

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 148633 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 4737/79

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 15/00
A 61 K 37/04

(22) Indleveringsdag: 08 nov 1979

(41) Alm. tilgængelig: 10 maj 1980

(44) Fremlagt: 19 aug 1985

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 09 nov 1978 DE 2848529

(71) Ansøger: *BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; Marburg/Lahn, DE.

(72) Opfinder: Horst *Schwinn; DE, Norbert *Helmburger; DE, Bernd *Herchenhan; DE, Gerhard Kump; DE

(74) Fuidmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af det i kulden
uopløselige globulin (CIG)

(57) Sammendrag:

4737-79

Det i kulden uopløselige globulin (CIG) fremstilles ved, at man til et faktor VIII-koncentrat, der indeholder globulinet, ved en temperatur over 18°C sætter 1,8-2,6 mol pr. liter af en godt vandopløselig alifatisk aminosyre og 8-12% (vægt/rumfang) neutralsalt, skiller den ovenstående væske fra den fremkomne fældning og i denne på ny forøger koncentrationen af neutralsaltet, hvorved CIG'et udfældes.

CIG-produktet kan anvendes i lægemidler til parenteral indgivelse, især til chokterapi.

DK 148633 B

0

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af det i kulden uopløselige globulin (CIG) ud fra faktor VIII-koncentrater, især fremstillet af blodplasma, ved hvilken man til et faktor VIII-koncentrat, der indeholder dette globulin, sætter en godt vandopløselig aliphatisk aminosyre.

Det i kulden uopløselige globulin (= "cold insoluble globulin", CIG) har som et i plasma forekommende protein i længere tid været beskrevet i litteraturen under navnene "large external transformation-sensitive protein" = LETS, "soluble fibroblast antigen" = SF, "cell surface protein" = CSP, "cell adhesion factor" = CAF eller fibronectin, og som bestanddel af overfladerne af fibroblaster.

Det er allerede kendt, at dette protein kan udvindes af Cohn I-fraktionen eller af kryopræcipitatet fra ACD (Acid Citric Dextrose)-plasma i præparative mængder, jfr. Mosesson, M.W. und Umfleet, R.A., J. Biol. Chem., 245, 5728 (1970). Forfatterne går herved ud fra et udgangsmateriale, som ved siden af andre i kulden uopløselige sporproteiner hovedsageligt indeholder fibrinogen (80-85%) og CIG (max. 10%).

Problemet ved fremstillingen af CIG beror i første række på fraskillelsen fra fibrinogenet, som med hensyn til fældnings- og fraktioneringsegenskaberne minder meget om CIG. Denne fraskillelse er blevet forsøgt af Mosesson, jfr. ovenfor, ved en fraktionering med glycin/ethanol ved lavere temperaturer.

Det på denne måde koncentrerede protein indeholder imidlertid stadig ca. 50% fibrinogen, som først kan fjernes i tilstrækkelig grad ved et efterrindskudt ionbytningstrin.

Det er endvidere kendt, at de kommercielt fremstillede faktor VIII-koncentrater, i vid udstrækning uafhængigt af oprindelse og fremstillingsmetoder, indeholder fibrinogen og CIG i forholdsvis høje koncentrationer og forskellige forhold som ledsageproteiner.

0

Det har nu overraskende vist sig, at det er muligt at fremstille CIG med høj renhed ud fra dette CIG indeholdende, fibrinogenfattige faktor VIII-koncentrater under anvendelse af få fraktioneringstrin. Herved fremkommer der på den ene side CIG og på den anden side faktor VIII.

5

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af i kulden uopløseligt globulin (CIG) ud fra dette globulin indeholdende, med fordel fibrinogenfattige faktor VIII-koncentrater, hvilken fremgangsmåde er af den ovenfor angivne art, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man ved en temperatur over 18°C tilsætter aminosyren i en koncentration på 1,8-2,6 mol pr. liter, hvorefter man tilsætter 8-12% (w/v) neutralsalt, skiller den ovenstående væske fra den fremkomne fældning og i væsken forøger koncentrationen af neutralsaltet til en koncentration på 16-33% (w/v), hvorved CIG'et udfældes, idet man eventuelt til yderligere koncentration af CIG-et optager fældningen i en pufferopløsning og igen fælder under de ovenfor angivne betingelser.

15

Ved denne fremgangsmåde kan der også samtidig ud fra det samme udgangsmateriale fremstilles CIG-frit faktor VIII-koncentrat og CIG.

20

Udvælgelsen af det egnede udgangsmateriale sker på basis af bestemmelsen af CIG'et, f.eks. ifølge Mosesson og Umfleet, J. Biol. Chem., 245, 5728 (1970), af faktoren VIII, f.eks. ifølge proctor, M. and Rapaport, O., Am. J. Clin. Path., 36, 212 (1961), og af fibrinogenet, f.eks. ifølge Clauss, A., Acta Haemat., 17, 237 (1957).

