



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

629 669

⑯1 Gesuchsnummer: 1462/77

⑯3 Inhaber:
Armour Pharmaceutical Company, Scottsdale/AZ
(US)

⑯2 Anmeldungsdatum: 07.02.1977

⑯2 Erfinder:
Dr. Waldemar Schneider, Hagen (DE)
Dr. Dietrich Wolter, Hagen (DE)

⑯4 Patent erteilt: 14.05.1982

⑯5 Patentschrift
veröffentlicht: 14.05.1982

⑯4 Vertreter:
Bovard & Cie., Bern

⑯4 Verfahren zur Erhöhung der Intravenösverträglichkeit von Gammaglobulinen.

⑯5 Ein aus körperverträglichen und unverträglichen Anteilen bestehender Niederschlag von aus Blut und Blutprodukten ausgefällten Gammaglobulinen wird chemisch aufgetrennt. Der gesamte Niederschlag wird hierfür in einer wässrigen Lösung, in der sich makromolekulare, zur Verbindung mit den unverträglichen Anteilen befähigte Substanzen befinden, aufgenommen bzw. in dieser gelöst. Die erhaltene wässrige, Gammaglobulin enthaltende Lösung wird dann zusätzlich mit einer Aufschämmung von ein Kationenaustauschvermögen besitzenden, glimmerartigen Schichtsilikaten versetzt. Nach Verstreichen einer ausreichenden Reaktionsdauer, um die unverträglichen Globulinanteile durch Kationenaustausch in den Schichten des Schichtsilicates zu binden, wird ein Fällungsmedium zugesetzt, um den auszuscheidenden Gammaglobulin-Anteil, zusammen mit den Schichtsilikaten zu entfernen. Geeignete Schichtsilicate sind beispielsweise Bentonit, Batavit, Vermiculit und ein geeignetes Fällungsmedium ist beispielsweise Polyäthylenglykol.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur chemischen Trennung eines aus körperverträglichen und unverträglichen Anteilen bestehenden Niederschlags von aus Blut und Blutprodukten ausgefällten Gammaglobulinen, zwecks Erhöhung der Intravenösverträglichkeit derselben, dadurch gekennzeichnet, dass der gesamte Niederschlag in einer wässrigen Lösung, in der sich makromolekulare Substanzen befinden, die befähigt sind, sich mit den unverträglichen Anteilen zu verbinden, aufgenommen bzw. gelöst wird, dass die wässrige, Gammaglobulin enthaltende Lösung zusätzlich mit einer Aufschämmung von ein Kationenaustauschvermögen besitzenden, glimmerartigen Schichtsilikaten in einer Konzentration im Bereich von 0,2 bis 10 Gew.-% versetzt wird, und dass nach Verstreichen einer Reaktionsdauer, die ausreicht, um die unverträglichen Gammaglobulinanteile durch Kationenaustausch in den Schichten des Schichtsilikates zu binden, und Hinzufügen eines Fällungsmediums der auszuscheidende Gammaglobulin-Anteil, zusammen mit den Schichtsilikaten entfernt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

dass man als makromolekulare Substanz Hydroxyäthylstärke verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Schichtsilicat Bentonit mit der Hauptkomponente Montmorillonit verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Schichtsilicat die Mineralien Batavit oder Vermiculit verwendet werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass 0,2 bis 5 Gew.-% Silicate beigefügt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei einer Temperatur von +4 bis 20 °C stattfindet.

15 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion mit den Schichtsilikaten bei einem pH-Wert der Lösung von 4,0 bis 7,6 stattfindet.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsdauer 3–10 Stunden beträgt.

20 9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Fällungsmittel Polyäthylenglykol verwendet.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Intravenösverträglichkeit von aus Blut oder Blutprodukten ausgefällten Gammaglobulinen, in dessen Verlauf der Gammaglobulin-Niederschlag in einer wässrigen Lösung erneut gelöst wird, in der makromolekulare, die Globulin-Moleküle gegeneinander abschirmende und sie aus der Lösung verdrängende Substanzen, vorzugsweise Hydroxyäthylstärke, vorliegen, wie in der BE-PS 837 211 beschrieben.

