CH 657 858 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 657 858 A5

(51) Int. Cl.[4]: C 07 G 15/00
A 61 K 37/30

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

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 3496/83

(22) Anmeldungsdatum: 27.06.1983

(24) Patent erteilt: 30.09.1986

(45) Patentschrift veröffentlicht: 30.09.1986

(73) Inhaber:
CIBA-GEIGY AG, Basel

(72) Erfinder:
Fischer, Jan A., Prof. Dr., Küsnacht ZH

(54) Substanz aus der Gruppe der Calcitonine.

(57) Eine Substanz aus der Gruppe der Calcitonine, die aus dem menschlichen Körper isoliert oder auf anderem Wege erhalten werden kann, sich jedoch deutlich von dem bekannten humanen Calcitonin-(1-32) unterscheidet, mit hypocalcämischer Wirkung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Substanz aus der Gruppe der Calcitonine, nachstehend auch als menschliches Calcitonin 2, abgekürzt hCT 2, bezeichnet, mit folgenden Eigenschaften:

a) Fähigkeit zur Reaktion mit Antikörpern, die das zum Stand der Technik gehörende humane Calcitonin-(1–32), abgekürzt hCT, bei der Konzentration, bei der hCT 2 bereits erkannt wird, nicht erkennen, dabei aber mit dem Salm-Calcitonin-1(1–32), abgekürzt sCT, noch bei einer bis zu 10^5fach geringeren Konzentration als mit hCT reagieren können.

b) Retentionszeit nicht unterscheidbar von der des synthetisch hergestellten sCT in folgendem Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-System:

Adsorbens: Kieselgel, an das über Si-C-Bindungen Octadecylgruppen gebunden sind, in Form von durch und durch porösen, kugelförmigen Teilchen mit einer Korngrösse von $10 \pm 1{,}5$ µm, einem mittleren Porendurchmesser von 10^{-8} m, einem Porenvolumen von 1,0 ml/g und einer spezifischen Oberfläche von 300 m^2/g, die bis 600 bar druckstabil sind, 250 mm lange Säule mit Durchmesser 4,6 mm, Beladung mit I ng bis 20 µg hCT 2, linearer Gradient, bestehend aus den Lösungen A, das heisst 0,1 molare wässrige Heptafluorbuttersäure, und 25–73 Volumenprozent B, wobei B aus 20 Volumenprozent der Lösung A und 80 Volumenprozent Acetonitril besteht, entsprechend 20–58 Volumenprozent Acetonitril, über 90 Minuten bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,5 ml/Minute,

c) im humanen Serum keine Auslösung der Bildung nachweisbarer Mengen von Antikörpern, die in der Lage sind, mit sCT zu reagieren, wobei zum Versuch dieses Nachweises die Bindung an [^{125}I]sCT mit der spezifischen Aktivität von 600 Ci/mmol verwendet wird, und ihre Salze.

2. Eine Substanz nach Anspruch 1 oder ein Salz davon in einer gegenüber dem natürlichen Vorkommen angereicherten Konzentration.

3. Eine Substanz nach Anspruch 1 oder ein Salz davon in im wesentlichen reiner Form.

4. Eine Substanz nach einem der Ansprüche 1–3 oder ein Salz davon, bestimmt zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

5. Pharmazeutische Präparate, die eine wirksame Menge einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1–3 oder eines Salzes davon zusammen mit einer signifikanten Menge eines pharmazeutischen Trägermaterials enthalten.

6. Verwendung einer Substanz nach einem der Ansprüche 1–3 oder eines Salzes davon zur Herstellung eines Arzneimittels.

7. Verwendung nach Anspruch 6 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Knochenstoffwechselstörungen.

8. Verfahren zur Herstellung einer Substanz nach einem der Ansprüche 1–3 oder eines Salzes davon, dadurch gekennzeichnet, dass man menschliches Blutserum bei 4 °C und 48 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert, den klaren Überstand auf Octadecasilyl-Kieselgel-Patronen in 0,1 vol.-%iger wässeriger Trifluoressigsäure adsorbiert, hCT 2 aus den Patronen mit 60 vol.-%igem wässrigem Acetonitril, das 0,1 Volumenprozent Trifluoressigsäure enthält, eluiert, das Eluat lyophilisiert, das Lyophilisat mit 0,1 molarer Essigsäure behandelt, den gelösten Teil bei 4 °C und 48 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert, den klaren Überstand im obengenannten Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-System chromatographiert und hCT 2 aus der entsprechenden Fraktion isoliert und gegebenenfalls die erhaltene Substanz in ein Salz überführt.

