



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.²: C 07 G 7/00
A 61 K 37/04



PATENTSCHRIFT A5

615 194

②① Gesuchsnummer: 11472/75

②② Anmeldungsdatum: 04.09.1975

③③ Priorität(en): 06.09.1974 DE 2442655

②④ Patent erteilt: 15.01.1980

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.01.1980

⑦③ Inhaber:
Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn
(DE)

⑦② Erfinder:
Rudolf Schmidtberger, Marburg-Marbach (DE)

⑦④ Vertreter:
Brühwiler, Meier & Co., Zürich

⑤④ Verfahren zur Herstellung von amidierten Immunglobulinen.

⑤⑦ Für die intravenöse Applikation geeignete amidier-
te Immunglobuline werden hergestellt, indem man
Immunglobuline mit einem molaren Ueberschuss eines
primären Monoamins und einem Carbodiimid oder des-
sen Salz in schwach saurer bis neutraler wässriger Lösung
umsetzt.

Durch die Amidierung wird die unerwünschte Kom-
plementbindung durch die Immunglobuline verhindert
oder zumindest weitgehend vermindert, ohne die Anti-
körperwirkung der Immunglobuline zu beeinträchtigen.

Das Verfahren lässt sich auch auf reduzierte Immun-
globuline, bei denen mindestens eine Disulfidbindung
in zwei Sulfhydrylbindungen übergeführt worden ist,
anwenden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von amidiertem Immunglobulinen, dadurch gekennzeichnet, dass man Immunglobuline mit einem molaren Überschuss eines primären Monoamins und einem Carbodiimid oder dessen Salz in schwach saurer bis neutraler wässriger Lösung umsetzt.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das molare Verhältnis von Monoamin zu Immunglobulinen auf mindestens 50:1 und das von Carbodiimid zu Immunglobulinen auf mindestens 1:1 einstellt.

3. Verfahren nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das molare Verhältnis von Carbodiimid zu Immunglobulinen auf 5:1 bis 20:1 einstellt.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als primäres Monoamin ein aliphatisches Monoamin mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen je Molekül, das als weitere funktionelle Gruppe Hydroxygruppen und/oder Acetalgruppierungen tragen kann, verwendet.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als aliphatisches Monoamin Äthanolamin, Trishydroxymethylaminomethan oder Glukosamin verwendet.

6. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Carbodiimid 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid oder 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat verwendet.

7. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung bei einem pH-Wert von 3 bis 7 durchführt.

8. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung bei einer Temperatur von 5 bis 50° C durchführt.

9. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Immunglobuline Human-Immunglobuline verwendet.

10. Anwendung des Verfahrens nach Patentanspruch 1 auf Immunglobuline mit mindestens zwei Sulfhydrylgruppen, welche man erhält, indem man Disulfidgruppen aufweisende Immunglobuline mit einem Reduktionsmittel behandelt, wobei mindestens eine Disulfidbindung in zwei Sulfhydrylgruppen übergeführt wird.

11. Anwendung nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung mit dem Reduktionsmittel bei schwach basischem pH-Wert durchführt.

12. Anwendung nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung mit dem Reduktionsmittel bei schwach basischem pH-Wert durchführt, dass man das Reduktionsmittel in einer Konzentration von 0,01 Mol/l einsetzt und dass man das Molverhältnis von Protein zu Reduktionsmittel auf einen Wert von 2,5 bis 50:1 einstellt.

13. Anwendung nach Patentanspruch 10 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass man als Reduktionsmittel Dithioerythrit oder Dithiothreitol verwendet.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung amidierter Immunglobuline. Derart modifizierte Immunglobuline eignen sich insbesondere für die Verwendung in Arzneimitteln für die intravenöse Applikation.

Durch Fraktionierung aus Serum, insbesondere aus menschlichem Serum, hergestellte Immunglobuline haben die wesentliche Eigenschaft, als Antikörper gegen körperfremde Antigene wirksam zu sein.

Immunglobulin-Präparationen erwiesen sich bislang als im wesentlichen nur für die intramuskuläre Verabreichung geeignet. Bei intravenöser Applikation reagierten die Empfän-

ger mehr oder weniger ausgeprägt mit anaphylaktoiden Erscheinungsformen.

Es wird angenommen, dass diese Nebenreaktionen auf der Bindung des Serumkomplements durch das verabreichte Immunglobulin beruhen. Andererseits ist ein intravenöses Immunglobulin-Präparat erwünscht, da es im Organismus rascher zur Wirkung kommt.

