



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 G 7/00
A 61 K 37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

640 865

⑳ Gesuchsnummer:	2548/79	㉗ Inhaber:	Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Tokyo (JP) The Green Cross Corporation, Osaka (JP)
㉔ Anmeldungsdatum:	19.03.1979	㉘ Erfinder:	Fumimaro Takaku, Utsunomiya-shi (JP) Katsuhiro Ogasa, Minami-ku/Yokohama (JP) Morio Kuboyama, Setagaya-ku/Tokyo (JP) Minoru Saito, Komae-shi (JP) Nobuya Yanai, Suginami-ku/Tokyo (JP) Masayuki Nishida, Mishima-gun/Osaka (JP) Satoshi Funakoshi, Katano-shi (JP) Muneo Yamada, Kodaira-shi (JP)
㉙ Priorität(en):	20.03.1978 JP 53-31999 03.07.1978 JP 53-80694 03.07.1978 JP 53-80695 26.09.1978 JP 53-118203	㉚ Vertreter:	Ammann Patentanwälte AG Bern, Bern
㉛ Patent erteilt:	31.01.1984		
㉜ Patentschrift veröffentlicht:	31.01.1984		

⑤④ **Glykoproteid des menschlichen Urins, Verfahren zu seiner Herstellung und Mittel zur Bekämpfung von Leukozytopenie.**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Glykoproteid, nachstehend als HGI-Glykoproteid bezeichnet (HGI = human granulocyte inducing), isoliert aus dem Urin gesunder Menschen, das auf die granulopoetischen Stammzellen im menschlichen Knochenmark wirkt und dadurch die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen zur Bildung von Granulozyten stimuliert. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung des Glykoproteids sowie dieses Glykoproteid enthaltende Arzneimittel zur Bekämpfung von Leukozytopenie. Das Glykoproteid hat ein Molekulargewicht von 75 000 bis 90 000 μ und einen isoelektrischen Punkt von pH 4,7 $\pm$ 0,2. Es ist löslich in Wasser, etwas löslich in Chloroform und unlöslich in Äthanol und Aceton.

PATENTANSPRÜCHE

1. Glykoprotein des menschlichen Urins mit einem Molekulargewicht von 75 000 bis 90 000 u bestimmt durch Gelfiltration mit folgenden physikalischen und chemischen Parametern:

(a) Löslichkeit: Löslich in Wasser, etwas löslich in Chloroform und unlöslich in Äthanol und Aceton;

(b) spezifischer Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = 0 \pm 40^\circ$ bei $c = 0,25\%$ in Wasser;

(c) pH-Wert: 5,0 bis 6,0 1 gewichtsprozentige wässrige Lösung;

(d) Isoelektrischer Punkt: pH 4,7 $\pm$ 0,2;

(e) Thermostabilität: Vollständiger Verlust der stimulierenden Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung menschlicher Granulozyten nach 30minütigem Erhitzen einer 1prozentigen wässrigen Lösung auf $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$;

(f) Elektrophorese: Relative Beweglichkeit 0,25 bei der Elektrophorese an Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel;

(g) IR-Absorptionsspektrum: Charakteristische Absorption bei 3600 bis 3200 starke Absorption, 1700 bis 1600 starke Absorption, 1550 mittlere Absorption, 1430 bis 1380 (mittlere Absorption) und 1150 bis 1000 breite Bande cm^{-1} ;

(h) Farbreaktionen: Charakteristische Farbreaktion für Saccharide mit α -Naphthol-Schwefelsäure, Indol-Schwefelsäure, Anthron-Schwefelsäure und Phenol-Schwefelsäure; charakteristische Farbreaktion für Polypeptidbindungen und Aminosäuren nach dem Lowry-Verfahren und der Ninhydrin-Reaktion nach Hydrolyse mit Salzsäure;

(i) Aminosäure-Grundbausteine des Proteinrests: Prolin, Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Histidin, Tryptophan und Arginin;

(j) Farbe und Kristallform: Weiss und amorph;

(k) Zuckerszusammensetzung des Polysaccharidrests: 10,0 bis 13,0 Gewichtsprozent neutrale Zucker ausgedrückt in Glucose, 3,0 bis 7,0 Gewichtsprozent Sialinsäuren und 1 Gewichtsprozent anderer Aminosucker;

(l) Gewichtsverhältnis von Protein zu Polysaccharid: 75 bis 85: 13,0 bis 20,0;

(m) Elementaranalyse: 42,3 bis 47,3% Kohlenstoff, 5,7 bis 7,8% Wasserstoff, 9,6 bis 14,3% Stickstoff, 34,4 bis 39,4% Sauerstoff und höchstens 0,2% Schwefel.

2. Verfahren zur Herstellung des Glykoproteids nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die in menschlichem Urin enthaltenen Proteine konzentriert, die erhaltenen Proteine zur Abtrennung von Verunreinigungen mit einem Kationenaustauscher behandelt, das Eluat zur Adsorption des Glykoproteids mit einem Anionenaustauscher behandelt, das Glykoprotein aus dem Anionenaustauscher mit einer Salzlösung mit linearem Konzentrationsgradient eluiert, das Eluat der Gelfiltrationschromatographie an einem stark vernetzten Polymergel unterwirft, um das Glykoprotein zu entwickeln, und die Fraktionen mit realtiven Elutionsvolumen V_e/V_o von 1,11 bis 1,60 auffängt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die aufgefangenen Fraktionen zusätzlich einer Affinitätschromatographie an einem Adsorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterwirft, und das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20 bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das Eluat der präparativen Zonenelektrophorese unterwirft und das Glykoprotein mit einer Salzlösung eluiert.

5. Verfahren nach Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das relative Elutionsvolumen 1,11 bis 1,45 beträgt.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvo-

lumen von 1,11 bis 1,60 auf einen pH-Wert von 5 bis 9 einstellt und die erhaltene wässrige Lösung zur Inaktivierung von Viren in Gegenwart von humanem Albumin 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C erhitzt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Albuminkonzentration in der wässrigen Lösung mindestens 2,0% Gewicht pro Volumen beträgt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Albumin aus humanem Serum oder humaner Placenta stammt.

9. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60 der Affinitätschromatographie an einem Adsorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterwirft, das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20- bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert, das erhaltene Eluat auf einen pH-Wert von 5 bis 9 einstellt und die erhaltene wässrige Lösung zur Inaktivierung von Viren in Gegenwart von humanem Albumin 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C erhitzt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Albuminkonzentration in der wässrigen Lösung mindestens 2,0% Gewicht pro Volumen beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Albumin aus humanem Serum oder humaner Placenta stammt.

12. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60 der Affinitätschromatographie an einem Adsorptionsmittel mit Affinität für Zucker behandelt, das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20- bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert, das erhaltene Eluat der präparativen Zonenelektrophorese unterwirft, das Glykoprotein mit einer Salzlösung eluiert, das erhaltene Eluat auf einen pH-Wert von 5 bis 9 einstellt und zur Inaktivierung von Viren in Gegenwart von humanem Albumin 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C erhitzt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Albuminkonzentration in der wässrigen Lösung mindestens 2,0% Gewicht pro Volumen beträgt.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Albumin aus humanem Serum oder humaner Placenta stammt.

15. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60 der Affinitätschromatographie an einem Adsorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterwirft, das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20- bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert, das Eluat der präparativen Zonenelektrophorese unterwirft, das Glykoprotein mit einer Salzlösung eluiert, im Eluat die Konzentration des Glykoproteids auf mindestens 70 mg pro ml und den pH-Wert auf 5 bis 9 einstellt und das erhaltene Eluat zur Inaktivierung von Viren 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C erhitzt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Glykoproteids bei der Vireninaktivierungsstufe 100 bis 200 mg pro ml beträgt.

17. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die das Glykoprotein enthaltenden Fraktionen, einschliesslich des Proteins enthaltenden konzentrierten menschlichen Urins, zur Inaktivierung von Viren in einer beliebigen Stufe in Form einer wässrigen Lösung 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C unter solchen Bedingungen erhitzt, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung auf mindestens 70 mg pro ml und der pH-Wert auf 5 bis 9 eingestellt worden ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung für die Vireninaktivierung 100 bis 150 mg pro ml beträgt.

19. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60 der Affinitätschromatographie an einem Absorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterwirft und das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20- bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert, wobei man die das Glykoprotein enthaltenden Fraktionen, einschliesslich des Proteins enthaltenden konzentrierten menschlichen Urins, zur Inaktivierung von Viren in einer beliebigen Stufe in Form einer wässrigen Lösung 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C unter solchen Bedingungen erhitzt, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung auf einen Wert von mindestens 70 mg pro ml und der pH-Wert auf 5 bis 9 eingestellt worden ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung 100 bis 150 mg pro ml beträgt.

21. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60 der Affinitätschromatographie an einem Absorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterwirft, das adsorbierte Glykoprotein mit einer 20- bis 100 mmolaren Saccharidlösung eluiert, das Eluat der präparativen Zonenelektrophorese unterwirft und das Glykoprotein in reiner Form mit einer Salzlösung eluiert, wobei man die das Glykoprotein enthaltenden Fraktionen, einschliesslich des Proteins enthaltenden konzentrierten menschlichen Urins, zur Inaktivierung von Viren in einer beliebigen Stufe in Form einer wässrigen Lösung 8 bis 30 Stunden auf 50 bis 70°C unter solchen Bedingungen erhitzt, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung auf einen Wert von mindestens 70 mg pro ml und der pH-Wert auf 5 bis 9 eingestellt worden ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Proteingehalt der wässrigen Lösung für die Vireninaktivierung 100 bis 150 mg pro ml beträgt.

23. Arzneimittel zur Bekämpfung von Leukozytopenie, gekennzeichnet durch einen Gehalt an dem Glykoprotein nach Anspruch 1.

24. Arzneimittel nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es frei von viraler Infektiosität ist.

25. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 23 oder 24, gekennzeichnet durch einen Gehalt an dem Glykoprotein mit einer spezifischen biologischen Aktivität von mindestens 35 000 Einheiten pro mg.

Die Erfindung betrifft ein Glykoprotein, nachstehend als HGI-Glykoprotein bezeichnet (HGI = human granulocyte inducing), welches aus dem Urin gesunder Menschen isoliert werden kann, das auf die granulopoetischen Stammzellen im menschlichen Knochenmark wirkt und dadurch die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen zur Bildung von Granulozyten stimuliert. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung des Glykoproteins sowie dieses Glykoprotein enthaltende Arzneimittel zur Bekämpfung von Leukozytopenie.

Während das periphere Blut gesunder Menschen etwa 5000 bis 9000 Leukozyten pro mm³ enthält, liegt die Zahl der Leukozyten bei Leukozytopenie unterhalb etwa 4000 pro mm³. Die Leukozytopenie hängt mit einer anormalen Abnahme der Proliferation von Knochenmarkzellen bei einigen infektiösen und parasitären Erkrankungen, Bestrahlung oder Verabfolgung von Zytostatika zusammen. Zur Therapie der Leukozytopenie wurden bisher Präparate verwendet, die Glycyrrhizin oder ein Gemisch von Cystein und Glykokoll, α -Mercaptopropionylglycin oder das Alkaloid Cepharantin