9. Die nach dem Verfahren des Anspruchs 8 hergestellte Substanz und ihre Salze.

Die Erfindung betrifft eine Substanz aus der Gruppe der Calcitonine und ihre Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung als Arzneimittel und pharmazeutische Präparate, die diese Substanz zusammen mit einem pharmazeutischen Trägermaterial enthalten.

Die Erfindung betrifft eine Substanz aus der Gruppe der Calcitonine, nachstehend auch als menschliches Calcitonin 2, abgekürzt hCT 2, bezeichnet, die aus dem menschlichen Körper isoliert oder auf anderem Wege erhalten werden kann, mit folgenden Eigenschaften:

a) Fähigkeit zur Reaktion mit Antikörpern, die das zum Stand der Technik gehörende humane Calcitonin-(1–32), abgekürzt hCT, bei der Konzentration, bei der hCT 2 bereits erkannt wird, nicht erkennen, dabei aber mit dem Salm-Calcitonin-(1–32), abgekürzt sCT, noch bei einer bis zu 10^5fach geringeren Konzentration als mit hCT reagieren können.

b) Retentionszeit nicht unterscheidbar von der des synthetisch hergestellten sCT in folgendem Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-System (HPLC-System):

Adsorbens: Nucleosil 10 C_{18}® oder ein anderes Adsorbens mit vergleichbaren Eigenschaften, 250 mm lange Säule mit Durchmesser 4,6 mm, Beladung mit 1 ng bis 20 µg hCT 2, linearer Gradient, bestehend aus den Lösungen A (0,1 molare wässerige Heptafluorbuttersäure) und 25–73 Volumenprozent B (20 Volumenprozent der Lösung A und 80 Volumenprozent Acetonitril), entsprechend 20–58 Volumenprozent Acetonitril, über 90 Minuten bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,5 ml/Minute,

c) im humanen Serum keine Auslösung der Bildung nachweisbarer Mengen von Antikörpern, die in der Lage sind, mit sCT zu reagieren, wobei zum Versuch dieses Nachweises die Bindung an [^{125}I]sCT mit der spezifischen Aktivität von 600 Ci/mmol verwendet wird, und ihre Salze.

Das als Nucleosil 10 C_{18} bezeichnete Adsorbens im HPLC-System besteht aus Kieselgel, an das über Si-C-Bindungen Octadecylgruppen gebunden sind. Das Kieselgel liegt vor in Form von durch und durch porösen, kugelförmigen Teilchen mit einer Korngrösse von $10 \pm 1{,}5$ µm, einem mittleren Porendurchmesser von 10^{-8} m, einem Porenvolumen von 1,0 ml/g und einer spezifischen Oberfläche (BET) von 300 m^2/g, die bis 600 bar druckstabil sind. Nucleosil 10 C_{18} wird geliefert von der Firma Macherey Nagel, Werkstrasse 6–8, Postfach 307, D-5160 Düren.

Die erfindungsgemässe Substanz, hCT 2, kommt in geringer Konzentration z.B. im menschlichen Gehirn, in der menschlichen Schilddrüse und im menschlichen Blutserum vor.

Die Erfindung betrifft hauptsächlich die obengenannte erfindungsgemässe Substanz und ihre Salze ausserhalb eines lebenden Organismus und in einer gegenüber dem natürlichen Vorkommen angereicherten Konzentration, in allererster Linie hCT 2 in im wesentlichen reiner Form oder zusammen mit beigemischten pharmazeutischen Trägermaterialien.

hCT 2 unterscheidet sich vom bekannten hCT im obengenannten HPLC-System durch eine deutlich andere Retentionszeit, dagegen weist hCT 2 eine praktisch identische Retentionszeit wie sCT auf. Diese Tatsache weist darauf hin, das hCT 2 hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung, wenn auch nicht notwendigerweise der Aminosäuresequenz, näher mit dem sCT als mit dem hCT verwandt ist. In immunologischer Hinsicht dagegen unterscheidet sich hCT 2 vom sCT wesentlich. Während sCT als artfremdes Peptid im menschlichen Serum eine Antikörperantwort hervorruft, werden keine für sCT spezifischen Antikörper als Antwort auf die Gegenwart von hCT 2 im menschlichen Serum gebildet, wie sich mit dem obengenannten RIA nachweisen lässt.