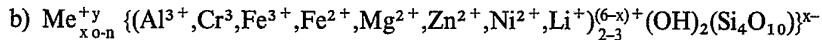
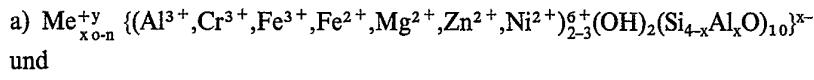
Bei dem Verfahren der BE-PS 837 211 wird der Anteil an unerwünschten Gammaglobulinen dadurch entfernt, dass diese in einer wässrigen Lösung von insbesondere Hydroxyäthylstärke in einer Konzentration von 8–10% erneut aufgenommen werden. Nach Zugabe von Polyäthylenglykol wird das Gemisch zentrifugiert. Der sich absetzende Niederschlag

enthält den unerwünschten Gammaglobulin-Anteil, während der erwünschte Anteil in einer weiteren Zentrifugierstufe bei pH 7,2 und 20% PÄG gewonnen wird.

Wenn auch das gemäss dem dort beschriebenen Verfahren gewonnene Gammaglobulin allen Anforderungen der medizinischen Praxis gerecht wird, so hat es sich doch als günstig erwiesen, die Ausbeute zu erhöhen und eine noch höhere Qualität und Reinheit des gewünschten Gamma-globulins zu gewährleisten.

Diese Aufgaben werden durch das erfindungsgemäss, im Patentanspruch 1 definierte Verfahren gelöst.

Unter «glimmerartigen Schichtsilikaten», werden Silikate verstanden, deren Zusammensetzung folgende Grenzformeln wiedergeben:



Die Kationen Me^+ können gegen andere, auch organische Kationen zeolithisch ausgetauscht werden. Als Quellungsflüssigkeit Y lassen sich beliebige Moleküle mit Ausnahme von gesättigten Kohlenwasserstoffen einführen. Die Menge der Quellungsflüssigkeit kann in weiten Grenzen geändert werden. Da auch die Menge x der einwertigen Kationen pro $(Si, Al)_4 O_{10}$ -Baueinheit, d.h. die Schichtladung, variiert, ergibt sich eine außerordentliche Mannigfaltigkeit.

Die intensive Forschung hat sich insbesondere des Montmorillonits angenommen (vergleiche hierzu Bibliographie in «Organische Derivate der glimmerartigen Schichtsilikate» von WEISS; angewandte Chemie 1963; S. 113ff.). Montmorillonit besteht aus zweidimensional unendlichen Makro-Anionen, welche über die dazwischenliegenden Kationen elektrostatisch vernetzt sind. Die Energie zur Quellung, d.h. zur Vergrösserung des Schichtabstandes unter Entfernung der positiven und negativen Ladungen voneinander, liefert die Hydratation oder Solvatation der Kationen und der Anionenschichten. Da die Solvationsenergie im allgemeinen wesentlich kleiner ist als die Hydrationsenergie, können nur Molekeltarten mit hohen Dielektrizitätskonstan-

ten oder mit der Fähigung zur Bildung von Wasserstoffbrücken eingelagert werden.

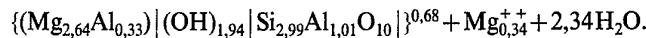
50 Auch Aminosäuren, Peptide und Proteine können in glimmerartige Schichtsilikate eingelagert werden. Proteine werden bei niedrigem pH-Wert nahezu quantitativ eingetauscht. Mit steigendem pH-Wert sinkt die Zahl der kationischen Positionen in den Proteinen und der Austausch wird unvollständig.