enthalten. Die Chemotherapeutika sind jedoch unerwünscht aufgrund ihrer unbefriedigenden Wirkung und/oder Nebenwirkungen. Es war daher das Ziel zahlreicher Forschungsgruppen, Arzneistoffe zur Behandlung von Leukozytopenie zu entwickeln, die wirksamer sind und geringere Nebenwirkungen hervorrufen. Es war bekannt, dass ein «colony-stimulating-factor», nachstehend kurz mit CSF bezeichnet, die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkzellen stimuliert. CSF wirkt auf Knochenmarkzellen und stimuliert die Proliferation und Differenzierung zur Bildung von Granulozyten oder Makrophagen. Es ist ein essentieller Faktor für die Knochenmarkzellen bei ihrer in vitro Züchtung durch gleichzeitige Proliferation und Differenzierung Granulozyten- oder Makrophagenzellaggregate zu bilden (nachstehend als Granulozyten- oder Makrophagen-Kolonien bezeichnet); vgl. Y. Ichikawa, *Proceedings of the National Academy of Science*, Bd. 56 (1966), S. 488, und D. Metcalf, *Experimental Hematology*, Bd. 1 (1973), S. 185. Da CSF die Bildung von Granulozyten- und Makrophagen-Kolonien von Knochenmarkzellen induziert, schlugen einige Forschungsgruppen vor, CSF als getrennte Faktoren anzusehen, nämlich als Granulozyten induzierenden Faktor und Makrophagen induzierenden Faktor; vgl. E.R. Stanley et al., *J. Exp. Med.*, Bd. 143 (1976), S. 631. Im allgemeinen werden diese Faktoren jedoch gemeinsam als CSF in vitro Tests an Mäuseknochenmarkzellen bestimmt. Es wurden zahlreiche Faktoren, die die Koloniebildung in vitro in Mäuseknochenmarkzellen stimulieren, aus verschiedenen Quellen isoliert, beispielsweise Serum, Urin, verschiedenen Organextrakten und Medien, die durch verschiedene Gewebe und Zelllinien konditioniert sind, Körperflüssigkeitselemente wie Serum und Urin, konditionierte Medien von Zellen, wie Leukozyten und Gewebe; vgl. J.W. Sheridan, *Journal of Cell Physiology*, Bd. 78 (1971), S. 451. Auf menschliche Knochenmarkzellen wirkendes CSF wurde aus menschlichen Quellen isoliert, nämlich aus Serum, verschiedenen Organextrakten und durch Gewebe konditionierten Medien; vgl. D. Metcalf und M.A.S. Moore, «Ciba Foundation Symposium 13, Haemopoietic Stem Cells», S. 157, Elsevier Excerpta Medica, Holland, 1973. Das aus verschiedenen Organen, verschiedenen Zellen und deren konditionierten Medien erhaltene CSF ist jedoch nicht identisch. Beispielsweise beträgt das Molekulargewicht von CSF aus Medien, die durch humane Placentazellen konditioniert sind, 30 000 Dalton (vgl. A.W. Burgess et al., *Blood*, Bd. 49 (1977), S. 573), während das Molekulargewicht von CSF aus humanem Serum 45 000 Dalton beträgt (vgl. S.H. Chan et al., *British Journal of Haematology*, Bd. 20 (1971), S. 329). Zwei Typen von CSF mit einem Molekulargewicht von 35 000 und weniger als 1300 wurden aus Medien isoliert, die durch humane Leukozyten konditioniert worden sind; vgl. G.B. Price et al., *Blood*, Bd. 42 (1973), S. 341. Die verschiedenen CSF-Präparate haben eine unterschiedliche Aktivität. Einige wirken entweder auf zu proliferierende und zu differenzierende Granulozytenzellen oder Makrophagenzellen. Andere wirken auf beide Arten von Zellen. Deshalb sind die aus verschiedenen Quellen isolierten CSF-Präparate voneinander verschieden; vgl. Metcalf und Moore, a.a.O., 1973.

Es ist ferner bekannt, dass im menschlichen Urin ein Typ CSF vorkommt, der Mäuseknochenmarkzellen zur Bildung von Kolonien von Granulozyten und Makrophagen in vitro stimuliert; vgl. E.R. Stanley et al., *Federation Proceedings*, Bd. 34 (1975), S. 2272, und E.R. Stanley und D. Metcalf, *Journal of Experimental Biology and Medical Science*, Bd. 47 (1969), S. 467. Dieses CSF-Präparat soll ein Molekulargewicht von 45 000 haben und die Proliferation und Differenzierung von Mäuseknochenmarkzellen zur Bildung von vorwiegend Makrophagen-Kolonien stimulieren. Im Gegensatz

zu seiner stimulierenden Wirkung gegenüber Mäuseknochenmarkzellen stimuliert das Präparat kaum die Bildung von Granulozyten- oder Makrophagen-Kolonien in menschlichen Knochenmarkzellen, sondern es stimuliert die Bildung von sogenannten Cluster. Im Zusammenhang mit menschlichen Knochenmarkzellen bedeuten die Ausdrücke «Kolonie» und «Cluster» Zellaggregate mit 40 oder mehr Zellen bzw. 3 bis weniger als 40 Zellen nach der Definition von Metcalf; vgl. D. Metcalf, *Experimental Haematology*, Bd. 2 (1974), S. 157.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Glykoprotein bzw. ein CSF-Präparat sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung zu schaffen, das als Arzneistoff zur Bekämpfung von Leukozytopenie eingesetzt werden kann. Die Lösung dieser Aufgabe beruht auf dem Befund, dass aus menschlichem Urin ein HGI-Glykoprotein isoliert werden konnte, das sich von den bekannten CSF-Präparaten erheblich unterscheidet, ein Molekulargewicht von etwa 85 000 u besitzt und sowohl bei menschlichen Knochenmarkzellen als auch Mäuseknochenmarkzellen die Bildung reiner Granulozytenkolonien in vitro bewirkt. Das HGI-Glykoprotein hat eine starke Wirkung auf menschliche Knochenmarkzellen und stimuliert die Proliferation und Differenzierung reiner Granulozytenkolonien. Nachstehend wird diese Wirkung bisweilen auch als «biologische Aktivität» bezeichnet.

Dementsprechend ist Gegenstand der Erfindung ein Glykoprotein aus menschlichem Urin, das menschliche Knochenmarkzellen zur Bildung von Granulozytenkolonien stimuliert und das ein Molekulargewicht von 75 bis 90 000 u, bestimmt durch Gelfiltration, und die weiteren Eigenschaften von Anspruch 1 aufweist.

Das HGI-Glykoprotein der Erfindung wird wie in den Verfahrensansprüchen beschrieben, hergestellt.

Nachstehend wird die Erfindung näher beschrieben.

Ein typisches Verfahren zur Herstellung des HGI-Glykoproteids der Erfindung wird folgendermassen durchgeführt: Frischer Urin von gesunden Menschen wird auf einen pH-Wert von 6 bis 9, vorzugsweise 7 bis 8, mit verdünnter Säure oder Base eingestellt und sodann zur Abtrennung von unlöslichen Substanzen zentrifugiert. Der Überstand wird mit einem Silicium enthaltenden Adsorptionsmittel, wie Kieselgel, Kieselgel-Magnesiumsilikat, Diatomeenerde, Quarzglas oder Bentonit, zusammengebracht, und die adsorbierten Bestandteile werden mit einer alkalischen Lösung mit einem pH-Wert von vorzugsweise 9 oder höher eluiert. Die Art der zur Eluierung verwendeten alkalischen Lösung ist nicht besonders kritisch. Vorzugsweise wird eine wässrige Ammoniaklösung oder Natronlauge in einer Konzentration von 0,3 bis 1,5M verwendet. Das erhaltene Eluat wird mit einer Säure auf einen pH-Wert von 7 bis 8 eingestellt und mit einem Neutralsalz, beispielsweise Ammoniumsulfat bis zu 70prozentiger Sättigung, versetzt, um den Wirkstoff auszusalzen. Es wird eine rohe Proteinfraction erhalten, die das HGI-Glykoprotein enthält.

Die erhaltene rohe Proteinfraction wird in einer geringen Menge einer alkalischen Lösung gelöst, von niedermolekularen Substanzen durch Ultrafiltration befreit, mit einer 0,01 bis 0,15molaren Salz-Pufferlösung verdünnt und mit einem Kationenaustauscher, beispielsweise einem Carboxymethyl-dextran, Carboxymethylcellulose oder Phosphocellulose, behandelt, um Verunreinigungen abzutrennen. Die Behandlung mit dem Austauscher wird bei neutralem pH-Wert durchgeführt. Die rohe Fraction des HGI-Glykoproteids und der Kationenaustauscher wurden vor dem Zusammenbringen auf einen pH-Wert von 6 bis 8 mit vorzugsweise 0,01 bis 0,15M Salz-Pufferlösung eingestellt. Der grösste Teil des HGI-Glykoproteids läuft durch den Kationenaustauscher ohne Adsorption hindurch. Die abfliessende Lösung wird

konzentriert und das Konzentrat mit einer verdünnten Pufferlösung vom pH-Wert 6 bis 8 äquilibriert und der Ionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher, wie DEAE-Cellulose, unterworfen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden ist. Das HGI-Glykoprotein wird an dem Anionenaustauscher adsorbiert. Sodann wird das adsorbierte HGI-Glykoprotein mit einer 0,1 bis 0,3M Salzlösung, vorzugsweise einer Natriumchloridlösung, mit linearem Konzentrationsgradient eluiert. Das HGI-Glykoprotein wird bei einer Salzkonzentration von 0,1M oder höher eluiert. Eine vollständige Trennung ist schwierig. Die Fractionen der abfliessenden Lösung bei einer 0,1 bis 0,3M Salzkonzentration werden aufgefangen und gegebenenfalls entsalzt und konzentriert.

Es ist auch möglich, die stufenweise Eluierung mit 0,1 bis 0,3M Salzlösung zur Eluierung des HGI-Glykoproteids aus dem Ionenaustauscher anzuwenden.

Zur weiteren Reinigung werden die erhaltenen vereinigten Fractionen der Gelfiltrationschromatographie an einem stark vernetzten Polymergel mit einem Wasseraufnahmewert von 10 bis 20 ml pro g unterworfen, beispielsweise Sephadex G-150 oder Biogel P-100. Die aktiven Substanzen werden mit einer 0,05 bis 0,1M Salz-Pufferlösung entwickelt. Fractionen mit einem relativen Elutionsvolumen von 1,11 bis 1,60, vorzugsweise 1,11 bis 1,45, werden aufgefangen, entsalzt und konzentriert oder gefriergetrocknet.

Die auf diese Weise erhaltenen, halbreinen HGI-Glykoprotein-Präparate können bereits als Arzneistoffe verwendet werden.

Das relative Elutionsvolumen wird ausgedrückt durch den Quotient V_e/V_0 , wobei V_e das zur Eluierung der in der Säule vorliegenden Substanz erforderliche Elutionsvolumen und V_0 das äussere Volumen (Hohlraumvolumen) darstellt.

Zur weiteren Reinigung wird das halbgereinigte Präparat in einer verdünnten Salz-Pufferlösung gelöst, die 1,0 bis 2,0M beispielsweise einer Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 6,0 bis 8,0, vorzugsweise 6,0 bis 7,0, enthält und 1,0 bis 2,0M an Natriumchlorid ist. Die Lösung wird der Affinitätschromatographie an einem Adsorptionsmittel mit Affinität für Zucker unterworfen, beispielsweise Concanavalin A-Sepharose 4B, das mit der gleichen Pufferlösung äquilibriert worden ist. Das an der Säule adsorbierte HGI-Glykoprotein wird mit einer 1,0 bis 2,0M Salzlösung in einer verdünnten Pufferlösung, die 20 bis 100 mMolar an Sacchariden und 1,0 bis 2,0M an Salz ist, beim pH 6,0 bis 8,0 eluiert. Beispielsweise ist das Saccharid ein α -Methyl-D-glucosid, das in Lösung einen pH-Wert von 6,0 bis 8,0, vorzugsweise 6,0 bis 7,0, hat. Die das HGI-Glykoprotein enthaltenden Fractionen werden aufgefangen und erforderlichenfalls entsalzt und konzentriert oder gefriergetrocknet.

Zur weiteren Reinigung des HGI-Glykoproteids durch Elektrophorese werden die vereinigten Fractionen aus der Affinitätschromatographie der präparativen Zonenelektrophorese unter Verwendung von Acrylamidgel oder Agarosegel als Träger beim pH-Wert 7,0 bis 9,0 unterworfen. Stark gereinigtes HGI-Glykoprotein wird vom Träger mit verdünnter Salzlösung unter Kühlung eluiert. Sodann wird die erhaltene Lösung entsalzt, konzentriert oder gefriergetrocknet.

Im Verlauf des erfindungsgemässen Verfahrens zur Gewinnung des HGI-Glykoproteids ist es möglich, gleichzeitig noch Urokinase, Kallikrein und Lysozym zu gewinnen.

Das erhaltene stark gereinigte HGI-Glykoprotein ist ein weiss bis hellbraun gefärbtes Pulver, es ist geschmack- und geruchlos und etwas hygroskopisch und hat die nachstehend beschriebenen physikalischen und chemischen Eigenschaften.

In Fig. 1 ist das IR-Absorptionsspektrum des HGI-Glyko-

proteids wiedergegeben. Fig. 2 zeigt die Beziehung zwischen der relativen Beweglichkeit bei der Elektrophorese und dem Molekulargewicht. In Fig. 3 ist das UV-Absorptionsspektrum des HGI-Glykoproteids wiedergegeben und Fig. 4 zeigt die Beziehung zwischen der zugesetzten Menge des HGI-Glykoproteids und der Zahl der Kolonien, die sich beim in vitro Test entwickelt haben.

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften wurden an der Probe Nr. 6 von Beispiel 1 (vgl. unten) bestimmt.

(1) Molekulargewicht

Das Molekulargewicht des HGI-Glykoproteids der Erfindung beträgt etwa 85 000 u, bestimmt durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, und 75 000 bis 90 000 u, bestimmt durch Gelfiltration an Sephadex G-150. Dementsprechend scheint der zuverlässigste Wert für das Molekulargewicht zwischen 75 000 und 90 000 Dalton zu liegen.