Es darf angenommen werden, dass überhaupt keine Antikörper, weder solche, die spezifisch für sCT sind, noch

andere, gegen hCT 2 im menschlichen Serum gebildet werden, da hCT 2 als körpereigene Substanz nicht als immunologisch fremd erkannt werden dürfte.

Nach den bisherigen Befunden handelt es sich bei hCT 2 um nur eine chemische Verbindung. Theoretisch besteht jedoch die Möglichkeit, dass es sich bei hCT 2 auch um ein Gemisch von neuen Calcitoninen handelt, dessen einzelne Komponenten im obengenannten HPLC-System nicht sichtbar getrennt werden. Im letzteren Falle betrifft die Erfindung sowohl das Gemisch als auch jede einzelne Komponente des Gemisches. Die einzelnen Komponenten können auf übliche Weise, z.B. durch Chromatographie in einem geeigneten anderen HPLC-System getrennt oder einzeln nach an sich bekannten Methoden der Peptidchemie synthetisch oder gentechnisch hergestellt werden. Die zur Synthese vorgängig notwendige Strukturaufklärung der einzelnen Komponenten kann auch an dem Gemisch vorgenommen werden.

Die Erfindung betrifft auch die Salze, insbesondere die Säureadditionssalze, von hCT 2, vor allem pharmazeutisch verwendbare, ungiftige Salze mit Säuren, z.B. mit anorganischen Säuren, insbesondere Mineralsäuren, z.B. Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure, oder Salze mit organischen Carbon-, Sulfon- oder Sulfosäuren, z.B. Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Hydroxymaleinsäure, Methylmaleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Salicylsäure, 4-Aminosalicylsäure, 2-Phenoxybenzoesäure, 2-Acetoxybenzoesäure, Embonsäure, Nicotinsäure,oder Isonicotinsäure, ferner Aminosäuren sowie Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Ethan-1,2-disulfonsäure, Benzolsulfonsäure, 4-Methyl-benzolsulfonsäure oder Naphthalin-2-sulfonsäure, oder mit anderen sauren organischen Verbindungen, wie Ascorbinsäure.

Zur Isolierung oder Reinigung können auch pharmazeutisch ungeeignete Salze Verwendung finden. Zur therapeutischen Anwendung gelangen nur die pharmazeutisch verwendbaren, nichttoxischen Salze, die deshalb bevorzugt werden.

hCT 2 hat hypocalcämische Wirkung, d.h. es erniedrigt den Calcium- und Phosphatspiegel im Blut und schützt die Knochen vor Mineralverlust und kann daher als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere für die gleichen Indikationen wie hCT, z.B. das auf dem Markt befindliche Cibacalcin®, z.B. bei Knochenstoffwechselstörungen, wie Osteoporose oder Morbus Paget.

Die an einen Warmblüter, insbesondere den Menschen, von etwa 70 kg Körpergewicht zu verabreichenden Dosen von hCT 2 betragen etwa 5 µg bis etwa 50 µg, z.B. etwa 20 µg, pro Tag. Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise parenteral, z.B. an 5 Tagen in der Woche während etwa 3 Monaten.

hCT 2 weist auch Wirkungen auf das zentrale Nervensystem auf. Wie mittels Rezeptor-Autoradiographie festgestellt werden kann, befinden sich Bindungsstellen für hCT 2 im menschlichen Gehirn. Da zudem die Konzentration von hCT 2 im Gehirn ähnlich derjenigen von hCT ist, während in der Schilddrüse hCT in etwa 200fach höherer Konzentration als hCT 2 auftritt, kommt der Wirkung von hCT 2 auf das Zentralnervensystem eine grössere Bedeutung zu als den bekannten Funktionen von hCT im Nervensystem.

hCT 2 wird z.B. erhalten, indem man menschliches Blutserum bei 4 °C und 48 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert, den klaren Überstand auf Octadecasilyl-Kieselgel-Patronen, vorzugsweise Octadecasilyl-Kieselgel-Sep-Pak-C_{18}-Patronen (Waters Assoc., Milford, Massachusetts), in 0,1%iger wässeriger Trifluoressigsäure adsorbiert, hCT 2 aus den Patronen mit 60% (v/v) wässerigem Acetonitril, das 0,1% Trifluoressigsäure enthält, eluiert, das Eluat lyophilisiert, das Lyophilisat mit 0,1molarer Essigsäure behandelt, den gelösten Teil bei 4 °C und 48 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert, den klaren Überstand im obengenannten HPLC-System chromatographiert und hCT 2 aus der entsprechenden Fraktion isoliert.