Albumine, Globuline und Prolamine werden ebenfalls gebunden. Mit Serumglobulinen scheint die Reaktion vom Rande der Silicatkristalle aus nur etwa $20 \text{ bis } 30 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ ins Innere fortzuschreiten. Albumine werden zwischen den Silicatschichten gespreitet. Der Schichtabstand von 14,5 bis 15,0 10^{-10} m zeigt, dass für das gespreitete Protein eine Schichtdicke von maximal 5,5 bis $6 \cdot 10^{-10} \text{ m}$ zu Verfügung steht.

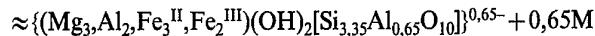
65 Da sich in den aufgenommenen Gammaglobulin-Menge sowohl unbeschädigte als auch beschädigte Moleküle befinden, muss es das Bestreben sein, die beschädigten möglichst in irgendeiner Weise zu binden und damit von den physiologisch einwandfreien Molekülen chemisch unterscheidbar zu machen. Die beschädigten Moleküle sind in der Lage, Was-

serstoffbrückenbindungen zu bilden. Sie werden daher verstärkt innerhalb der Silicat-Schichten eingelagert und gebunden, während die unbeschädigten Gammaglobulin-Moleküle in der Lösung verbleiben. Gebunden in den Schichten des Schichtsilicates lassen sich anschliessend die beschädigten Gammaglobulin-Moleküle leicht, z. B. durch Zentrifugieren, entfernen.

Das im Sinne der Erfindung erwünschte Kationenaustauschvermögen zeigen nach Hofmann [Z. Kristallogr. (A)



Es wurde gefunden, dass dieses Material wie der Montmorillonit innerkristallines Quellvermögen und hohes Kationenaustauschvermögen besitzt. Die Untersuchungen (a. a.O.) zeigten, dass Batavit bis zu 5 Gew.-% Humanalbumin



zeigt die erwünschten Eigenschaften bezüglich der Schichtenbildung und Quellfähigkeit. Vermiculit entspricht einem trioktaedrischen Montmorillonit, doch sind seine Kristalle viel grösser und das Gitter ist regelmässiger ausgebildet.

Zusammengefasst kann demnach gefolgert werden, dass sich für das Reinigungsverfahren Minerale eignen, die eine Schichtstruktur zeigen, die Kationen zwischen den Silicatschichten aufweist und zur Quellung neigen. Nach der experimentellen Erfahrung werden durch derartige Mineralien die defekten Gammaglobulin-Moleküle gehalten – offenbar aufgrund ihrer starken Kationen-Aktivierung – und die unbeschädigten nicht gebunden. Hierbei ist erforderlich, bestimmte Grenzen der Konzentration und des pH-Wertes einzuhalten.

Erfindungsgemäss werden insbesondere die Mineralien Montmorillonit, Batavit oder Vermiculit verwendet. Je nach der gelösten Menge vom Gammaglobulin bei der Wiederauflösung werden im allgemeinen 0,2 bis 5 Gew.-% Silicate beigefügt. Nach experimenteller Erfahrung findet die Reaktion im Rahmen einer Temperatur von 4 bis 20 °C statt und es wird zweckmässig bei einem pH-Wert zwischen 4,0 und 7,6 gearbeitet. Die Reaktionsdauer sollte zwischen 3 und 10 Stunden betragen. Hierbei wird vorzugsweise über Nacht gearbeitet, da die Reaktion relativ langsam verläuft und ein längerer Zeitraum die Ergebnisse verbessert. Das Austragen der Silicate wird vorzugsweise durch Zentrifugieren vorgenommen. Es können jedoch auch andere, aus der allgemeinen Verfahrenstechnik bekannte Methoden verwendet werden, beispielsweise eine Schwemmfiltrierung.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1

a) Abtrennen des Gammaglobulins:

Es wird ausgegangen von einem gesammelten Plasma, das mit 8% Äthanol versetzt wird und bei einem pH-Wert von 7,2 bei minus 3 °C ausgefällt wurde. Hierbei wird die Fraktion I ausgeschieden. Die aufstehende Flüssigkeit wird anschliessend bei minus 5 °C und einem pH-Wert von 5,8 mit 19% Äthanol versetzt. Hierbei wird die Fraktion II-III ausgeschieden, die aus Gammaglobulinen besteht. Der Niederschlag wird wieder aufgelöst und bei pH 5 und 8% Äthanol erneut gefällt. Der verbleibende Überstand wird dann

98 (1973) 31; Chemie 55 (1942) 283] auch Kaolin und diesem verwandte Stoffe (z. B. Halloysit, $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 4H_2O$) und gewisse glimmerartige Mineralien die hinsichtlich ihres Gittersaufbaus verwandt sind.

5 Hierunter zählen auch Vermiculit und das diesem verwandte Batavit (= eisenfreies Vermiculit). Die Strukturformel des Batavits ergibt sich nach WEISS und HOFMANN (Z. Naturf. 6b, 405) wie folgt:

aufnimmt, wobei das Eiweiss zwischen die Silicatschichten eingelagert wurde. Auch Vermiculit, angeneherte Struktur-
15 formel

20 mit 25% Äthanol bei pH 7,2 erneut gefällt. Der hierbei entstehende Niederschlag (= Fraktion II) besteht aus mindestens 90% Gammaglobulin.

b) Herabsetzung der antikomplementären Wirksamkeit:

Der Gammaglobulin-Niederschlag wird in einer gepufferten, wässrigen Lösung mit einem pH-Wert 7,0 in einer Konzentration von etwa 6% aufgenommen, wobei der wässrigen Lösung etwa 10% HÄS beigegeben sind. Der Lösung wird weiterhin eine wässrige Aufschlemung von Bentonit SF (Hauptkomponente: Montmorillonit; Körnung kleiner als 80 µ Hersteller: SERVA Feinbiochemika, Heidelberg) beigegeben. Die Lösung enthält anschliessend 2,5 Gew.-% Bentonit und wird gut gerührt. Anschliessend wird die Lösung 6 Stunden bei einer Temperatur von 15 °C ± 2 °C stehengelassen. Dann wird das Bentonit zusammen mit den unerwünschten Bestandteilen nach Zugabe von 10% Polyäthylenglykol durch Zentrifugieren entfernt.

Beispiel 2

Der Schritt a) ist gleich demjenigen des Beispieles 1.

40 Schritt b) wird wie folgt abgewandelt:

Der Gammaglobulin-Niederschlag wird in einer gepufferten, wässrigen Lösung mit einem pH von 7,4 in einer Konzentration von etwa 4 Gew.-% aufgenommen, wobei der wässrigen Lösung etwa 8% HÄS beigegeben sind. Der Lösung wird weiterhin eine wässrige Aufschlemung von feinvermahlenem (Teilchengröße kleiner 80 µ) Vermiculit bis zu einem Anteil von 5 Gew.-% beigegeben. Das Ganze wird kräftig verrührt. Anschliessend wird die Lösung 8 Stunden bei einer Temperatur von 15 °C ± 2 °C stehengelassen. Der Lösung wird danach etwa 10 Gew.-% HÄS zugegeben. Anschliessend wird das Vermiculit zusammen mit den unerwünschten Bestandteilen durch Zentrifugieren entfernt.

Aus Berechnungen und Messungen an Immun-Elektrophorese-Diagrammen geht hervor, dass die Ausbeute an reinem Gammaglobulin erhöht wird, wenn das erfundungsgemäss Verfahren angewandt wird. Das gewonnene Gammaglobulin ist nicht modifiziert oder chemisch verändert. Es ist absolut intravenös verträglich und hat praktisch keine antikomplementären Eigenschaften. Darüber hinaus zeigt es eine hohe Stabilität, wie durch Lagerversuche nachgewiesen werden konnte.