Man hat bereits mehrfach versucht, die Immunglobuline derart zu modifizieren, dass ihre Antikörperaktivität erhalten bleibt, das Mass der Komplementbindung jedoch soweit verringert wird, dass die modifizierten Immunglobuline für eine intravenöse Applikation eingesetzt werden können. Beispielsweise lassen sich Immunglobulinmoleküle durch enzymatischen Abbau dahingehend verändern, dass die Bindungsstellen für das Komplement abgespalten werden, der Rest der Moleküle jedoch noch in der Lage bleibt, Antigene zu binden. Ein solches Präparat wird mit gutem Erfolg intravenös appliziert.

Auch die Umsetzung von Immunglobulinen mit alkylierenden und acylierenden Mitteln führt zu einem zur intravenösen Anwendung geeigneten Immunglobulin. Die Verminderung der Komplementbindung von Immunglobulinen ist durch N-Alkylierung und Benzylierung ebenfalls zu erreichen.

Es ist weiter ein Verfahren bekannt, wonach Immunglobuline durch Reduktion von intramolekularen Disulfidbindungen teilweise gespalten und die gebildeten Sulfhydrylgruppen anschliessend alkyliert werden. Bei diesem Verfahren bleibt die ursprüngliche Molekülgrösse erhalten.

Diese Verfahren beruhen im wesentlichen auf der Veränderung der freien Aminogruppen bzw. Disulfidbindungen der Immunglobulinmoleküle.

Obwohl diese Verfahren zu Produkten mit ziemlich zufriedenstellenden Eigenschaften führen, verbleiben Probleme, die in verbesserter Weise gelöst werden sollten, insbesondere weil die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Moleküle durch die beschriebenen Verfahren wesentlich verändert werden.

Es wurde nun gefunden, dass Immunglobuline, bei denen einige Carboxylgruppen modifiziert wurden, ihr Bindungsverhalten gegenüber dem Komplement wesentlich ändern, ohne ihre Wirksamkeit als Antikörper zu verlieren. Derart modifizierte Immunglobuline, die wenig oder nicht nachweisbar Komplement zu binden vermögen, sind als Arzneimittel für die intravenöse Applikation geeignet.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von amidierten Immunglobulinen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man Immunglobuline mit einem molaren Überschuss eines primären Monoamins und einem Carbodiimid oder dessen Salz in schwach saurer bis neutraler wässriger Lösung umsetzt.

Als besonders zweckmässig hat es sich erwiesen, das molare Verhältnis von Monoamin zu Immunglobulinen auf mindestens 50:1 und das von Carbodiimid zu Immunglobulinen auf mindestens 1:1 einzustellen.

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemässe Verfahren eignen sich aus Serum, Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten oder aus Organextrakten gewonnene Immunglobulin-Fraktionen. Bevorzugt werden bezüglich Immunglobulin G angereicherte Fraktionen eingesetzt. Eine vorteilhafte Methode zu deren Herstellung ist diejenige nach Levy und Sober mittels Chromatographie an DEAE-Zellulose. Selbstverständlich können auch die reinen Immunglobuline mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens amidiert werden. In der Praxis spielen jedoch die 100%igen reinen Immunglobuline wegen der zu ihrer Gewinnung notwendigen aufwendigen Reinigungsverfahren zurzeit keine bedeutende Rolle.

Es hat sich gezeigt, dass die Komplementbindung der

Immunglobuline besonders niedrige Werte ergibt, wenn das Verhältnis Carbodiimid zu Immunglobulinen 5:1 bis 20:1 beträgt.

Als primäre Monoamine eignen sich Verbindungen der Formel $R-NH_2$, worin R einen Rest bedeutet, der nach bekannten Vorstellungen in der Immunologie kein markantes antigenes Motiv darstellt. Geeignete primäre Monoamine sind beispielsweise Methylamin oder Äthylamin sowie höhere aliphatische Amine mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen. In den zur Anwendung gelangenden schwach sauren wässrigen Lösungen liegen diese Amine in der Regel als Ammoniumkationen vor. Unter den erfindungsgemäss zu verwendenden primären Monoaminen sind diejenigen bevorzugt, die noch weitere funktionelle Gruppen, insbesondere hydrophile Gruppen, wie Hydroxygruppen oder Acetalgruppierungen, tragen, da derartige Amine, zu denen beispielsweise Äthanolamin, Trishydroxymethylaminomethan und Glukosamin zählen, die Löslichkeit des Umsetzungsproduktes in physiologisch verträglichen wässrigen Medien günstig beeinflussen.