Zum Zweck der Auffindung der hCT 2 enthaltenden Fraktion(en) verwendet man einen Radioimmunoassay ([^{125}I] sCT mit der spezifischen Aktivität von 500 Ci/mmol, Antikörper gegen synthetisches sCT, als Standard synthetisches sCT).

Die Erfindung betrifft insbesondere gemäss dem vorstehend und in den Beispielen beschriebenen Isolierungsverfahren erhältliches hCT 2 oder ein Salz davon.

Die Salze von hCT 2 können in an sich bekannter Weise hergestellt werden. Säureadditionssalze erhält man z.B. durch Behandeln mit einer geeigneten Säure, z.B. einer der obengenannten Säuren, oder einem geeigneten Anionenaustauschreagenz.

Salze können in üblicher Weise in die freien Verbindungen übergeführt werden, Säureadditionssalze z.B. durch Behandeln mit einem geeigneten basischen Mittel.

Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Präparate, die als Wirkstoff eine wirksame Dosis von hCT 2 oder ein Salz davon zusammen mit einer signifikanten Menge eines pharmazeutischen Trägermaterials enthalten, insbesondere solche Präparate zur intranasalen oder parenteralen, wie intramuskulären oder intravenösen Applikation an Warmblüter, wie in allererster Linie den Menschen.

Die Dosierung des Wirkstoffes hängt von der Warmblüter-Spezies, dem Körpergewicht, Alter und dem individuellen Zustand, der zu behandelnden Krankheit sowie von der Applikationsweise ab.

Die neuen pharmazeutischen Präparate zur parenteralen Applikation enthalten in gebrauchsfertiger Form von etwa 0,001 Gewichtspromille bis etwa 1 Gewichtsprozent, vorzugsweise von etwa 0,005 Gewichtspromille bis etwa 0,1 Gewichtspromille, z.B. 0,01 Gewichtspromille, des Wirkstoffes. Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate können z.B. in Dosiseinheitsform, wie Ampullen, vorliegen.

Vorzugsweise verwendet man Lösungen des Wirkstoffes, daneben auch Suspensionen, und zwar insbesondere isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, wobei diese z.B. bei lyophilisierten Präparaten, welche die Wirksubstanz allein oder zusammen mit einem Trägermaterial, z.B. Mannit, enthalten, vor Gebrauch hergestellt werden können. Insbesondere zur intranasalen Anwendung besonders geeignet sind Suspensionen in Öl. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe, z.B. Konservier-, Stabilisier-, Netz- und/oder Emulgiermittel, Löslichkeitsvermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Druckes und/oder Puffer enthalten und werden in an sich bekannter Weise, z.B. mittels konventioneller Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren hergestellt. Die genannten Lösungen oder Suspensionen können viskositätserhöhende Stoffe, wie Natrium-Carboxymethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder bevorzugterweise Gelatine, enthalten.

Suspensionen in Öl enthalten als ölige Komponente die für Injektionszwecke gebräuchlichen vegetabilen, synthetischen oder halbsynthetischen Öle. Als solche sind insbesondere flüssige Fettsäureester zu nennen, die als Säurekomponente eine langkettige Fettsäure mit 8–22, besonders 12–22 Kohlenstoffatomen, wie z.B. Laurinsäure, Tridecylsäure, Myristinsäure, Pentadecylsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure oder entsprechende ungesättigte Säuren, wie z.B. Ölsäure, Elaidinsäure, Erucasäure, Brasidinsäure oder Linolsäure, enthalten. Die Alkoholkomponente hat maximal 6 Kohlenstoffatome und ist ein ein- oder mehrwertiger, z.B. ein-, zwei- oder dreiwertiger Alkohol, z.B. Methanol, Äthanol, Propanol, Butanol oder

Pentanol oder deren Isomere, vor allem aber Glycol oder Glyzerin. Als Fettsäureester sind daher beispielsweise zu nennen: Äthyloleat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, «Labrafil M 2735» (Polyoxyäthylenglyzerintrioleat der Firma Gattefossé, Paris), «Miglyol 812» (Triglyzerid gesättigter Fettsäuren der Kettenlänge C_8 bis C_{12} der Firma Chemische Werke Witten/Ruhr, Deutschland), besonders aber vegetabile Öle wie Baumwollsaatöl, Mandelöl, Olivenöl, Ricinusöl, Sesamöl, Sojabohnenöl, vor allem Erdnussöl.