(2) Löslichkeit

Die Löslichkeit des HGI-Glykoproteids in verschiedenen Lösungsmitteln ist in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

Lösungsmittel	Löslichkeit
Wasser	löslich
Äthanol	unlöslich

Tabelle II

Wellenzahl, cm ⁻¹	Absorption	Anmerkungen
3600-3200	stark	die breite Absorptionsbande stammt anscheinend von den v-OH Gruppen, die in unterschiedlichem Ausmass Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden
1700-1600	stark	
1550	mittel	
1430-1380	mittel	
1150-1000	mittel	die breite Absorptionsbande stammt anscheinend von den -C-O-C-Bindungen des Polysaccharids.

(6) Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt des HGI-Glykoproteids liegt bei pH 4,7±0,2, bestimmt durch Polyacrylamidgel-Elektrofokussierung.

Tabelle I (Fortsetzung)

Aceton	unlöslich
Chloroform	wenig löslich
1M Natriumchloridlösung	löslich
5 10% Sucroslösung	löslich

Ausserdem ist HGI-Glykoprotein in verdünnten Salzlösungen leicht löslich, beispielsweise in einer verdünnten Phosphatlösung oder einer verdünnten Trisaminomethanolösung. Es ist ferner löslich in einer verdünnten Salzlösung im pH-Bereich von 1 bis 12.

(3) pH-Wert

Der pH-Wert einer 1prozentigen wässrigen Lösung des HGI-Glykoproteids beträgt 5,0 bis 6,0. Somit reagiert es schwach sauer.

(4) Spezifischer Drehwert

Der spezifische Drehwert wird an einer 0,25prozentigen wässrigen Lösung des HGI-Glykoproteids bei 20°C und der Wellenlänge der D-Linie bestimmt. $[\alpha]_D^{20} = 0 \pm 40^\circ$.

(5) IR-Absorptionsspektrum

Das IR-Absorptionsspektrum des HGI-Glykoproteids als Kaliumbromid-Pressling ist in Fig. 1 wiedergegeben. Die charakteristischen Absorptionsbanden sind in Tabelle II zusammengestellt.

(7) Farbreaktionen

Farbreaktionen des HGI-Glykoproteids werden in wässriger Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefasst.

Tabelle III

Farbreaktion	Farbe	Anmerkungen
Lowry-Verfahren*	blau	Peptidbindungen
Ninhydrin (Hydrolyse mit 6N HCl bei 110°C während 22 Std.)	violett	α -Aminosäuren
α -Naphthol-Schwefelsäure (Molisch)	violett	Saccharide
Indol-Schwefelsäure (Dische)	braun	Saccharide
Anthron-Schwefelsäure	dunkelgrün	Saccharide
Phenol-Schwefelsäure	braun	Saccharide

* Herausgegeben durch Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, «Methods in Enzymology», Vol. III, page 448 (Academic Press Inc., Publishers, New York, 1957) ... (Item 9)

(8) Thermostabilität

Bei 30minütigem Erhitzen einer 1prozentigen wässrigen Lösung des HGI-Glykoproteids auf 60±0,5°C ist die CSF-Aktivität nicht mehr feststellbar.

(9) Aminosäurezusammensetzung des Proteinfragments
Das HGI-Glykoprotein wird mit 1N Salzsäure bei 110°C hydrolysiert, und die Aminosäurezusammensetzung des Proteinfragments wird mittels eines Aminosäure-Auto-Analy-

zers bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

Tabelle IV

Aminosäure	Gew.-%	Mol (mMol)
Prolin	3,2	0,392
Asparaginsäure	9,8	1,038
Threonin	2,8	0,331
Serin	11,9	1,596
Glutaminsäure	13,8	1,322
Glykokoll	11,0	2,066
Alanin	7,3	1,155
Valin	6,4	0,771
Methionin	2,5	0,236
Isoleucin	2,5	0,269
Leucin	7,0	0,753
Tyrosin	5,8	0,451
Phenylalanin	12,8	1,050
Lysin	2,2	0,212
Histidin	1,0	0,091
Tryptophan	Spuren	-
Arginin	Spuren	-
Ammoniak	0,5	-

Aus Tabelle IV ist ersichtlich, dass das Proteinfragment des HGI-Glykoproteids aus 17 Aminosäuren besteht, wobei die sauren und neutralen Aminosäuren überwiegen, während die basischen Aminosäuren in untergeordneten Mengen vorliegen. Ebenfalls charakteristisch ist, dass über 70% der gesamten Aminosäuren unverzweigte Aminosäuren sind, einschliesslich Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glykokoll, Alanin, Valin und Leucin.

(10) Elektrophorese

Nach der Methode von Laemuli, Nature, Bd. 227 (1970), S. 680, und unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel, zeigt das HGI-Glykoprotein eine einzige Bande bei einer Stellung einer relativen Beweglichkeit von 0,25. Gleichzeitig wurden der Elektrophorese unterworfen der Trypsininhibitor (Molekulargewicht 21 500), Ovalbumin (Molekulargewicht 43 000), monomeres humanes Serumalbumin (Molekulargewicht 65 000) und dimeres humanes Serumalbumin (Molekulargewicht 130 000). Aus den Beweglichkeiten der Substanzen bekannten Molekulargewichts und der Beweglichkeit des HGI-Glykoproteids berechnet sich das Molekulargewicht des Glykoproteids zu etwa 85 000 (Fig. 2). In Fig. 2 bedeuten die Buchstaben a, b, c und d den Trypsininhibitor, das Ovalbumin, das monomere humane Serumalbumin und das dimeres humane Serumalbumin. Der Pfeil kennzeichnet das HGI-Glykoprotein.

(11) UV-Absorptionsspektrum

Das UV-Absorptionsspektrum des HGI-Glykoproteids, bestimmt an einer 0,1prozentigen wässrigen Lösung in einer Quarzelle einer Schichtdicke von 1 cm ist in Fig. 3 wiedergegeben. Das Absorptionsspektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und Endabsorption im Wellenlängenbereich unterhalb 250 nm. Die optische Dichte $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ bei 280 nm beträgt 3,8.

(12) Zuckerzusammensetzung des Polysaccharidfragments

Neutralzucker wurden durch die Phenol-Schwefelsäure-Reaktion Sialinsäuren nach der Thiobarbital-Methode von Warren [Journal of Biological Chemistry, Bd. 234 (1959), S. 1971] und Aminosucker nach der Methode von Elson-

Morgan [Biochemical Journal, Bd. 27 (1933), S. 1824] bestimmt. Die Menge der Neutralzucker wird in Glucose ausgedrückt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten: Neutralzucker 10,0 bis 13,0%; Sialinsäuren 3,0 bis 7,0%; Aminosucker weniger als 1,0%; Gesamtzucker 13,0 bis 20,0%.

(13) Protein- und Polysaccharid-Gehalt

Der Proteingehalt des HGI-Glykoproteids beträgt 75 bis 85%, bestimmt nach der semi-mikro-Kjeldahl-Methode. Der Gesamtzuckergehalt beträgt 13,0 bis 20,0%, wie vorstehend beschrieben.

(14) Elementaranalyse

Die Elementaranalyse des HGI-Glykoproteids ergibt folgende Werte: Kohlenstoff 42,3 bis 47,3%; Wasserstoff 5,7 bis 7,8%; Stickstoff 9,6 bis 14,3%; Sauerstoff 34,4 bis 39,4%; Schwefel weniger als 0,2%.

Das HGI-Glykoprotein der Erfindung mit den vorstehenden physikalischen und chemischen Eigenschaften stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten sowohl des Menschen als auch der Maus. Dies ist aus dem nachstehend beschriebenen Versuch 1 ersichtlich. Das Glykoprotein zeigt keine akute Toxizität, wie aus dem nachstehend beschriebenen Versuch 4 hervorgeht. Aus dem nachstehend beschriebenen Versuch 3 ist ersichtlich, dass das Glykoprotein zur Bekämpfung von Leukozytopenie eingesetzt werden kann.

Das aus menschlichem Urin nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellte HGI-Glykoprotein der Erfindung wird unter aseptischen Bedingungen in Gefässen gefriergetrocknet und sodann hermetisch verschlossen. Vor der Gefrierdrying ist es möglich, das HGI-Glykoprotein mit einer wässrigen Lösung von humanem Serumalbumin als Stabilisator sowie einer Aminosäure oder einem Saccharid zur Verbesserung der Löslichkeit zu versetzen. Die erhaltene Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert und sodann aseptisch gefriergetrocknet. Vor dem Gebrauch wird das Gefäss geöffnet und das HGI-Glykoprotein durch Zusatz steriler physiologischer Kochsalzlösung, sterilen Wassers oder einer sterilen isotonischen Lösung gelöst. Die erhaltene Lösung kann intravenös, intramuskulär oder subcutan injiziert werden.

Aus den Ergebnissen der nachstehend beschriebenen Versuche 1 und 2 geht hervor, dass die wirksame Tagesdosis mindestens 0,75 mg, vorzugsweise 0,75 bis 2,24 mg pro kg Körpergewicht beträgt. Halbgereinigte, grosstechnisch hergestellte Präparate mit einer spezifischen biologischen Aktivität von mindestens etwa 35 000 Einheiten pro mg, beispielsweise die HGI-Glykoproteinprobe Nr. 4 und Nr. 5 von Beispiel 1, können ebenfalls als Arzneistoffe verwendet werden.

Die Wirkung des HGI-Glykoproteids der Erfindung auf die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten wird nachstehend im einzelnen beschrieben.

Versuch 1

Stimulierende Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten der Maus und des Menschen in vitro

Kunststoff-Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm werden jeweils mit 1 ml McCoy's 5A Medium beschickt, das 0,05, 0,1, 0,15 bzw. 0,2 µg HGI-Glykoprotein (Probe Nr. 6 von Beispiel 1), 20% foetales Kälberserum, 0,3% Agar und $7,5 \times 10^4$ Knochenmarkzellen von gesunden Menschen oder 25×10^4 Knochenmarkzellen von gesunden Menschen oder Patienten mit Eisenmangelanämie enthalten. Das Medium in den Petrischalen wird in feuchter, 5% CO₂ Atmosphäre 7 bis 9 Tage bei 37°C inkubiert. Der Unterschied in der Zahl der eingepfachten Mäusezellen und Menschenzellen beruht auf der

grösseren Zahl von Stammzellen im Falle der Maus. Nach dem Inkubieren werden Einzelkolonien, die mehr als 50 Zellen von der Maus oder mehr als 40 Zellen vom Menschen enthalten, mit einem umgekehrten Mikroskop (Strahlengang umgekehrt) gezählt. Zur morphologischen Analyse der Kolonien werden einige von ihnen in Mikrohämatokritröhrchen überimpft und mit 0,6prozentigen Orcein in 40prozentiger Essigsäure gefärbt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 wiedergegeben. In dieser Figur ist die Beziehung zwischen der HGI-Glykoproteid-Dosis und der Zahl der in vitro gebildeten Kolonien wiedergegeben. In Fig. 4 bedeuten die Kreise die Mäuseknochenmarkzellen und die Punkte die menschlichen Knochenmarkzellen.

Aus Fig. 4 ist ersichtlich, dass das HGI-Glykoproteid der Erfindung die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkzellen der Maus und des Menschen stimuliert. Es besteht eine Dosis-Reaktions-Beziehung zwischen dem HGI-Glykoproteid und der Zahl der gebildeten Kolonien.

Die morphologische Analyse der Zellen in den Kolonien ergibt, dass alle Zellen reife Granulozyten sind.

Wie vorstehend beschrieben wirkt das HGI-Glykoproteid auf Knochenmarkzellen des Menschen und der Maus unter Bildung von Granulozytenkolonien, wobei die Zahl der Kolonien proportional der Dosis des HGI-Glykoproteids ist. Es besteht eine bestimmte Beziehung zwischen der Bildung der Kolonien der Knochenmarkzellen zwischen Maus und Mensch. Deshalb wurden in allen nachfolgenden Versuchen

nur Knochenmarkzellen der Maus verwendet.

Versuch 2

Stimulierende Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Granulozyten in vivo

60 männliche Mäuse des C₅₇-BL-Stammes mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20 g werden statistisch in 6 Gruppen zu jeweils 10 Tieren unterteilt. Eine Gruppe diente zum Vergleich. Dieser Gruppe wird subcutan 0,04 mg pro Maus humanes Serumalbumin in 0,2 ml steriler normaler Kochsalzlösung einmal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen gegeben. Den restlichen 5 Gruppen wird subcutan 0,005, 0,01, 0,02, 0,03 bzw. 0,04 mg pro Maus HGI-Glykoproteid der Probe Nr. 6 von Beispiel 1, gelöst in 0,2 ml steriler normaler Kochsalzlösung, einmal täglich während drei aufeinanderfolgender Tage gegeben.