25

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen går man ud fra CIG-indeholdende faktor VIII-koncentrater, fortrinsvis fra fibrinogenfattige faktor VIII-koncentrater, navnlig sådanne, der indeholder 0-2 mg fibrinogen pr. 20 enheder faktor VIII.

30

Egnede faktor VIII-koncentrater er plasmoproteinfractioner, der er berigede med faktor VIII. De kan f.eks. fås ved kryopræcipiteringsmetoden eller ved fældningsmetoder med

35

0

aminosyrer og kan om ønsket frysetørres.

Eksempelvis kan et frysetørret faktor VIII-koncentrat opløses i en 0,02-0,12 M puffer, fortrinsvis citrat-NaCl-puffer, 0,08 mol/liter, med en pH-værdi på 6,0-8,0, 5 fortrinsvis 6,9, i en koncentration på 0,2-20%, fortrinsvis 1%, beregnet protein.

Ved en temperatur over 18°C, dog begrænset af denatureringen ved høje temperaturer, fortrinsvis ved 20-25°C, tilsættes der 1,8-2,6, fortrinsvis 2,2 mol pr. liter af en 10 godt vandopløselig aliphatisk aminosyre, f.eks. glycin, α - eller β -alanin, hydroxyprolin, prolin, glutamin eller α -, β - eller γ -aminosmørsyre, ifølge opfindelsen fortrinsvis glycin, og 8-12%, fortrinsvis 12% (w/v) neutralsalt, især NaCl, i fast tilstand. Fældningen skilles fra, idet den 15 fortrinsvis fraskilles ved centrifugering, og den kan om ønsket videreanvendes til faktor VIII-fremstilling.

Den ovenstående væske bringes med neutralsalt og på et saltindhold på 16-33% (w/v), fortrinsvis 17%. Egnede neutralsalte er ammoniumsalte eller fortrinsvis alkalimetahalogenider med tilstrækkelig opløselighed i vand. 20

Bundfaldet udvindes som ovenfor beskrevet. Til yderligere koncentrering kan det optages i en til udgangsrumfanget svarende eller mindre mængde pufferopløsning, fortrinsvis en opløsning af den nævnte citratpuffer, hvorpå den 25 ovenfor beskrevne fældningsprocedure gentages.

Afhængigt af den ønskede renhed af produktet kan dette fældningstrin gentages flere gange, men det kan også udelades. Slutproduktet skal mindst indeholde 60% CIG, beregnet på protein, og være frit for med thrombin koagulerbart protein. Renheden af slutproduktet kontrolleres ved de 30 gængse proteinanalytiske metoder, såsom polyacrylamid-elektroforese eller immunoelktroforese under anvendelse af standarder eller specifikke antisera, med henblik på ledsagende gammaglobulin og fibrinogen.

35 CIG er et værdifuldt lægemiddel. Det kan især anven-

0

des til chokterapi. Eksperimentelt kan dette vises på tre dyremodeller:

- a) ved den passiv-kutane anafylaksi-reaktion hos marsvin,
5 b) ved endotoksinchok med lipopolysaccharid hos katte og
c) ved histaminchok hos marsvin.

Med en intravenøs indgivelse af 10 mg CIG pr. kg før eller efter fremkaldelsen af choktilstanden kan chokvirkningen formindskes, og den til chokudløsning nødvendige dosis af histaminet eller endotoksinet andrager ca. det 3-dobbelte af kontrollen.

CIG anvendes som lægemiddel på i og for sig kendt måde i form af et præparat til parenteral, fortrinsvis intravenøs indgivelse. Det foreligger her i en koncentration på ca. 10 mg pr. ml i en vandig opløsning eller på tørret, fortrinsvis frysetørret form. Til stabilisering af CIG-aktiviteten anvendes der hensigtsmæssigt tilsvarende tilsætninger af carbonhydrater, i vand godt opløselige aminosyrer og puffersalte såsom glucose, glycin og Na-citrat. Præparatet er også egnet til forøgelse af den opsonerende virkning af fagocyterende celler.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

25

Eksempel 1

Fibrinogenfattigt faktor VIII-koncentrat, fremstillet ifølge K.M. Brinkhous et al. JAMA, 205, 67 (1968), eller M. Wickerhauser, Vox. Sang., 23, 402 (1972), opløses i en citrat-NaCl-puffer, pH 6,9, 0,02 resp. 0,06 mol pr. liter, til 30 en 1%'s opløsning, beregnet på protein. Under omrøring tilsættes der derpå ved 22°C først 2,2 mol glycin pr. liter og dernæst 12% (w/v) NaCl, hver gang i fast tilstand og portionsvis. Der videreomrøres i 2 timer ved denne temperatur, hvorpå 35 på fældningen fracentrifugeres ved 3000 G i løbet af 30 minut-

0

ter. Fældningen kan videreforarbejdes som faktor VIII-koncentrat.