Die Herstellung der Injektionspräparate erfolgt in üblicher Weise unter antimikrobiellen Bedingungen, ebenso das Abfüllen in Ampullen oder Vials sowie das Verschliessen der Behälter.

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die Erfindung. Temperaturen sind in Celsiusgraden angegeben.

Beispiel 1: Extraktion von hCT 2 aus menschlichem Plasma und Reinigung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Venöses Blut von Normalpersonen wird in heparinisierten Vacutainern (Becton Dickinson France SA, Grenoble, F) entnommen, anschliessend zweimal während 10 Minuten bei 4 °C und 1700 × g zentrifugiert (Zentrifuge: Superspeed RC-2B, Sorvall, Newton, Connecticut, USA), die Überstände vereinigt und bei –20 °C eingefroren. Das Plasma wird innerhalb von 2 Wochen aufgetaut und während 30 Minuten bei 4 °C und 48 000 × g zentrifugiert (Festwinkelrotor: Sorvall SS-34, Polyäthylen-Röhrchen: Du Pont Instruments, Newton, Connecticut, USA). Die vereinigten Überstände (im Minimum 20 ml) werden bei 4 °C portionenweise (3–5 ml) nach folgender Methode durch Adsorption an Ocadecasilyl-Kieselgel (Sep-Pak-C_{18}-Patronen, Waters Assoc., Milford, Massachusetts, USA) extrahiert.

Extraktion

Vor dem Auftragen der Plasmaprobe wird die Sep-Pak-Patrone auf eine 10-ml-Wegwerfspritze (Henke-Sass Wolf GmbH, BRD) mit Luer-lock-Anschluss gesteckt und mit 5 ml Methanol (Merck AG, Darmstadt, BRD), gefolgt von 10 ml 0,1% Trifluoressigsäure (TFA, sequencer grade, Rathburn Chemicals, Walkerburn, GB) in aqua bidest. (v/v) benetzt. Anschliessend wird eine zweite 10-ml-Wegwerfspritze mit aufgesetztem Kolben auf die Patrone gesteckt, 3–5 ml Plasma in die erste Spritze gefüllt und langsam in die zweite Spritze gepresst, ohne dass Luft in die Patrone gelangt. Nach fünfmaligem Hinundherpressen des Plasmas wird eine Spritze entfernt, das Plasma ein letztes Mal durchgepresst und verworfen. Daraufhin wird die Patrone mit 10 ml 0,1% TFA gewaschen und schliesslich mit 3 ml 60% Acetonitril/0,1% TFA (v/v) tropfenweise in ein Plastik-Szintivial (Packard Inst. Company, Downers Grove, Illinois, USA) eluiert. In einem Behälter werden 5 Eluate vereinigt, in flüssigem Stickstoff schräg eingefroren und lyophilisiert. Nach der Gefriertrocknung wird der erhaltene Extrakt in je 1 ml 60% Acetonitril/0,1% TFA aufgelöst. Bei Extraktionen von mehr als 25 ml Plasma werden mehrere Extrakte in einem Szintivial vereinigt. Die leeren Vials werden mit der gleichen Menge Lösungsmittel gespült und die Spülflüssigkeit zu den vereinigten Extrakten gegeben, eingefroren und nochmals lyophilisiert. Dieses Lyophilisat wird in 2 ml 0,1-M-Essigsäure (Merck) gelöst, bei 48 000 × g und 4 °C während 20 Minuten in einem Polycarbonatröhrchen zentrifugiert und der Überstand anschliessend mittels Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt.