Blutproben werden aus der Vena coccygea jeder Maus vor der Injektion und 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach der Injektion entnommen. Die Leukozyten jeder Blutprobe werden mit 1prozentiger Gentiana Violettlösung gefärbt und die Leukozytenzahl wird in einer Bürker-Türk-Zählkammer gezählt.

Weiterhin wird jede Blutprobe auf einen Objektträger aufgestrichen, mit Wright-Giemsa Lösung gefärbt, und der Anteil der Granulozyten bei den Leukozyten wird mikroskopisch bestimmt.

Die Zahl der Granulozyten wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Leukozytenzahl in } 1 \text{ mm}^3 \times \text{Anzahl der Granulozyten in den Leukozyten} = \text{Zahl der Granulozyten in } 1 \text{ mm}^3$$

Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V

Gruppe Dosis, mg Tage	Vergleichsgruppe	1 0,005	2 0,01	3 0,02	4 0,03	5 0,04
0	450	452	455	450	448	445
2	380	420	550	600	775	800
4	372	390	800	1100	1400	1420
6	380	395	1100	1800	2200	2100
8	410	400	620	750	980	971
10	430	410	470	460	465	480

Anm.: Die Zahlenwerte stellen die Zahlenmittel der Granulozyten pro mm³ für 10 Mäuse dar.

Aus Tabelle V ist ersichtlich, dass die periphere Granulozytenzahl der Versuchsgruppen, denen 0,01 bis 0,04 mg pro Maus HGI-Glykoproteid gegeben wurde, zwei Tage nach der Verabfolgung zunahm und nach 6 Tagen den 3- bis 6fachen Wert der Vergleichsgruppe erreichte.

Die Granulozytenzahl nimmt danach wieder ab und nach 10 Tagen ist wieder der Normalwert erreicht. Bei Steigerung der Tagesdosis auf mehr als 0,04 mg zeigt sich keine signifikante Zunahme der Granulozyten entsprechend der Dosis des HGI-Glykoproteids.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch tägliche Injektion von mindestens 0,01 mg, vorzugsweise 0,01 bis 0,03 mg HGI-Glykoproteid einer Maus mit einem mittleren Körpergewicht von etwa 20 g Granulozytose erzeugt werden kann. Da die stimulierenden Wirkungen des HGI-Glykoproteins auf Mäuseknochenmarkzellen in vitro durchschnittlich etwa 1,5mal höher sind als die Wirkung auf menschliche Knochenmarkzellen (Versuch 1), ist die wirksame Dosis für den Menschen 1,5mal so hoch wie für die Maus, bestimmt in vivo nach Versuch 2. Dementsprechend liegt die wirksame Tagesdosis beim Menschen pro kg Körpergewicht bei mindestens etwa 0,75 mg, vorzugsweise 0,75 bis 2,24 mg.

Versuch 3

Schutzwirkung des HGI-Glykoproteids durch Zytostatika hervorgerufener Leukozytopenie

30 männliche, 4 bis 5 Wochen alte Mäuse des C₅₇BL-Stammes werden statistisch in drei Gruppen zu je 10 Tieren unterteilt. Der Vergleichsgruppe wird intraperitoneal 30 mg pro kg Körpergewicht (entspricht 1/10 LD₅₀) Cytosin-D-arabinsid, gelöst in 0,2 ml steriler normaler Kochsalzlösung einmal täglich während 14 aufeinanderfolgender Tage gegeben. Zusätzlich werden 0,2 ml pro Maus sterile normale Kochsalzlösung subcutan einmal täglich während 14 aufeinanderfolgende Tage gegeben. Der ersten Versuchsgruppe wird Cytosin-D-arabinsid wie der Vergleichsgruppe gegeben. Zusätzlich werden 0,03 mg pro Maus HGI-Glykoproteid der Probe Nr. 6 von Beispiel 1 subcutan einmal täglich während 14 aufeinanderfolgender Tage gegeben. Der restlichen Versuchsgruppe wird ebenfalls Cytosin-D-arabinsid wie der Vergleichsgruppe gegeben sowie subcutan 0,3 mg pro Maus Cepharrantin, gelöst in 0,2 ml steriler normaler Kochsalzlösung, einmal täglich während 14 aufeinanderfolgender Tage.

Blutproben werden aus der Vena coccygea jeder Maus vor

der Verabfolgung und am 2., 4., 6., 8., 10., 12. und 14. Tag nach der Verabfolgung entnommen. Die Leukozytenzahl wird wie in Versuch 2 bestimmt und die prozentuale Abnahme (Dekrement) der Leukozytenzahl nach der Verab-

folgung wird erhalten. Die Leukozytenzahl vor der Verabfolgung wird zu 100 angenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI

Gruppe	Vergleichsgruppen		HGI-Glykoprotein-Gruppe		Cepharantin-Gruppe	
	Leukozytenzahl ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Dekrement (%)	Leukozytenzahl ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Dekrement (%)	Leukozytenzahl ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Dekrement (%)
Tage nach Verabreichung						
vor der Verabreichung	150	100	150	100	150	100
2	130	86,6	120	80,0	125	83,3
4	125	83,3	125	83,3	120	80,0
6	120	80,0	130	86,6	120	80,0
8	110	73,3	120	80,0	110	73,3
10	95	63,3	120	80,0	100	66,6
12	80	53,3	115	76,6	105	70,0
14	70	46,6	110	73,3	95	63,3

Anm.: Jeder Zahlenwert ist der Durchschnittswert für 10 Mäuse.

Im Vergleich zur Vergleichsgruppe zeigt die HGI-Glykoprotein-Gruppe eine ausgeprägte Schutzwirkung gegenüber der Verminderung der Leukozytenzahl 10 Tage nach Beginn der HGI-Glykoprotein-Verabfolgung. Der Effekt ist mindestens ebenso gut wie der von Cepharantin. Am 14. Tag nach Beginn der Behandlung ist die Leukozytenzahl der Vergleichsgruppe auf 46,6% vermindert, während die der HGI-Glykoprotein-Gruppe 73,3% beträgt. Die Verminderung ist geringer als die bei der Cepharantin-Gruppe. Aus diesen Werten ist ersichtlich, dass das HGI-Glykoprotein sich wirksam eignet zur Therapie der menschlichen Leukozytopenie.

Weitere Versuche ergaben, dass das HGI-Glykoprotein der Erfindung auch gegenüber anderer Zytostatika wirksam ist, beispielsweise 5-Fluoruracil und Daunomycin, die eine Verminderung der Leukozytenzahl ähnlich dem Cytosin-D-arabinsid hervorrufen. Humanes Serumalbumin hat keine vorbeugende Wirkung bei der Verminderung der Leukozytenzahl unter den gleichen Versuchsbedingungen.

Versuch 4

Akute Toxizität des HGI-Glykoproteids

Die akute Toxizität des HGI-Glykoproteids, hergestellt gemäss Beispiel 1, Probe Nr. 4 und Nr. 6, wird an männlichen Mäusen des C₅₇BL-Stammes nach der Methode von Litchfield und Wilcoxon [Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Bd. 90 (1949), S. 99] berechnet. Das Glykoprotein wird in einer Dosis von 4000 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal bzw. 2000 mg pro kg Körpergewicht intravenös gegeben. Infolgedessen war eine Abschätzung der LD₅₀ praktisch unmöglich. Die LD₅₀ liegt bei subcutaner Injektion oberhalb 4000 mg pro kg und oberhalb 2000 mg pro kg bei intravenöser Injektion.

Beispiel 1

400 Liter frischer Urin von gesunden Menschen wird mit 10prozentiger Natronlauge auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und in einer Durchlaufzentrifuge bei 15 000 $\times$ g und 0°C zur Abtrennung unlöslicher Substanzen zentrifugiert. Der Überstand wird mit 10prozentiger Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und auf eine mit Kieselgel gefüllte Säule mit den Abmessungen 10 $\times$ 80 cm aufgesetzt. Die am Kieselgel adsorbierten Substanzen werden mit 40 Liter 5prozentiger Ammoniaklösung eluiert. Das erhaltene Eluat wird mit 1n Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt

und mit Ammoniumsulfat bis zu 70prozentiger Sättigung versetzt. Sodann wird die Lösung 15 bis 18 Stunden bei 0°C stehengelassen. Die entstandene Fällung wird abfiltriert, in 2 Liter 5prozentiger wässriger Ammoniaklösung gelöst, in Cellophanschläuche abgefüllt und gegen 0,05M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 6,5 dialysiert. Das Retentat wird mit der gleichen Pufferlösung auf 10 Liter aufgefüllt und auf eine mit CM Sephadex C-50 gefüllte Säule mit den Abmessungen 40 $\times$ 40 cm aufgesetzt. Diese Säule war mit 0,05M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 6,5 äquilibriert worden. An dem Ionenaustauscher werden Verunreinigungen adsorbiert. 10 Liter der Elutionslösung werden mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Amicon DC-30; Molekulargewichtstrenngrenze etwa 10 000) konzentriert. Die konzentrierte Lösung wird gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 bei 5°C während 15 bis 18 Stunden dialysiert. Das Retentat wird mit der gleichen Pufferlösung auf 1 Liter aufgefüllt. Die erhaltene Lösung wird als Probe Nr. 1 bezeichnet.

Die erhaltene Lösung wird durch eine DEAE-Cellulosesäule mit den Abmessungen 4,0 $\times$ 40 cm geleitet, die vorher mit 0,1M tris-HCl-Puffer vom pH 7,0 äquilibriert worden war. Sodann wird die Säule mit einem ausreichenden Volumen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH 7,0 gewaschen. Hierauf wird stufenweise mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0, der 0,3M an Natriumchlorid ist, eluiert. Die Fraktionen, die eine Proliferation und Differenzierung von Granulozyten bewirken, wie dies in Versuch 1 beschrieben ist, werden aufgefangen und gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 dialysiert. Diese Lösung wird als Probe Nr. 2 bezeichnet.

Die dialysierte Lösung (das Retentat) wird erneut auf eine mit DEAE Cellulose gefüllte Säule mit den Abmessungen 4,0 $\times$ 40 cm aufgesetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden war. Sodann wird die Säule mit einem linearen Konzentrationsgradient von 0 bis 0,3M Kochsalzlösung eluiert. Die das Glykoprotein enthaltenden aktiven Fraktionen werden aufgefangen und mit Ammoniumsulfat bis 70prozentiger Sättigung versetzt. Die entstandenen Fällungen werden abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gelöst und gegen die gleiche Pufferlösung dialysiert. Diese dialysierte Lösung (Retentat) wird als Probe Nr. 3 bezeichnet.

20 ml der dialysierten Lösung werden auf eine mit Sephadex G-150 gefüllte Säule mit den Abmessungen

4,0×60 cm aufgesetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden war. Die Elutionsfraktionen bei einem V_e/V_o Verhältnis von 1,11 bis 1,45 werden aufgefangen. Die vereinigten Fraktionen werden gegen destilliertes Wasser bei 5°C gründlich dialysiert. Sodann wird die dialysierte Lösung (Retentat) gefriergetrocknet. Es werden etwa 500 mg eines Pulvers erhalten. Dieses halbgereinigte HGI-Glykoprotein wird als Probe Nr. 4 bezeichnet.

200 mg des halbgereinigten HGI-Glykoproteids werden in 0,02 M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7,0 gelöst, die 1,0M an Natriumchlorid ist, und auf eine mit 100 ml Concanavalin A-Sepharose 4B gefüllte Säule aufgesetzt, die mit der gleichen Pufferlösung äquilibriert worden war. Nach gründlichem Waschen der Säule mit dem gleichen Puffer wird das HGI-Glykoprotein mit 0,02M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7,0 eluiert, die 50mM an α -Methyl-D-glucosid und 1,0M an Natriumchlorid ist. Diejenigen Fraktionen, die in vitro eine Proliferation und Differenzierung von Granulozyten hervorrufen, werden aufgefangen und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung (Retentat) wird gefriergetrocknet. Dieses Präparat wird als Probe Nr. 5 bezeichnet.

