblichen intravenösen Immunglobulin verschiedener Herstellung.

Auszug aus einem Protokoll über eine Komplementbestimmung:

Probe	ml Kompl. je 10 ml Probe	2	4	6	8	10	12	14	16	18
Plasma		≠ ≠	+	–	–					
IgG I		≠ ≠ ≠ ≠	≠ ≠ ≠ ≠	–	–	–	–	–	–	–
IgG II		≠ ≠ ≠ ≠	≠ ≠	+-	–					≠ ≠ ≠ ≠

Erläuterung:

– totale Hämolyse: keine antikomplementäre Aktivität

≠ ≠ ≠ ≠ keine Hämolyse: antikomplementäre Aktivität

≠ ≠ 50% Hämolyse

IgG I: Cohn-Fraktion II aus Nativ-Plasma (Reinheitsgrad über 95%).

IgG II: Cohn-Fraktion II aus erhitztem Plasma (Reinheitsgrad über 95% Immunglobulin C).

3. Antikörper-Aktivität

	Röteln	Masern
reziproke Titer im Hämogglutinationstest		
Plasma	64	32
Immunoglobulin gemäss Erfindung	512	128

Ankonzentrierungsfaktor etwa 4–8 (wie rechnerisch ermittelt).

4. Halbwertszeit

Halbwertszeitbestimmung nach der Doppel-Markierungsmethode mit ^{125}J und ^{131}J im Vergleich mit intramuskulärem Standard-Immunglobulin (Mc. Farlane, A. S.: Nature, London 182, 53 [1958]).

Es wurde ein Wert von 20 Tagen gefunden (natürlicher Bereich 18–22 Tage).

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter erläutert:

Beispiel 1

1 Liter Human-Citratplasma aus einem 1000-Spender-Pool wurde 2 Stunden auf 56 °C erhitzt. Anschliessend wur-

de abkühlengelassen, ausgefällt und dann aus der Ausfällung durch übliche Fraktionierverfahren wie z. B. die Cohnsche Alkoholfraktionierung (Kistler, P. et al.: Vox Sang. 7, 414 [1962]) oder die Rivanol-Ammon-Sulfat-Fraktionierung (Horajsi, J. et al.: Acta med. Scand. 155, 65 [1956]) die Gammaglobulin-Fraktion abgetrennt und damit eine 5gew.-%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Beispiel 2

Anstelle von Citratplasma wurde ACD-Plasma, das einen dextrosehaltigen Citratstabilisator enthält, oder Serum als Ausgangsmaterial verwendet und wie in Beispiel 1 gearbeitet.

Beispiel 3

Es wurden Reihenversuche durchgeführt, bei denen die Erhitzungsdauer zwischen $\frac{1}{2}$ und 4 Stunden und die Temperaturen zwischen 50 und 60 °C verändert wurden, mit den Ausgangsmaterialien der Beispiele 1 und 2. Dabei zeigte sich, dass für kleine Laboransätze unter 1 Liter kurze Erhitzungsdauer bei niedriger Temperatur, bei Ansätzen im technischen Massstab, d. h. etwa von 10 bis 1000 Liter, jedoch eine längere Erhitzungsdauer bei höherer Temperatur aus Gründen des volumenabhängigen Wärmeausgleichs optimal sind.