Da das Verfahren im wässrigen System unter Bedingungen, unter denen die Antikörperaktivität des Immunglobulins nicht geschädigt werden darf, durchgeführt werden sollte, ist es zweckmässig, die Umsetzung in an sich bekannter Weise in Gegenwart eines Carbodiimids als Aktivator auszuführen. Als Carbodiimide eignen sich hier alle Vertreter dieser Verbindungskategorie, die in der Lage sind, bei der Bildung von Peptidbindungen aktivierend zu wirken. Beispiele für solche Carbodiimide sind das 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) oder das 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-Metho-p-toluolsulfonat (CMC). Ebenso wie die primären Monoamine werden auch die Carbodiimide in den zur Anwendung kommenden schwach-sauren wässrigen Lösungen allgemein als Salze vorliegen. In der Regel werden die Carbodiimide ohnehin als Salze zum Einsatz gebracht, weil sie in dieser Form beständiger und leichter zu handhaben sind. Prinzipiell können aber auch die freien Carbodiimide zur Anwendung kommen, die dann beim Auflösen in der wässrigen Lösung in die Salzform übergehen.

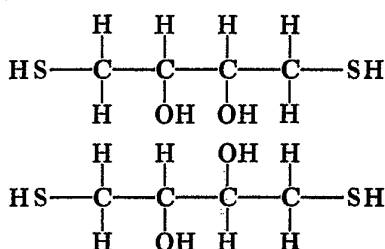
Die Komplementbindung kann nach der Methode von A. Nowotny, Basic Exercises in Immunochemistry 1969, S. 160 ff. getestet werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann auch mit Erfolg auf Immunglobuline mit mindestens zwei Sulfhydrylgruppen angewendet werden, welche man erhält, indem Disulfidgruppen aufweisende Immunglobuline mit einem Reduktionsmittel behandelt, wobei mindestens eine Disulfidbindung in zwei Sulfhydrylgruppen übergeführt wird.

Die ausgehend von diesen derart reduzierten Immunglobulinen hergestellten amidierten Immunglobuline zeichnen sich durch die gleichen vorteilhaften Eigenschaften aus.

Für die Reduktion von Disulfidbindungen kann beispielsweise Dithiothreitol oder Dithioerythrit besonders vorteilhaft verwendet werden. Die Disulfidbindungen können aber auch nach einem bekannten Verfahren mit Reduktionsmitteln, wie 2-Mercaptoäthanol oder Mercaptoäthylamin, unter Einsatz hoher Konzentrationen des Reduktionsmittels reduziert werden.

Auch die von Cleland beschriebenen Reduktionsmittel der folgenden Formeln



können für die Reduktion der Immunglobuline eingesetzt werden.

Amidierte Immunglobuline mit einer hinreichenden Ver-ringierung der Komplementbindung können intravenös appli-
ziert werden. Sie lassen sich mit physiologisch verträglichen Lösungsmitteln zu entsprechenden Zubereitungen verarbeiten. Amidierte Immunglobuline enthaltende Arzneimittel können in flüssiger oder gefriergetrockneter Form zur Verfügung gestellt werden.

Die Erfindung soll an nachstehend angeführten Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Herstellung des Ausgangsmaterials

22,1 Liter Humanserum, gewonnen aus spontan geronnenem Blut, werden zur Umsalzung über eine mit 0,0175 M Natriumphosphat pH 6,3 äquilibrierte Säule, gefüllt mit Sephadex G-25® «medium» (eingetragenes Warenzeichen der Firma Pharmacia für quervernetztes Dextran) geleitet. Mit einem Durchflussphotometer wird im Säuleneluat die Absorption bei 280 nm gemessen. Der erste, von den Serumproteinen gebildete Gipfel wird getrennt von den nachfolgenden niedermolekularen Anteilen aufgefangen und über eine mit dem oben genannten Phosphatpuffer gespülte Säule aus 15 kg DEAE-Zellulose mit 1 Moläquivalent/g Austauscherkapazität geleitet. Die Säule wird mit 1,5 Säulenvolumen Puffer nachgespült. Die im Durchfluss der Säule befindlichen Immunglobuline werden durch Zugabe von festem Ammonsulfat bis zu einer Konzentration von 2,2 M ausgefällt. Der grösste Teil der überstehenden Flüssigkeit wird nach 24stündigem Stehen abgehebert, der Rest durch Zentrifugieren bei 5200 g entfernt. Der Zentrifugen-Rückstand wird durch Dialyse gegen 0,1 M NaCl-Lösung von Ammonsulfat befreit. Das Volumen der dialysierten Immunglobulinlösung wird mit NaCl-Lösung auf 2000 ml aufgefüllt. Sie enthält insgesamt 155 g Protein.