Etwa 50 mg des erhaltenen gefriergetrockneten Pulvers werden in 1 ml einer 0,125M tris-Glykokoll-Pufferlösung vom pH-Wert 6,8 gelöst, die 10% Glycerin enthält. Die erhal-

tene Lösung wird bei 10 mA unter Kühlung mittels einer präparativen Elektrophoresevorrichtung (Typ Fuji Kabara II) unter Verwendung von 8% Acrylamidgel (pH 8,9; 20 mm × 25 mm) der Elektrophorese unterworfen. Die Fraktion mit einer relativen Beweglichkeit von 0,46 wird mit 0,025M tris-Glykokoll-Puffer vom pH-Wert 8,3 isoliert und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung (Retentat) wird gefriergetrocknet. Es werden etwa 10 mg des HGI-Glykoproteids erhalten, das als Probe Nr. 6 bezeichnet wird.

Die in den verschiedenen Herstellungsstufen erhaltenen Proben Nr. 1 bis 6 werden auf Proliferation und Differenzierung der Knochenmarkzellen sowohl des Menschen als auch der Maus gemäss Versuch 1 untersucht. Das HGI-Glykoprotein oder das dieses Glykoprotein enthaltende Präparat wird dem Medium in solcher Menge zugesetzt, dass sich pro Petrischale 200 Kolonien bilden. Die spezifische Aktivität wird nach folgender Gleichung berechnet, wobei eine Einheit einer gebildeten Kolonie entspricht.

$$\text{Spezifische Aktivität (Einheiten/mg)} = \frac{\text{Zahl der gebildeten Kolonien (Einheiten)}}{\text{Proteingehalt (mg) der geprüften Probe}}$$

Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefasst.

Tabelle VII

Probe	Mäuseknochenmark-Zelltest		Menschenknochenmark-Zelltest	
	spezifische Aktivität (Einheiten/mg)	Facher Reinigungsgrad	Spezifische Aktivität (Einheiten/mg)	Facher Reinigungsgrad
Nr. 1	260	1	160	1
Nr. 2	4 500	17,3	2 200	13,8
Nr. 3	11 000	42,3	5 500	34,4
Nr. 4	57 000	219,2	35 000	218,8
Nr. 5	210 000	807,7	180 000	1125,0
Nr. 6	1 000 000	3846,1	670 000	4187,5

Beispiel 2

100 mg des HGI-Glykoproteidpulvers (Probe Nr. 6 von Beispiel 1) werden mit 100 ml einer wässrigen Lösung versetzt, die 5% humanes Serumalbumin und 1% Glykokoll enthält. Die erhaltene Lösung wird durch Filtration mittels Membranfiltern einer Porengrösse von 0,45 μ sterilisiert. Sodann wird die sterilisierte Lösung aseptisch in 1 ml Anteilen in Gefässe abgefüllt, die vorher durch zweistündiges Erhitzen auf 180°C sterilisiert worden sind. Nach dem Gefrier Trocknen werden die Gefässe hermetisch verschlossen. Auf diese Weise werden 95 Ampullen eines Arzneistoffs zur Behandlung von Leukozytopenie erhalten. Jede Ampulle enthält 1 mg HGI-Glykoprotein.

Beispiel 3

Auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise wird 1 Liter einer konzentrierten, HGI-Glykoprotein enthaltenden Lösung hergestellt (analog Probe Nr. 1), und zwar aus 1000 Liter frischem Urin von gesunden Menschen. Diese konzentrierte Lösung wird mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 verdünnt. Nach gründlichem Rühren wird die verdünnte Lösung auf etwa $\frac{1}{10}$ ihres ursprünglichen Volumens mittels einer DIAFLO Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung eingengt. Die erhaltene konzentrierte Lösung wird mit 5 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 und 5 Litern einer DEAE-Cellulosesuspension versetzt, die 300 g DEAE Cellulose (auf Trockenbasis berechnet) enthält, und die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert

7,0 äquilibriert worden waren. Das Gemisch wird 30 Minuten gerührt, sodann 10 Minuten stehengelassen und schliesslich auf einen Büchnertrichter unter vermindertem Druck filtriert. Es wird die DEAE-Cellulose erhalten. Sodann wird die abfiltrierte DEAE-Cellulose mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gewaschen und erneut auf dem Büchnertrichter abfiltriert. Hierauf wird die DEAE-Cellulose mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gewaschen, die 0,05M an Natriumchlorid ist, und in gleicher Weise auf dem Büchnertrichter abfiltriert. Die auf diese Weise behandelte DEAE-Cellulose wird mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 versetzt, die 0,3M an Natriumchlorid ist, und gerührt, um das HGI-Glykoprotein von der DEAE-Cellulose abzutrennen. Das Gemisch wird auf einem Büchnertrichter abfiltriert und das Filtrat durch DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltration entsalzt. Die erhaltene entsalzte Lösung wird gefriergetrocknet. Es werden etwa 15 g eines Pulvers erhalten. Das Pulver wird in 150 ml destilliertem Wasser gelöst und auf eine mit Sephadex G-150 gefüllte Säule der Abmessungen 6,0×80 cm aufgesetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden war. Es werden die Fraktionen entsprechend dem V_e/V_o Verhältnis von 1,11 bis 1,60 aufgefangen. Die vereinigten Fraktionen werden gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert. Sodann wird die dialysierte Lösung (Retentat) mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Typ DC-2) auf etwa 100 ml Konzentrat eingengt, das etwa 3 g rohes HGI-Glykoprotein enthält. Die

konzentrierte Lösung wird mit 1 g Glykokoll und 5 g Serumalbumin gewaschen. Die erhaltene Lösung wird gemäss Beispiel 1 durch Filtration sterilisiert und sodann aseptisch in 2,5 ml Anteilen in Ampullen abgefüllt. Nach aseptischer Gefriertrocknung werden die Ampullen hermetisch verschlossen. Es werden 40 Ampullen eines Arzneistoffs zur Bekämpfung von Leukozytopenie erhalten. Jede Ampulle enthält etwa 3,8 mg HGI-Glykoprotein.

Für die klinische Anwendung ist es wichtig, pathogene Viren, die im Urin enthalten sind und die Hepatitis und andere Krankheiten verursachen, aus dem HGI-Glykoprotein abzutrennen. Dies erfolgt durch Hitzeinaktivierung analog der Hitzeinaktivierung der Viren in Serumalbumin durch 10stündiges Erhitzen auf 60°C. Zur Durchführung einer 10stündigen Hitzeinaktivierung bei 60°C müssen die zu behandelnden Substanzen unter diesen Bedingungen stabil sein. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Stabilisatoren entwickelt. Zur Stabilisierung humaner Serumproteine gegen Wärme werden verschiedene Aminosäuren oder Saccharide bei physiologisch isotonischer Konzentration oder darunter verwendet. Bei der thermischen Inaktivierung von Viren in HGI-Glykoprotein geht die biologische Aktivität des Glykoproteids durch 10stündiges Erhitzen auf 60°C verloren.

Es wurde festgestellt, dass unter folgenden Bedingungen die Hitzestabilität des HGI-Glykoproteids in wässriger Lösung verbessert werden kann und seine charakteristischen Eigenschaften nicht verlorengehen. Das HGI-Glykoprotein ist stabil gegen Hitzebehandlung bei pH 5 bis 9, wenn Albumin in der Lösung in einer Konzentration von mindestens 2% vorliegt oder die Konzentration des HGI-Glykoproteids in der Lösung mindestens 70 mg pro ml beträgt, oder wenn menschliche Proteine aus dem Urin in einer Konzentration von mindestens 70 mg pro ml vorliegen.

Die Erfindung stellt somit ein HGI-Glykoprotein zur Verfügung, das zur Inaktivierung von Viren einer thermischen Inaktivierung unterworfen werden kann. Diese thermische Inaktivierung besteht im Erhitzen einer wässrigen Lösung des HGI-Glykoproteids, das gegen Erhitzung auf 50 bis 70°C, vorzugsweise 55 bis 65°C während 8 bis 30 Stunden, vorzugsweise 8 bis 12 Stunden und bei einem pH-Wert von 5 bis 9 stabilisiert worden ist.

Bei Verwendung von Albumin als Stabilisator ist der Reinigungsgrad des in der wässrigen Lösung enthaltenen HGI-Glykoproteids nicht kritisch, doch werden HGI-Glykoprotein-Fractionen einer Reinheit entsprechend denen der Proben Nr. 4 bis Nr. 6 von Beispiel 1 bevorzugt.

Die Konzentration des HGI-Glykoproteids in der der Wärmebehandlung zu unterwerfenden wässrigen Lösung beträgt vorzugsweise mindestens 0,1% (Gewicht pro Volumen, d.h. Zahl der Gewichtseinheiten in 100 Volumeneinheiten; das gleiche trifft nachstehend für die wässrige Lösung zu), vorzugsweise 0,5 bis 15%. Die wässrige Lösung wird bevorzugt auf einen pH-Wert von 5 bis 9, vorzugsweise 6 bis 8, mit einer Säure oder Base, vorzugsweise einer Pufferlösung, eingestellt. Das verwendete Albuminpräparat kann von menschlichem Serum oder menschlicher Placenta stammen. Beide Präparate wurden vorzugsweise für medizinische Zwecke gereinigt, und sie haben eine Reinheit von mindestens 80%, bestimmt durch Elektrophorese. Die zur wässrigen HGI-Glykoprotein-Lösung zugesetzte Menge an Albumin beträgt normalerweise mindestens 2,0, vorzugsweise 10 bis 20%. Die obere Grenze der zugesetzten Menge des Albumins ist nicht besonders kritisch, und die geeignete Menge hängt vom gestatteten Anteil des Albumins im Endprodukt ab.

Bei Verwendung von humanem Albumin zum Stabilisieren des HGI-Glykoproteids gegen Wärme ist die Gefahr der Verunreinigungen des Endprodukts mit antigenen Substanzen

ausgeschlossen, und es wird eine wirksame Stabilisierung des Glykoproteids gegen Hitzeinaktivieren erreicht. Da Albumin ausserdem die Stabilität der Glykoproteinpräparate sicherstellt, ist die Abtrennung des Albumins nach der Wärmebehandlung nicht erforderlich, sofern eine geeignete Menge bei der Wärmebehandlung verwendet wird. Deshalb stellt die Wärmebehandlung nach dem Verfahren der Erfindung eine bevorzugte Ausführungsform zur Herstellung eines nicht-infektiösen HGI-Glykoproteids dar.

10

Versuch 5

Die Wirkung der Wärmebehandlung in Gegenwart von Albumin auf die Infektiosität durch Viren wird unter Verwendung verschiedener Viren untersucht, die möglicherweise HGI-Glykoprotein-Präparate verunreinigen können.

Die HGI-Glykoprotein-Probe Nr. 4 von Beispiel 1 wird in Wasser in einer Menge von 100 mg pro ml gelöst. Diese Lösung wird mit 0,2 ml einer Virussuspension mit einer virusinfektiösen Dosis von 1×10^5 bis 1×10^6 pro 0,2 ml (gemessen nach der nachstehend beschriebenen Methode) Pockenvirus, Mumpsvirus, Masernvirus, Herpesvirus, Chikungunyavirus, Japanisches Encephalitisvirus, Rubellavirus, Poliovirus, Coxsackievirus oder ECHO-Virus sowie anschliessend 0, 20, 100 oder 200 mg pro ml humanes Serumalbumin versetzt. Die erhaltene Lösung wird mit 0,1 M tris-HCl-Pufferlösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und sodann 10 Stunden auf 60°C erhitzt, hierauf sofort in eiskaltem Wasser abgekühlt, entsalzt und durch Membranfiltration sterilisiert und schliesslich gefriergetrocknet. Die biologische Aktivität und die Virusinfektion werden nach den nachstehend beschriebenen Methoden bestimmt und mit den Werten verglichen, die vor der Wärmebehandlung erhalten wurden.

Die biologische Aktivität wird anhand der Koloniebildung von Mäuseknochenmarkzellen in vitro bestimmt. Petri-Kunststoffschalen mit einem Durchmesser von 35 mm werden mit 1,0 ml supplementiertem McCoy 5A Medium versetzt, das 20% foetales Kälberserum, 10% (0,1 ml) Probe, 0,3% Agar, $7,5 \times 10^4$ Mäuseknochenmarkzellen und 10% (0,1 ml) der Probe enthält. Die Konzentration jeder Probe wird auf den gleichen Wert eingestellt. Nach 7tägiger Inkubation in feuchter 5prozentiger Kohlendioxidatmosphäre werden Einzelkolonien mit mehr als 50 Zellen mit dem umgekehrten Mikroskop gezählt. Das prozentuale Verhältnis der Zahl der nach der Wärmebehandlung gebildeten Kolonien zu der Zahl der Kolonien vor der Wärmebehandlung wird als Wiedergewinnung der biologischen Aktivität bezeichnet.