Den ovenstående væske opvarmes til 37°C. Under omrøring tilsættes der fast NaCl til en koncentration på 17% (w/v). Der omrøres yderligere i 30 minutter ved 37°C, og fældningen udvindes ved centrifugering ved 3000 G i 30 minutter. Den ovenstående væske bortkastes.

Fældningen optages i 1/4 rumfang af den oprindeligt anvendte citrat-NaCl-puffer, der opvarmes igen til 37°C, og der tilsættes 2,2 mol glycin pr. liter og 17% (w/v) NaCl, hvorpå der igen centrifugeres.

Den herved fremkomne fældning optages i 1/10 af det oprindeligt anvendte rumfang af citrat-NaCl-pufferen og dialyseres mod det 30-dobbelte rumfang af denne puffer i 3 timer. Derefter opvarmes opløsningen til 30°C og centrifugeres til klaring i 60 minutter ved 3000 G.

Den ovenstående væske, der indeholder CIG'et, fortyndes med citrat-NaCl-puffer til en koncentration på 1%, beregnet på protein, og der tilsættes 5% glucose (w/v), sterilfiltreres og frysetørres.

Eksempel 2

Fibrinogenfattigt faktor VIII-koncentrat ifølge eksempel 1 opløses i en citrat-NaCl-puffer (pH = 6,9) i en koncentration på 0,02 henholdsvis 0,06 mol pr. liter til dannelse af en 1%'s opløsning, beregnet på protein. Under omrøring tilsættes der hver gang i fast tilstand portionsvis og ved 22°C først 2,0 mol L-alanin pr. liter og derpå 9% (w/v) ammoniumsulfat. Der omrøres i 2 timer ved denne temperatur, og fældningen fracentrifugeres dernæst ved 3000 G i løbet af 30 minutter. Fældningen kan videreforarbejdes som faktor VIII-koncentrat.

Den ovenstående væske opvarmes til 37°C. Under omrøring sættes der hertil fast ammoniumsulfat til en koncentration på 20% (w/v). Der omrøres i yderligere 30 minut-

0

ter ved 37°C, og fældningen udvindes ved centrifugering ved 3000 G i 30 minutter. Den ovenstående væske kasseres.

Fældningen optages i 1/4 rumfang af den oprindelige anvendte citrat-NaCl-puffer, opvarmes igen til 37°C, og der tilsættes 2,0 mol L-alanin pr. liter og 20% (w/v) ammoniumsulfat, og der centrifugeres atter.

Der gås derefter frem svarende til eksempel 1.

Eksempel 3

10

Fibrinogenfattigt faktor VIII-koncentrat ifølge eksempel 1 opløses i en citrat-NaCl-puffer (pH = 6,9) i en koncentration på 0,02 henholdsvis 0,06 mol pr. liter til dannelse af en 1%'s opløsning, beregnet på protein. Under omrøring tilsættes der hver gang i fast tilstand portionsvis ved 22°C først 2,0 mol β-alanin pr. liter og derpå 12% (w/v) KCl. Der omrøres i 2 timer ved denne temperatur, og fældningen fracentrifugeres dernæst ved 3000 G i løbet af 30 minutter. Fældningen kan videreforarbejdes som faktor VIII-koncentrat.

20

Den ovenstående væske opvarmes til 37°C. Under omrøring sættes der hertil fast KCl til en koncentration på 25% (w/v). Der omrøres i yderligere 30 minutter ved 37°C, og fældningen udvindes ved centrifugering ved 3000 G i 30 minutter. Den ovenstående væske kasseres.

25

Fældningen optages i 1/4 rumfang af den oprindeligt anvendte citrat-NaCl-puffer, der opvarmes igen til 37°C, der tilsættes 2,0 mol β-alanin pr. liter og 25% (w/v) KCl, og der centrifugeres atter.

Der gås derefter frem svarende til eksempel 1.

30

0

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af det i kulden
uopløselige globulin (CIG), ved hvilken man til et faktor
5 VIII-koncentrat, der indeholder dette globulin, sætter en
godt vandopløselig aliphatisk aminosyre, k e n d e t e g-
n e t ved, at man ved en temperatur over 18°C tilsætter
aminosyren i en koncentration på 1,8-2,6 mol pr. liter,
hvorefter man tilsætter 8-12% (w/v) neutralsalt, skiller
10 den ovenstående væske fra den fremkomne fældning og i væ-
sken forøger koncentrationen af neutralsaltet til en kon-
centration på 16-33% (w/v), hvorved CIG'et udfældes, idet
man eventuelt til yderligere koncentration af CIG'et op-
tager fældningen i en pufferopløsning og igen fælder under
15 de ovenfor angivne betingelser.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at der som aminosyre anvendes glycin.

Fremdragne publikationer:

Chemical Abstracts, bind 74 (1971) 9658f.