Amidierung des Immunglobulins

1000 ml der nach dem oben beschriebenen Vorgehen erhaltenen Immunglobulinlösung werden 24 Stunden unter Rühren gegen 1000 ml 1 M Tris-Hydroxymethyl-aminomethan-(«Tris»)-HCl-Puffer pH 5,4 dialysiert, in ein Glasgefäss übergeführt und unter Rühren mit 0,96 g 1-Äthyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid · HCl versetzt. Der Ansatz wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Das mit Tris-Hydroxymethyl-aminomethan amidierete Immunglobulin wird danach über eine 8 Liter Sephadex G-25® enthaltende Säule geleitet, die vorher mit einer Lösung gespült worden ist, die 0,15 M NaCl und 0,3 M Glycin sowie einen pH-Wert von 7,3 hatte. Die optische Dichte des Säuleneluates wird bei 280 nm mit einem Durchflussphotometer gemessen. Der das amidierete Immunglobulin enthaltende Teil des Eluates wird vereinigt und mit einem Ultrafilter bis zu einem Proteingehalt von 5 % konzentriert.

Die folgende Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung Ausgangs-Immunglobulin zu amidieretes Immunglobulin in bezug auf Komplementbindung und Antikörper-Aktivität:

60

65

Tabelle 1

	Komplement- bindung ¹	Antikörper-Spezifität			
		Röteln- Titer	Diphtherie IE/ml	Tetanus IE/ml	
Ausgangs- Immun- globulin	22 %	1:1024	>0,5	<1,0	>1 <2
Amidiertes Immun- globulin	0 %	1:1024	>0,5	<1,0	>1 <2

¹ Die Auswertung der Komplementbindung erfolgte nach Nowotny, A., Basic Exercises in Immunochemistry, 1969, S. 160ff.

Beispiel 2

1000 ml Immunglobulinlösung, gewonnen nach Beispiel 1, mit 75,5 g Protein werden mit 890 ml einer 52,5 g Glukosamin · HCl enthaltenden Lösung versetzt und der pH-Wert mit 2 M NaOH auf 6,0 eingestellt. Unter Rühren werden der Lösung 2,06 g 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-äthyl)-carbodiimid Metho-p-toluolsulfonat zugesetzt und der Ansatz 1 Stunde weiter gerührt. Die Reaktionstemperatur beträgt 25° C. Die Überführung des amidierten Immunglobulins in eine 0,15 M NaCl und 0,3 M Glycin enthaltende Lösung von pH 7,3 erfolgt in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise, jedoch mit einer 10 Liter Sephadex G-25® enthaltenden Säule. Auch die Konzentrierung auf 5 % Protein erfolgt wie in Beispiel 1. Die Ergebnisse der Auswertung des nach Beispiel 2 erhaltenen amidierten Immunglobulins sind denen des Ausgangs-Immunglobulins in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Tabelle 2

	Komplement- bindung	Antikörper-Spezifität			
		Röteln Titer	Diphtherie IE/ml	Tetanus IE/ml	
Ausgangs- Immun- globulin	22 %	1:1024	>0,5	<1,0	>1 <2
Amidiertes Immun- globulin	1,5 %	1:1024	>0,5	<1,0	>1 <2

Beispiel 3

Reduktion und Amidierung der Immunglobuline

Die in Beispiel 1 und 2 beschriebene Amidierung der Immunglobuline lässt sich in gleicher Weise mit reduzierten Immunglobulinen vornehmen. Die Reduktion wird wie folgt vorgenommen:

Eine Lösung von 3,3 g Immunglobulin in 330 ml 0,15 M NaCl-Lösung wird mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) auf pH 8,2 eingestellt. Der Immunglobulinlösung werden 15,3 mg Dithioerythrit (DTE) gelöst in 2 ml Wasser zugesetzt. Nach 60 Minuten wird der Immunglobulinlösung 20 ml einer 5 g Tris enthaltenden Tris-HCl-Lösung vom pH 1,0 unter Rühren zugesetzt. Der pH-Wert der Mischung wird mit HCl auf 5,0 eingestellt und wie in Beispiel 1 beschrieben nach Zugabe von 82,2 mg N-Äthyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid · HCl amidiert.

Die Reduktion der Immunglobuline kann statt mit Dithioerythrit mit Dithiothreitol (DTT) bei gleichen Versuchsbedingungen vorgenommen werden.

POOR QUALITY