Die virusinfektiöse Dosis wird folgendermassen bestimmt: Pockenvirus wird auf HeLa-Zellen überimpft und die Plaques-bildenden Einheiten [Virology, Bd. 36 (1968), S. 174 bis 179] werden mit den gleichen Zellen bestimmt. Nachfolgende Transplantate von Mumpsvirus, Masernvirus und Japanischem Encephalitisvirus werden mit Vero-Zellen durchgeführt. Diejenigen mit Poliovirus, Coxsackievirus und ECHO-Virus werden mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Infektiosität jedes Virus wird durch Bestimmung der 50prozentigen infektiösen Dosis für die Gewebekultur bestimmt (National Institute of Health, Japan, «Experimental Virology», Maruzen Co., Tokyo, 1967). Als Indikator wird der zytopathische Effekt benutzt. Die Beobachtungszeit beträgt 10 Tage.

Herpesvirus und Chikungunyavirus werden nacheinander in FL-Zellen und Vero-Zellen überimpft. Sodann werden die Plaques-bildenden Einheiten bestimmt.

Rubellavirus wird nacheinander in BHK-21-Zellen überimpft. Die Plaques-bildenden Einheiten werden an Vero-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengefasst.

Tabelle VIII

Konzentration an humanem Serumalbumin (mg/ml)	Vor dem Erhitzen		Nach dem Erhitzen		Wiedergewinnung der biologischen Aktivität (%)
	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Virusinfektion	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Virusinfektion	
200	116	ja	128	nein	110,3
100	124	ja	134	nein	108,1
20	118	ja	51	nein	43,2
0 (Vergleich)	121	ja	0	nein	0

Aus Tabelle VIII ist ersichtlich, dass nach 10stündigem Erhitzen auf 60°C die virale Infektiosität bei jeder Probe vollständig verlorengegangen war, unabhängig davon, ob Albumin zugesetzt worden war oder nicht. Dies zeigt, dass andere Viren ebenfalls durch Wärmebehandlung nach dem Verfahren der Erfindung inaktiviert werden können. Es wurde festgestellt, dass die biologische Aktivität des HGI-Glykoproteids in den Proben aufrechterhalten bleibt, die Albumin enthalten. Dies zeigt, dass das Albumin ein wirksamer Stabilisator ist.

Die Ergebnisse der Wärmebehandlung unter unterschiedlichen Bedingungen sind ähnlich den vorstehend erwähnten.

Im nächsten Versuch wird der pH-Wert der wässrigen Albuminlösung, die HGI-Glykoprotein enthält, variiert, um die Änderung der biologischen Aktivität nach der Wärmebehandlung zu bestimmen.

Versuch 6

Das in Versuch 5 verwendete HGI-Glykoprotein wird in Wasser zu einer Lösung mit einer Konzentration von 20 mg pro ml gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit 100 mg pro ml humanem Serumalbumin versetzt. Es werden Lösungen mit einem pH-Wert von 2 bis 10 mit Abständen von 1 Einheit folgendermassen hergestellt: pH-Wert 2 bis 6, 0,1M Citronensäure-Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7 bis 10, 0,1M tris-HCl-Puffer. Jede Probe wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt. Sodann wird die restliche biologische Aktivität gemäss Versuch 5 bestimmt. Das prozentuale Verhältnis der Zahl der Kolonien, die nach der Wärmebehandlung entstanden sind, zu der Zahl der Kolonien vor der Wärmebehandlung, wird als Wiedergewinnung der biologischen Aktivität bezeichnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IX zusammengefasst. Die biologische Aktivität des HGI-Glykoproteids bleibt im pH-Bereich von 5 bis 9 gut erhalten. Dies zeigt, dass ein Einstellen des pH-Wertes der HGI-Glykoproteidlösung auf diesen Bereich vor der Wärmebehandlung erforderlich ist.

Tabelle IX

pH-Wert	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Wiedergewinnung der biologischen Aktivität
vor der Wärmebehandlung	86	100,0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	82	95,3
6	96	111,6
7	118	137,2
8	100	116,3
9	68	79,1
10	0	0

Bei einem später beschriebenen Versuch wird eine wässrige

Lösung, die mindestens 70 mg pro ml HGI-Glykoprotein enthält, mit einer Säure oder Base auf einen pH-Wert von 2 bis 10 eingestellt, und es wird die Wiedergewinnung der biologischen Aktivität nach der Wärmebehandlung bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Wiedergewinnung der biologischen Aktivität etwa 40 bis 50% bei einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 beträgt, während die biologische Aktivität einer wässrigen Lösung des HGI-Glykoproteids bei einem pH-Wert unterhalb 5 oder oberhalb 9 nach der Wärmebehandlung vollständig verschwunden ist.

Versuch 7

Es wird die Abhängigkeit der Wirkung der Wärmebehandlung auf die Konzentration des HGI-Glykoproteids in der wässrigen Lösung untersucht.

Das gereinigte HGI-Glykoprotein von Probe Nr. 6 von Beispiel 1 wird in Wasser gelöst und mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Sodann wird die Lösung auf Endkonzentrationen von 10, 50, 60, 70, 80, 100, 150 bzw. 200 mg pro ml eingestellt. Jede Lösung wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt, sodann rasch in Eiswasser abgekühlt, durch Filtration sterilisiert und gefriergetrocknet. Die biologische Aktivität jeder Probe wird gemäss Versuch 5 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle X zusammengefasst.

Tabelle X

Konzentration des HGI-Glykoproteids (mg/ml)	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Wiedergewinnung der biologischen Aktivität
10	0	0
50	31	25,4
60	35	28,2
70	44	35,5
80	50	40,3
100	51	41,1
150	53	42,7
200	56	45,2
vor der Wärmebehandlung	124	100,0

Aus Tabelle X ist ersichtlich, dass bei einer Konzentration des HGI-Glykoproteids von 50 mg pro ml die Wiedergewinnung der biologischen Aktivität nach der Wärmebehandlung 25,4% beträgt. Zur Wiedergewinnung einer biologischen Aktivität von mindestens 35% nach der Wärmebehandlung muss die Konzentration des HGI-Glykoproteids mindestens 70 mg pro ml, vorzugsweise 100 bis 200 mg pro ml betragen.

Versuch 8

Das in Versuch 5 verwendete HGI-Glykoprotein wird in Wasser gelöst und verschiedene pH-Werte im Bereich von 2 bis 10 eingestellt. Für den pH-Bereich von 2 bis 6 wird 0,01M Citronensäure-Natriumphosphat-Pufferlösung und für den

pH-Bereich von 7 bis 10 0,1M tris-HCl-Pufferlösung verwendet. Jede Lösung wird mit destilliertem Wasser auf eine Endkonzentration von 100 mg pro ml eingestellt und 10 Stunden auf 60°C erhitzt, sodann rasch in Eiswasser abgekühlt und gemäss Versuch 5 auf die biologische Aktivität untersucht. Ein Teil der Lösung (pH 4,5) vor der Einstellung des pH-Werts wird als Vergleichsprobe verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle XI zusammengefasst.

Tabelle XI

pH-Wert	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Wiedergewinnung der biologischen Aktivität (%)
vor der Wärmebehandlung	136	100
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	51	37,5
6	54	39,7
7	59	43,3
8	63	46,3
9	49	36,0
10	0	0
pH nicht eingestellt	0	0

Aus Tabelle XI ist ersichtlich, dass bei einem pH-Wert der HGI-Glykoproteidlösung im Bereich von 5 bis 9 die Wiedergewinnung der biologischen Aktivität 36,0 bis 46,3% beträgt. Bei einem pH-Wert unterhalb 5 oder oberhalb 9 geht die biologische Aktivität vollständig verloren. Aus den Ergebnissen der Versuche 7 und 8 ergibt sich, dass bei der Wärmebehandlung der HGI-Glykoproteidlösung die Konzentration des Glykoproteids mindestens 70 mg pro ml betragen und der Ph-Wert im Bereich von 5 bis 9 liegen soll.

Versuch 9

Versuch 5 wird wiederholt, jedoch wird das HGI-Glykoprotein in Wasser in einer Konzentration von 200 mg pro ml gelöst. Es wird kein Serumalbumin zugesetzt, und die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Nach der Wärmebehandlung wird wie in Versuch 5 nur die virusinfektiöse Dosis bestimmt. In diesem Beispiel ist die Virusaktivität vollständig verloren gegangen. Das Ergebnis zeigt, dass andere als die verwendeten Viren ebenfalls durch die Wärmebehandlung nach dem erfindungsgemässen Verfahren inaktiviert werden können.

Das vorstehend beschriebene Verfahren der Virusinaktivierung durch Erhitzen in Gegenwart eines Stabilisators wird auf HGI-Glykoprotein-Präparate mit bestimmtem Reinheitsgrad angewendet. Deshalb wurde nach einem praktischen Verfahren gesucht, das unmittelbar zur Herstellung eines

gereinigten HGI-Glykoproteids verwendet werden kann. Im Laufe dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass die HGI-Glykoproteidlösung, die mindestens 70 mg pro ml eines Proteins aus dem als Ausgangsmaterial eingesetzten Urin enthält, eine wärmebeständige Lösung für diesen Zweck darstellt. Dieses neue Verfahren zum Stabilisieren der HGI-Glykoproteidlösung gegen Erwärmung wird nachstehend näher beschrieben.

1 Liter frischer Urin von gesunden Menschen enthält normalerweise 30 bis 50 mg Proteine. Diese Proteine des Urins werden durch Ultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie, Adsorption an Kieselgel, Aussalzen oder eine Kombination dieser Methoden, konzentriert. Die Proteine aus Urin einschliesslich des HGI-Glykoproteids, werden unter vermindertem Druck weiter eingedampft, um den Proteingehalt auf einen Wert von mindestens 70, vorzugsweise 100 bis 150 mg pro ml zu bringen. Wenn der Proteingehalt der HGI-Glykoprotein enthaltenden Fraktion unter 70 mg pro ml liegt, fällt die biologische Aktivität des HGI-Glykoproteids beim Erhitzen sehr stark ab. Obwohl jede rohe Fraktion mit 70 mg pro ml oder mehr Proteinen aus Harn dem Zweck dient, wird eine Rohfraktion, die im vorstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung des HGI-Glykoproteids der Erfindung erhalten wird, vorzugsweise für das neue Stabilisierungsverfahren verwendet. Die Rohfraktion wird auf einen Urin-Proteingehalt von mindestens 70 mg pro ml und einen pH-Wert von 5 bis 9, vorzugsweise 6 bis 8, eingestellt.

Die erhaltene hitzestabilisierte HGI-Glykoproteidlösung wird gegebenenfalls nach Reinigung nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren der Wärmebehandlung unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen unterworfen, und es wird eine Fraktion erhalten, die unmittelbar als Arzneistoff eingesetzt werden kann.

Versuch 10

Beispiel 1 wird wiederholt. Es wird eine HGI-Glykoprotein enthaltende Fraktion analog Probe Nr. 1 erhalten, mit Ausnahme folgender Modifikation:

Das durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat bis zu 70prozenter Sättigung erhaltene Präzipitat wird in 8 Anteile unterteilt. Jeder Teil wird in Wasser gelöst und mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die erhaltenen 8 Lösungen werden auf einen Proteingehalt von 10, 50, 60, 70, 80, 100, 150 bzw. 200 mg pro ml eingestellt. Jede Lösung wird weiter in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt, die andere bleibt unbehandelt.

Sämtliche Lösungsproben werden gemäss Beispiel 1 weitergereinigt bis auf den Reinigungsgrad der Probe Nr. 4 von Beispiel 1. Es werden auf diese Weise zwei Reihen von Proben mit unterschiedlichem Proteingehalt erhalten. Die eine Reihe (Testproben) ist hitzebehandelt, die andere Reihe (Vergleichsproben) unbehandelt. Jede Probe wird auf ihre biologische Aktivität gemäss Versuch 5 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle XII zusammengefasst.