HPLC

Die HPLC-Analysen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Anlage besteht aus zwei Pumpen (Modell 110A, Altex, Berkeley, California, USA), einer Hochdruck-Gradientenmischkammer (Altex, Modell 400) sowie einem Mikroprozessor/Programmer (Altex, Modell 420) als Steuereinheit. Die Proben werden manuell durch einen septumlosen, mit einer 2-ml-Probenaufgabeschlaufe versehenen Injektor (Modell RE 7125, Rheodyne Inc., Berkeley, California, USA) aufgetragen. Als Kolonnen dienen nach der slurry-Technik von oben nach unten mit Nucleosil 10 µ C_{18} (Macherey Nagel, Düren, BRD) gefüllte Säulen aus rostfreiem Stahl (25 cm lang, 4,6 mm Innendurchmesser, Altex). Lösung A besteht aus 0,1 M wässeriger Heptafluorbuttersäure (sequencer grade, Rathburn Chemicals), die zusätzlich durch eine benetzte Sep-Pak-C_{18}-Patrone gepresst worden ist. Lösung B besteht aus 20% Lösung A und 80% Acetonitril (HPLC-grade S, Rathburn Chemicals) (v/v). Die Lösungen werden vor der Analyse während 2 Minuten mit Helium begast und die Säule während etwa einer Stunde mit 25% Lösung B und 75% Lösung A bei einem Fluss von 1,5 ml/Minute äquilibriert. Nach einer Ladephase von 2,5 Minuten unter Anfangsbedingungen (25% Lösung B, enthält 20% Acetonitril) werden die Peptide mit einem linearen Gradienten von 25% bis 73% der Lösung B (20–58% Acetonitril) während 90 Minuten und einem Fluss von 1,5 ml/Minute eluiert. Eluentfraktionen von etwa 1,5 ml (95 Fraktionen in 100 Minuten) werden nach Durchgang durch einen UV-Detektor (Uvikon LCD 725, mit variabler Wellenlänge, eingestellt auf 254 nm, Vollausschlag bei 0,05 bis 0,1 Absorptionseinheiten, Aufzeichnung mittels W + W-Schreiber Tarkan 600, beides Kontron AG, Zürich, CH) und ein durch den Mikroprozessor gesteurtes Motorventil (Altex, Modell 402, mit Umschaltmöglichkeit auf Abfall oder Fraktionensammler) in einem synchronisierten Fraktionensammler (Buchler Alpha 200, Kontron AG) in silikonisierten Glasröhrchen gesammelt. Zur Verminderung einer möglichen Adsorption der Peptide an der Glaswand werden vor der Analyse in jedes Röhrchen 300 µl einer Lösung von 1% bovinem Serumalbumin (Behring Werke, Marburg-Lahn, BRD) und 0,05% Natriumazid (Fluka AG, Buchs, CH) (w/v) in 0,1-M-Essigsäure gegeben. Die Fraktionen werden auf einem Vortex-Mischer (Scientific Industries Inc., Springfield, Massachusetts, USA) gemischt, bei –20 °C eingefroren und lyophilisiert. Vor der unten beschriebenen radioimmunologischen Bestimmung der Calcitoninkonzentration werden je 0,5 ml 0,01-M-Essigsäure in die Röhrchen gegeben und vermischt.

Die Wiederauffindungsrate von synthetischem humanen Calcitonin-(1–32), welches vor der Extraktion zum Plasma gegeben worden ist, beträgt nach der HPLC noch 40% bis 70%.

Nach jedem HPLC-Lauf werden Säule und Probenschlaufe nacheinander mit je 15 ml Lösung B, 150 ml 90% Methanol/1% TFA, 40 ml Butanol-1 und 140 ml Methanol, unter welchem die Säule auch aufbewahrt wird, regeneriert.

Messmethode (radioimmunologische Bestimmung der Calcitoninkonzentration)

Die Konzentration des hCT 2 wird radioimmunologisch in einer Konzentrationsreihe bestimmt. 10, 20, 50 und 100 µl der HPLC-Fraktionen, die wie oben beschrieben nachbehandelt worden sind, werden während 3 Tagen bei 4 °C zusammen mit 100 µl Antikörperserum zu synthetischem sCT (Sandoz AG, Basel, Schweiz) in einem Immunoassaypuffer bei einem Totalvolumen von 300 µl vorinkubiert (Immunoassaypuffer: 0,05 M Phosphat, pH 7,5, 10% humanes Serum, das keine nachweisbaren Mengen immunreaktives sCT enthält), und anschliessend nach Zugabe von 200 µl Assaypuffer mit 15 000 dpm [^{125}I]sCT (spezifische Aktivität 600 Ci/mmol) während weiteren 3 Tagen bei 4 °C inkubiert. Die Markierung von sCT mit ^{125}I wird mit Chloramin-T (Eastman Kodak, Rochester, USA) im wesentlichen nach der Methode