Tabelle XII

	Probe Nr.	Proteingehalt (mg/ml)	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Wiedergewinnung der biologischen Aktivität (%)
Vergleichsprobe	1	10	106	—
	2	50	111	—
	3	60	115	—
	4	70	106	—
	5	80	110	—
	6	100	118	—
	7	150	120	—
	8	200	137	—

Tabelle XII (Fortsetzung)

	Probe Nr.	Proteingehalt (mg/ml)	Zahl der Kolonien pro 0,1 ml	Wiedergewinnung der biologischen Aktivität (%)
Testprobe	9	10	45	42,5
	10	50	89	80,2
	11	60	98	85,2
	12	70	104	98,1
	13	80	109	99,1
	14	100	121	102,5
	15	150	123	102,5
	16	200	141	102,9

Beispiel 4

Das Verfahren gemäss Beispiel 1 wird mehrmals wiederholt zur Herstellung von 100 mg HGI-Glykoprotein entsprechend dem Reinheitsgrad der Probe Nr. 6. 100 mg des erhaltenen gereinigten Glykoproteids werden mit 100 ml 10prozentigem humanem Serumprotein als Stabilisator versetzt. Die erhaltene Lösung wird mit 10prozentiger Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, 10 Stunden auf 60°C erhitzt und unmittelbar darauf rasch in Eiswasser abgekühlt und durch Filtration durch ein Membranfilter mit einer Porengrösse von 0,45 µ sterilisiert. Jeweils 1 ml der erhaltenen sterilisierten Lösung werden aseptisch in Glasampullen abgefüllt, die vorher 2 Stunden bei 180°C sterilisiert worden sind. Nach dem Gefriertrocknen unter aseptischen Bedingungen werden die Ampullen abgeschmolzen. Es werden 97 Ampullen mit jeweils 1 mg eines Präparats mit hitzebehandeltem HGI-Glykoprotein erhalten.

Die erhaltenen Präparate werden auf ihre biologische Aktivität und virale Infektiosität gemäss Versuch 5 untersucht. Die biologische Aktivität ist vergleichbar mit der einer unbehandelten Probe, und es kann keine virale Infektiosität festgestellt werden.

Beispiel 5

1000 Liter frischer Urin von gesunden Menschen wird gemäss Beispiel 1 behandelt. Die Elutionsflüssigkeit aus der CM Sephadex C-50 Säule wird auf 1 Liter rohe HGI-Glykoproteidlösung konzentriert. Das Rohkonzentrat wird mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 versetzt, gründlich gerührt und erneut auf etwa 1 Liter mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung eingengt. Das Konzentrat wird mit 5 Liter 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 sowie 5 Liter einer DEAE-Cellulosesuspension (300 g DEAE-Cellulose auf Trockenbasis) versetzt, das vorher mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden ist. Das Gemisch wird 30 Minuten gerührt und nach dem Stehen unter vermindertem Druck filtriert. Die abfiltrierte DEAE-Cellulose wird mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gewaschen. Sodann wird die DEAE-Cellulose unter vermindertem Druck abfiltriert und nochmals mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung gewaschen, die 0,05M an Natriumchlorid ist. Hierauf wird die DEAE-Cellulose unter vermindertem Druck abfiltriert. Die abfiltrierte DEAE-Cellulose wird mit 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 versetzt, die 0,3M an Natriumchlorid ist, und zur Eluierung der HGI-Glykoprotein-Fraktion gerührt. Das Eluat wird mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Typ DC-30) entsalzt. Die entsalzte Fraktion wird gefriergetrocknet. Es werden etwa 15 g eines Pulvers erhalten. Dieses Pulver wird in 150 ml destilliertem Wasser gelöst und auf eine mit Sephadex G-150 gefüllte Säule mit den Abmessungen 6,0×80 cm aufgesetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden

15 ist. Die Fraktionen entsprechen einem V_e/V_o Verhältnis von 1,11 bis 1,60 und werden aufgefangen. Die Fraktionen werden vereinigt und gründlich gegen destilliertes Wasser dialysiert. Sodann wird die dialysierte Lösung (Retentat) mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung 20 (Typ DC-2) konzentriert. Es werden 100 ml eines Konzentrats erhalten, das etwa 3 g rohes HGI-Glykoprotein enthält.

10 g pulverisiertes humanes Placenta-Albumin (hergestellt nach dem Beispiel der JA-AS 40 132/76) einer Reinheit von 98% (bestimmt durch Elektrophorese), werden in dem erhaltenen Konzentrat gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit 25 10prozentiger Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt, gemäss Beispiel 4 durch Filtration sterilisiert, aseptisch in 2,5 ml Portionen in Ampullen abgefüllt und aseptisch gefriergetrocknet. Sodann werden die Ampullen abgeschmolzen. Es werden 40 Ampullen mit jeweils 3,8 mg wärmebehandeltem HGI-Glykoprotein erhalten. Die erhaltenen Präparate werden auf biologische Aktivität und virale Infektiosität gemäss Versuch 5 untersucht. Die biologische Aktivität ist vergleichbar mit den nichtwärmebehandelten Präparaten, und es kann keine virale Infektiosität festgestellt werden.

Beispiel 6

400 Liter frischer Urin von gesunden Menschen werden in 40 10prozentiger Natronlauge auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und sodann unter Kühlung bei 10°C in einer Durchlaufzentrifuge bei 15 000 × g zur Abtrennung unlöslicher Substanzen zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird mit 45 10prozentiger Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und auf eine mit Kieselgel gefüllte Säule mit den Abmessungen 10×80 cm aufgesetzt. Die am Kieselgel adsorbierten Substanzen werden mit 40 Liter 5prozentiger Ammoniaklösung eluiert. Das erhaltene Eluat wird mit 1n Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und mit Ammoniumsulfat bis zu 70prozentiger Sättigung versetzt. Nach 15- bis 50 18ständigem Stehen bei 0°C wird die entstandene Fällung abfiltriert. Die erhaltene Fällung wird in 2 Liter 5prozentiger Ammoniaklösung gelöst, in Cellophanschläuche abgefüllt und gegen 0,05M Phosphatpuffer vom pH-Wert 6,5 gründlich dialysiert. Die erhaltene dialysierte Lösung (das Retentat) wird mit dem gleichen Puffer auf 10 Liter aufgefüllt und auf eine mit Sephadex C-50 gefüllte Säule mit den Abmessungen 40×40 cm aufgesetzt, die mit 0,05M Phosphatpuffer vom pH-Wert 6,5 äquilibriert worden ist. Verunreinigungen werden durch Adsorption abgetrennt. 10 Liter des erhaltenen Eluats werden mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Amicon, Typ DC-30) konzentriert. Das erhaltene Konzentrat wird gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 bis 5°C während 15 bis 18 65 Stunden auf die vorstehend beschriebene Weise dialysiert.

Die erhaltene dialysierte Lösung (das Retentat) wird mit der gleichen Pufferlösung auf 1 Liter aufgefüllt und auf eine DEAE-Cellulosesäule mit den Abmessungen 4,0×40 cm auf-

gesetzt, die mit der gleichen Pufferlösung äquilibriert worden ist. Die Säule wird mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gründlich gewaschen und sodann mit einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 eluiert, die 0,3M an Natriumchlorid ist. Diejenigen Fraktionen, die die Proliferation und Differenzierung von Mäuseknochenmarkzellen in vitro stimulieren (bestimmt gemäss Versuch 5) werden aufgefangen. Die Fraktionen werden vereinigt und gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 dialysiert. Die dialysierte Lösung (das Retentat) wird erneut auf eine DEAE-Cellulosesäule mit den Abmessungen 4,0×40 cm aufgesetzt, die mit der gleichen Pufferlösung äquilibriert worden ist. Die Säule wird mit einem linearen Konzentrationsgradienten einer Kochsalzlösung (0 bis 0,3M) eluiert. Die Fraktionen mit stimulierender Wirkung auf die Prolifera- 15 tion und Differenzierung von Granulozyten werden aufgefangen und mit Ammoniumsulfat bis zu 70prozentiger Sättigung versetzt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert, in wenig 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gelöst und gegen die gleiche Pufferlösung dialysiert.

20 ml der erhaltenen dialysierten Lösung (Retentat) werden auf eine Sephadex G-150 Säule mit den Abmessungen 4,0×60 cm aufgesetzt, die mit einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden ist. Die Eluatfraktionen bei einem V_e/V_o Verhältnis von 1,11 bis 1,45 werden aufgefangen. Die Fraktionen werden vereinigt und gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert. Sodann wird die dialysierte Lösung (das Retentat) gefriergetrocknet. Es werden etwa 500 mg eines Pulvers erhalten.

200 mg des erhaltenen Pulvers werden in 0,02M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7,0 gelöst, der 1,0M an Natriumchlorid ist, und auf eine Säule aufgesetzt, die 100 ml Concanavalin A-Sepharose 4B enthält, die mit der gleichen Pufferlösung äquilibriert worden ist. Die Säule wird mit 0,02M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7,0, die 1,0M an Natriumchlorid ist, gründlich gewaschen und danach mit einer 0,02M Phosphatpufferlösung vom pH-Wert 7,0, die 50mM an α -Methyl-D-glucosid und 1,0mM an Natriumchlorid ist, eluiert. Die Fraktionen mit stimulierender Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung der Granulozyten (bestimmt gemäss Versuch 5) werden aufgefangen und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung wird gefriergetrocknet.

Etwa 50 mg des erhaltenen gefriergetrockneten Pulvers werden in 1 ml einer 0,125M tris-Glykokoll-Pufferlösung vom pH-Wert 6,8 gelöst, die 10% Glycerin enthält. Die erhaltene Lösung wird bei 10 mA unter Kühlung mittels einer präparativen Elektrophoresevorrichtung (Typ Fuji Kabara II) unter Verwendung von 8% Acrylamidgel (pH 8,9; 20 mm × 25 mm) der Elektrophorese unterworfen. Die Fraktion mit einer relativen Beweglichkeit von 0,46 wird mit 0,025M tris-Glykokoll-Pufferlösung vom pH-Wert 8,3 eluiert und sodann gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dialysierte Lösung wird gefriergetrocknet. Es werden etwa 10 mg HGI-Glykoprotein erhalten.

Das vorstehend beschriebene Verfahren wird mehrmals wiederholt, und es werden etwa 1 g HGI-Glykoprotein erhalten. 1 g des erhaltenen HGI-Glykoproteids werden in 10 ml Wasser vollständig gelöst und mit 10prozentiger Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt. Sodann wird die erhaltene Lösung 10 Stunden auf 60°C erhitzt, hierauf rasch in Eiswasser abgekühlt und mit sterilem Wasser auf das 10fache Volumen verdünnt. Sodann wird die Lösung durch Filtration durch Membranfilter mit einer Porengrösse von 0,45 μ sterilisiert. Jeweils 1 ml der erhaltenen sterilisierten Lösung werden aseptisch in Glasampullen abgefüllt, die 2 Stunden auf 180°C erhitzt worden sind. Nach aseptischer Gefrier Trocknung werden die Glasampullen abge-

schmolzen. Es werden etwa 97 Ampullen mit jeweils 10 mg hitzebehandeltem HGI-Glykoprotein erhalten.

Die erhaltenen Präparate werden auf biologische Aktivität und virale Infektiosität gemäss Versuch 5 und 7 untersucht. Die biologische Aktivität beträgt etwa 40% der eines Präpa- 5 rats vor der Wärmebehandlung, und es kann keine virale Aktivität festgestellt werden.

Beispiel 7

10 1000 Liter frischer Urin von gesunden Menschen wird gemäss Beispiel 6 behandelt. Aus dem Eluat der CM Sephadex C-50 Säule werden 2,5 Liter einer wässrigen Lösung erhalten, die rohes HGI-Glykoprotein enthält. Die Lösung wird mit 25 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 versetzt. Nach gründlichem Rühren wird die Lösung mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung auf etwa $\frac{1}{25}$ ihres Anfangsvolumens eingeeengt. Das Konzentrat wird mit 5 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung und 5 Liter einer DEAE-Cellulosesuspension 20 (300 g DEAE-Cellulose auf Trockenbasis) versetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden ist. Das Gemisch wird 30 Minuten gerührt, sodann stehengelassen und hierauf unter vermindertem Druck abfiltriert. Die abfiltrierte DEAE-Cellulose wird mit 10 Liter einer 25 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gewaschen und unter vermindertem Druck abfiltriert. Sodann wird die DEAE-Cellulose mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gewaschen, die 0,05M an Natriumchlorid ist, und hierauf erneut unter vermindertem Druck abfiltriert. Die auf diese Weise behandelte DEAE-Cellulose wird in 10 Liter einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 verrührt, die 0,3M an Natriumchlorid ist, um die HGI-Glykoprotein-Fraktion zu eluieren. Das Eluat wird mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Typ DC-30) entsalzt. 35 Nach der Gefrier Trocknung werden etwa 15 g eines Pulvers erhalten.

Das gefriergetrocknete Pulver wird in 150 ml destilliertem Wasser gelöst und auf eine Sephadex G-150 Säule mit den Abmessungen 6,0×80 cm aufgesetzt, die mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 äquilibriert worden ist. Die HGI-Glykoprotein-Fraktionen mit einem V_e/V_o Verhältnis von 1,11 bis 1,60 werden aufgefangen und gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert.

Die erhaltene dialysierte Lösung (das Retentat) wird mit 45 einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Typ DC-2) konzentriert. Es werden 30 ml eines Konzentrats erhalten, das etwa 3 g rohes HGI-Glykoprotein enthält. Das Konzentrat wird mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt und gemäss Beispiel 6 wärmebehandelt. Das erhaltene wärmebehandelte Konzentrat wird durch Filtration sterilisiert und in 1,0 ml Anteilen in Ampullen aseptisch abgefüllt. Nach aseptischer Gefrier Trocknung werden die Ampullen hermetisch verschlossen. Es werden 30 Ampullen mit jeweils 5,2 mg wärmebehandeltem HGI-Glykoprotein 55 erhalten.

Die erhaltenen Präparate werden auf biologische Aktivität und virale Infektiosität gemäss Versuch 5 und 7 untersucht. Die biologische Aktivität beträgt etwa 40% der vor der Wärmebehandlung, und es kann keine virale Aktivität festgestellt 60 werden.

Beispiel 8

Das Verfahren von Beispiel 1 wird wiederholt. Es werden etwa 500 mg (etwa 26 mg Wirkstoff) HGI-Glykoprotein-Pulver entsprechend Probe Nr. 4 erhalten, jedoch wird folgende Stufe vor der Stufe der Dialyse der 5prozentigen wässrigen Ammoniaklösung der Ammoniumsulfatfällung eingeschaltet: Etwa 20 g der erhaltenen Ammoniumsulfatfällung

werden in 200 ml Wasser gelöst (Proteinkonzentration 100 mg pro ml). Die erhaltene Lösung wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt und sodann in Eiswasser rasch abgekühlt. Es wird eine Fraktion erhalten, die das wärmebehandelte HGI-Glykoprotein enthält. Diese Fraktion wird gemäss Beispiel 1 dialysiert. Die biologische Aktivität des erhaltenen HGI-Glykoprotein-Pulvers ist vergleichbar mit der der Fraktion vor der Wärmebehandlung, und es kann keine virale Aktivität festgestellt werden.

Beispiel 9

Etwa 450 mg eines Pulvers entsprechend der Probe Nr. 4 von Beispiel 1, die 23,5 mg HGI-Glykoprotein enthalten, werden gemäss Beispiel 1 hergestellt, jedoch mit folgender Abänderung:

10 Liter des Eluats aus der CM Sephadex C-50 Säule werden mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung konzentriert bis zu einer Proteinkonzentration von 70 mg pro ml. Die konzentrierte wässrige Lösung wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt und sodann rasch in Eiswasser abgekühlt. Unlösliche Substanzen werden abfiltriert, und die wässrige Lösung wird in Cellophanschläuche abgefüllt und gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 bei 5°C dialysiert. Die dialysierte Lösung (das Retentat) wird mit der gleichen Pufferlösung auf 1 Liter aufgefüllt. Es wird eine Lösung entsprechend der Probe Nr. 1 von Beispiel 1 erhalten.

Die biologische Aktivität des erhaltenen HGI-Glykoprotein-Pulvers ist vergleichbar mit der des Pulvers, das ohne Wärmebehandlung erhalten wurde. Es kann keine virale Aktivität festgestellt werden.

Beispiel 10

Etwa 500 mg eines Pulvers entsprechend Probe Nr. 4 von Beispiel 1, die etwa 26 mg HGI-Glykoprotein enthalten, werden gemäss Beispiel 1 hergestellt, jedoch mit folgender Abänderung:

Das Eluat aus der DEAE-Cellulosesäule wird mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die erhaltene Fällung wird in einer 0,1M tris-HCl-Pufferlösung bis zu einem Proteingehalt von 150 mg pro ml gelöst. Die erhaltene Lösung wird 10 Stunden auf 60°C erhitzt und sodann rasch in Eiswasser abgekühlt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert und das Filtrat gegen 0,1M tris-HCl-Pufferlösung dialysiert. Die erhaltene dialysierte Lösung wird anstelle von Probe Nr. 3 in Beispiel 1 verwendet. Die biologische Aktivität des schliesslich erhaltenen HGI-Glykoprotein-Pulvers ist vergleichbar mit der des Präparats, das ohne Wärmebehandlung erhalten worden ist. Es kann keine virale Aktivität festgestellt werden.

Beispiel 11

50 Liter frischer Urin von gesunden Menschen wird mit 10prozentiger Natronlauge neutralisiert und mittels einer kühlbaren Durchlaufzentrifuge bei 10 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird mittels einer DIAFLO-Hohlfaden-Ultrafiltrationsvorrichtung (Aminon Co., Typ DC-30, ausgerüstet mit einer Membran, die ein Molekulargewicht von 10 000 abschneidet) auf 1/10 ihres Volumens konzentriert. Nach Zusatz von 50 Liter Wasser wird die Lösung erneut konzentriert. Es werden 3 Liter Konzentrat erhalten. Der konzentrierte Urin wird mittels eines Drehverdampfers auf etwa 50 ml Konzentrat mit einem Proteingehalt von 70 mg pro ml eingedampft. Das Konzentrat wird 10 Stunden auf 60±0,5°C erhitzt und sodann rasch abgekühlt. Es wird eine wärmebehandelte HGI-Glykoprotein-enthaltende Fraktion erhalten. Nach Abtrennung unlöslicher Substanzen wird das Konzentrat mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 auf 5 Liter aufgefüllt und auf eine DEAE-Cellulosesäule mit den Abmessungen 4,0×40 cm aufgesetzt, die vorher mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung äquilibriert worden ist. Das HGI-Glykoprotein wird an der DEAE-Cellulose adsorbiert. Die Säule wird mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 gründlich gewaschen und mit 0,1M tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0 eluiert, die 0,3M an Natriumchlorid ist. Danach wird das Verfahren gemäss Beispiel 1 wiederholt, jedoch wird das erhaltene Eluat anstelle der 5prozentigen wässrigen Ammoniaklösung des Präzipitats der 70prozentigen Ammoniumsulfatfällung verwendet. Es werden etwa 200 mg HGI-Glykoprotein-Pulver entsprechend Probe Nr. 4 nach Wiederholung des Verfahrens von Beispiel 1 erhalten.

Die biologische Aktivität des erhaltenen HGI-Glykoprotein-Pulvers ist vergleichbar mit der des Präparats, das ohne Wärmebehandlung erhalten worden ist. Es kann keine virale Aktivität festgestellt werden.

Beispiel 12

Das Verfahren von Beispiel 1 wird wiederholt, es wird eine Fraktion entsprechend Probe Nr. 3 von Beispiel 1 isoliert. Diese Fraktion wird auf einen Proteingehalt von 70 mg pro ml konzentriert und 10 Stunden auf 60°C erhitzt. Danach wird die Fraktion rasch in Eiswasser abgekühlt, von der entstandenen Fällung befreit und in gleicher Weise wie in Beispiel 1 weiterbehandelt. Es werden etwa 10 mg eines HGI-Glykoprotein-Pulvers entsprechend Probe Nr. 6 von Beispiel 1 erhalten.

Die biologische Aktivität des erhaltenen HGI-Glykoprotein-Pulvers ist vergleichbar mit der des Präparats ohne Wärmebehandlung.

FIG. 1

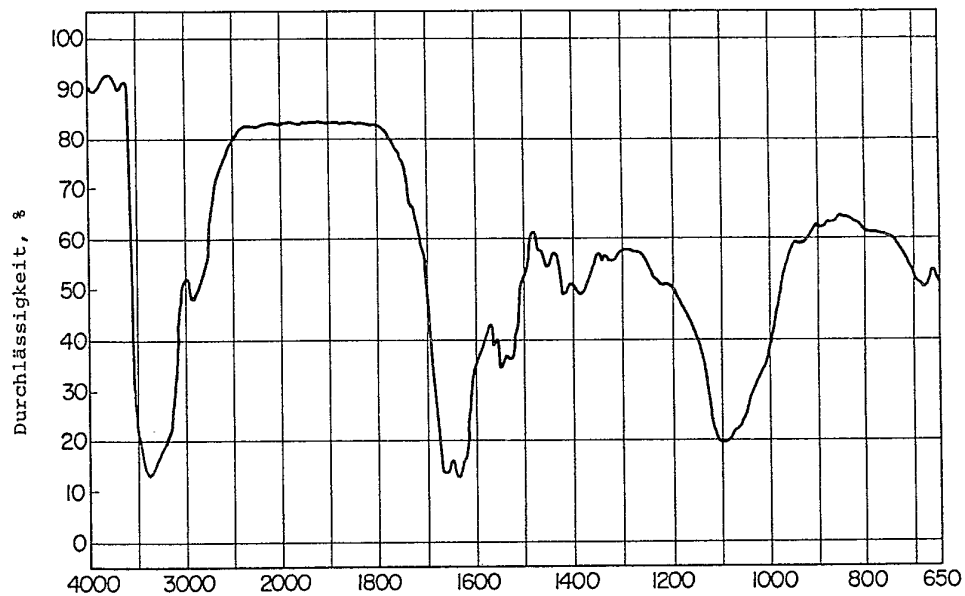


FIG. 2

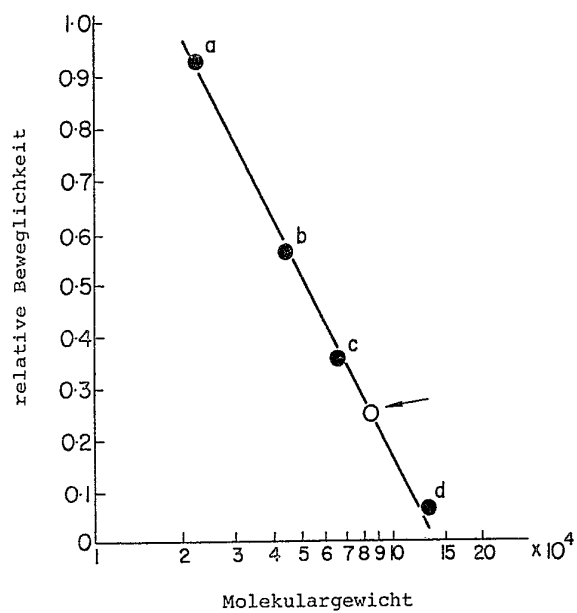


FIG. 3

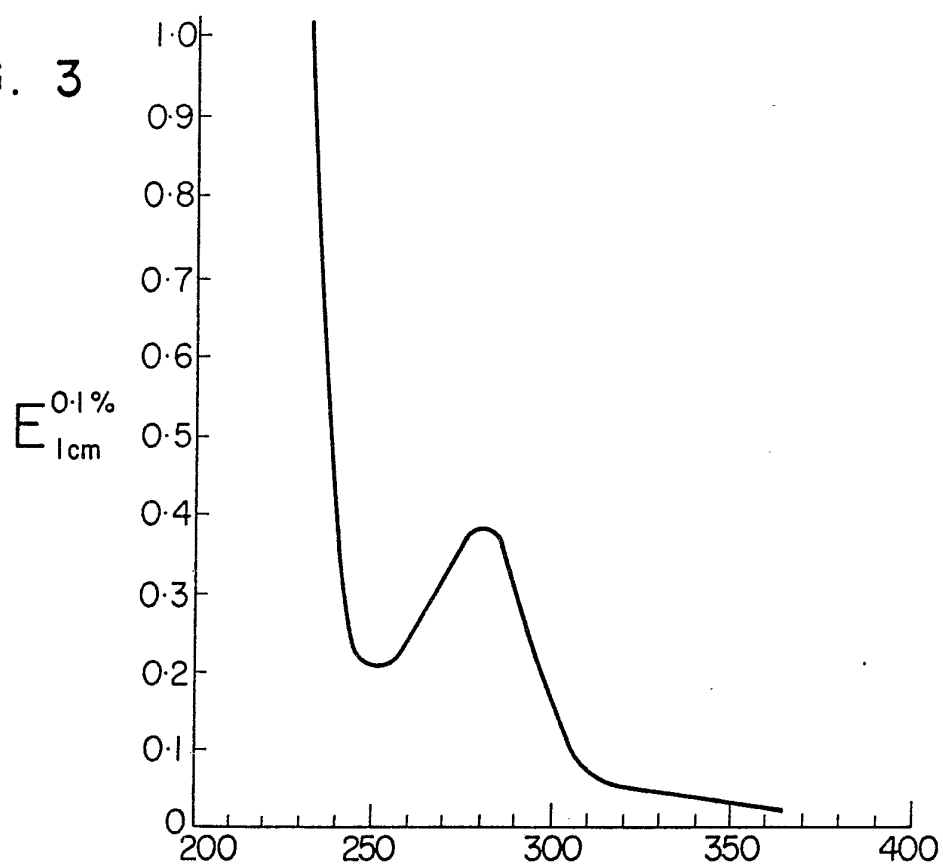


FIG. 4