von W.M. Hunter und F.C. Greenwood (Nature [London] 194, 495–496 [1962]) durchgeführt. Bei der Endverdünnung der Antikörper (1:25 000) werden 30% bis 40% der Antikörper an das [^{125}I]sCT gebunden, d.h. die spezifische Bindung beträgt 30–40%. Als Standard dient dasselbe synthetische sCT; eine halb maximale Hemmung der Bindung von [^{125}I] sCT an die Antikörper erfolgt mit etwa 100 pg sCT (= 0,03 pmol). Eine vergleichbare Hemmung der Bindung wird durch 10 µg hCT nicht erreicht.

Das obengenannte Antikörperserum erhält man folgendermassen: Die Antikörper werden in einer 25 kg schweren Ziege erzeugt nach Primärimmunisierung mit 200 µg sCT (siehe oben) als Antigen und Reimmunisierung mit 100 µg des gleichen Antigens 30 Tage nach der Primärimmunisierung. Zur Immunisierung wird sCT in 0,01 M Essigsäure (1 mg/ml) gelöst, mit 2 Gewichtsprozent festem Aluminiumhydroxid (Alhydrogel, Superfos Export Co. a/s Kopenhagen, DK) vermischt und in einem gleichen Volumen komplettem Freundschen Adjuvans (Difco Labaratories, Detroit, Michigan, USA) in Suspension gebracht. Diese Suspension wird in einem Omnimixer (Sorvall) auf der höchsten Stufe bei 4 °C erzeugt. 0,5–1,0 ml Suspension werden in Wegwerfspritzen (Primo 1 ml, Asik I/S, DK) aufgezogen und bei jedem Bein im Bereich der subaxillären Lymphknoten subkutan verabreicht. 10 Tage nach der obengenannten Reimmunisierung werden 50–80 ml Blut, das die gewünschten Antikörper gegen sCT enthält, aus der Vene jugularis in heparinisierte Röhrchen entnommen und das erhaltene Plasma in Portionen von 3–5 ml bei –20 °C aufbewahrt.

Die Antikörper werden durch Messung der Bindung des entnommenen Plasmas an [^{125}I]sCT nachgewiesen. Antikörpergebundenes und freies [^{125}I]sCT trennt man mittels Dextran-beschichteter Holzkohle, im wesentlichen nach der Methode von V. Herbert, K.-S. Lau, C.W. Gottlieb und S.J. Bleicher [J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1375–1384 (1965)]. Die gleiche Methode dient zum Antikörpernachweis im humanen Serum.

Chromatographie-Profil

Das Chromatographie-Profil der oben beschriebenen HPLC-Trennung ist in Figur 1 abgebildet. Auf der Ordinate ist die Konzentration aufgetragen, angegeben in Picogrammäquivalenten, wobei für die mit ● und ▲ einerseits sowie für die mit O andererseits gekennzeichneten Kurven verschiedene Massstäbe gelten.

Auf der Abszisse ist die seit Beginn der Elution verstrichene Zeit aufgetragen. Die gestrichelte Grade gibt die Zusammensetzung des zur Elution verwendeten linearen Gradienten durch Angabe des Acetonitril-Gehaltes an. Die mit a oder b gekennzeichneten Pfeile geben den Ort der Elution von hCT bzw. von sCT an.

Zur Ermittlung der in Fig. 1 angegebenen Konzentrationswerte wird für jede der drei mit ausgefüllten Kreisen «●», Dreiecken «▲» oder leeren Kreisen «O» gekennzeichneten Kurven ein anderer Radioimmunoassay (verschiedene Antikörper) verwendet, und zwar für die mit ausgefüllten Kreisen gekennzeichneten Konzentrationswerte ein RIA gegen synthetisches hCT (vgl. F.M. Dietrich, W.H. Hunziker und J.A. Fischer, Acta Endocrinologica 80 [1975] 465–486), für die mit Dreiecken gekennzeichneten Konzentrationswerte der oben beschriebene RIA gegen synthetisches sCT und für die im Rahmen dieser Anmeldung weniger interessierenden mit leeren Kreisen gekennzeichneten Konzentrationswerte ein RIA gegen menschliches PDN-21. Synthetisch hergestelltes PDN-21, ein Peptid mit 21 Aminosäuren, ist beschrieben von Macintyre et al., Nature (London) 300, 460–462.

Beispiel 2: Gelatinelösung

Eine sterilfiltrierte wässrige Lösung von hCT 2 wird unter Erwärmen mit einer sterilen Gelatinelösung, welche als Konservierungsmittel Phenol enthält, unter aseptischen Bedingungen vermischt, so dass 1,0 ml Lösung folgende Zusammensetzung hat:

hCT 2	10 µg
Gelatine	150,0 mg
Phenol	4,7 mg
dest. Wasser bis zu	1,0 ml

Die Mischung wird aseptisch in Vials zu 1,0 ml abgefüllt.

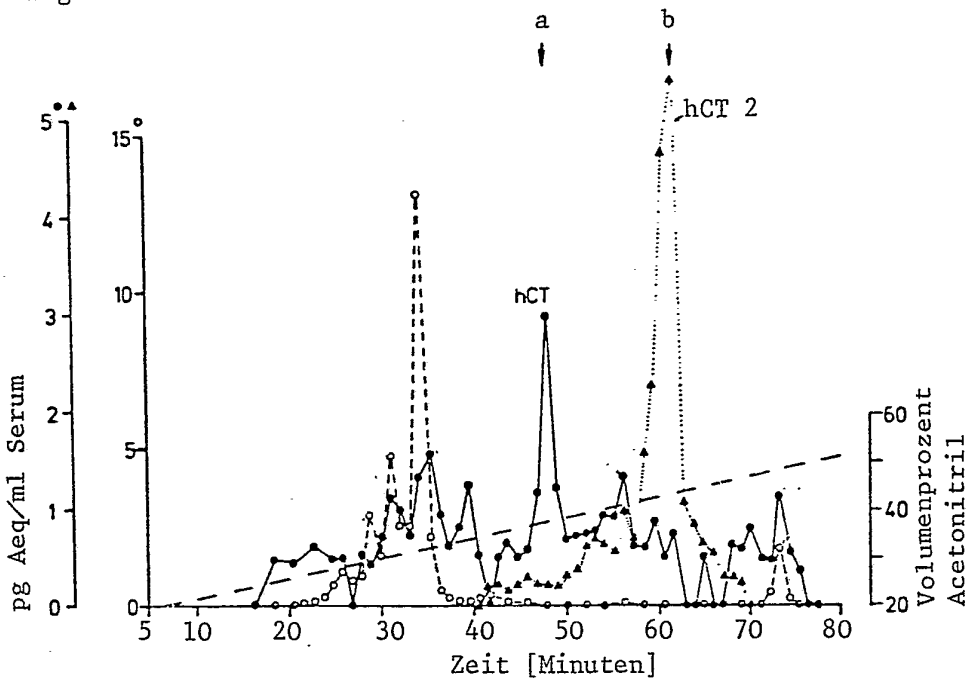
Beispiel 3: Sterile Trockensubstanz zur Injektion

Man löst 5 µg hCT 2 in 1 ml einer wässrigen Lösung mit 20 mg Mannit. Die Lösung wird sterilfiltriert und unter aseptischen Bedingungen in eine 2-ml-Ampulle gefüllt, tiefgekühlt und lyophilisiert. Vor dem Gebrauch wird das Lyophilisat in 1 ml destilliertem Wasser oder 1 ml physiologischer Salzlösung gelöst. Die Lösung wird intramuskulär oder intravenös angewendet. Diese Formulierung kann auch in Doppelkammerspritzampullen abgefüllt werden.

Beispiel 4: Nasenspray

In einer Mischung von 3,5 ml «Miglyol 812» und 0,08 g Benzylalkohol werden 200 µg feingemahlenes (< 5,0 µ) hCT 2 suspendiert. Diese Suspension wird in einen Behälter mit Dosierventil eingefüllt. Es werden nun 5,0 ml «Freon 12» unter Druck durch das Ventil in den Behälter abgefüllt. Durch Schütteln wird das «Freon» in der Miglyol-Benzylalkoholmischung gelöst. Dieser Spraybehälter enthält etwa 100 Einzeldosen, die einzeln appliziert werden können.

Figur 1:


a
b
hCT 2
hCT
pg Aeq/ml Serum
Volumenprozent Acetonitril
Zeit [Minuten]
0
1
2
3
4
5
10
15
20
40
60
80
5
10
20
30
40
50
60
70
80