

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①1 CH 647 530 A5

⑤1 Int. Cl.4: C 07 G 15/00
C 07 K 15/06

// A 61 K 37/24

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①2 PATENTSCHRIFT A5

②1 Gesuchsnummer: 598/81	⑦3 Inhaber: Hypolab S.A., Coinsins
②2 Anmeldungsdatum: 29.01.1981	
③0 Priorität(en): 01.02.1980 US 117444	⑦2 Erfinder: Bigazzi, Mario, Firenze (IT)
②4 Patent erteilt: 31.01.1985	
④5 Patentschrift veröffentlicht: 31.01.1985	⑦4 Vertreter: Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤4 Verfahren zur Gewinnung von Human-Relaxin.

⑤7 Human-Relaxin wird aus Human-Eihaut gewonnen, speziell aus der Chorion-Dezidua-Schicht. Es dient dazu, die Relaxation von Beckenbändern zu fördern, und ist beim Menschen anwendbar.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung von Human-Relaxin, gekennzeichnet durch

- a) Feinschneiden und Homogenisieren der Human-Eihaut und
- b) Ausfällen und Abtrennen von Geweberückständen und der schwersten Zellular-Organellen, um so einen rohen relaxinhaltigen Extrakt zu erhalten.

2. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, in dem das Amnion von der Eihaut abgetrennt und verworfen wird und in dem die Chorion-Dezidua-Schicht als Ausgangsmaterial für den Schritt a) verwendet wird.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, in dem die Dezidua von der Chorion-Dezidua-Schicht abgetrennt und als Ausgangsmaterial für den Schritt a) verwendet wird.

4. Verfahren zur Gewinnung von Human-Relaxin durch in-vitro-Kultivierung, gekennzeichnet durch

- a) Inkubieren von Humangewebe, bzw. -zellen der Dezidua und
- b) Reindarstellung von Relaxin aus dem Inkubierungsmedium.

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Human-Relaxin aus Human-Ausgangsmaterial.

Relaxin ist ein Polypeptid-Hormon, welches die Relaxation der Beckenbänder von Säugern fördert. Hisaw hat die Anwesenheit von Relaxin zum ersten Mal im Jahre 1926 beschrieben (Proc. Soc. Exp. Biol. 23,661, 1926). Trotz der vielen Jahre seit der Entdeckung von Relaxin ist bis heute relativ wenig Information über dieses Hormon bekannt, speziell was Human-Relaxin betrifft.

Relaxin ist in verschiedenen, tierischen Geweben nachgewiesen worden, und zwar sowohl bei Säugern wie auch bei Nichtsäugern. Bis heute gelten als einzige extraktionswürdige Ausgangsmaterialien für Relaxin die Eierstöcke von trächtigen Säuen. Bei Menschen ist, bezüglich Relaxin, sehr wenig bekannt hinsichtlich seiner Herkunft, seinen physiologischen und pathologischen Wirkungen sowie seiner Struktur.

Human-Eierstöcke von schwangeren Frauen scheinen ebenfalls reich zu sein an Relaxin-ähnlichen Aktivitäten. Verständlicherweise ist es jedoch praktisch unmöglich, aus diesem Ausgangsmaterial Relaxin zu gewinnen.

Diese Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass die Human-Eihaut ein neues, leicht erhältliches Ausgangsmaterial für die Extraktion von Relaxin darstellt. Der Komplex der Eihaut wird leicht und in genügenden Mengen zusammen mit der Plazenta bei Geburten erhalten.

Speziell wurde festgestellt, dass die Dezidua sehr reich an Relaxin ist.

Die sogenannte Eihaut besteht aus einem Komplex von drei Schichten: Amnion, Chorion und Dezidua.

Das Amnion wird leicht von der Chorion-Dezidua-Schicht mittels Delamination abgetrennt. Dagegen ist die Auftrennung der Restschicht in Chorion und Dezidua sehr schwierig.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Gewinnung von Human-Relaxin ist in den vorangehenden Patentansprüchen 1 und 4 charakterisiert.

Das Human-Relaxin kann also entweder direkt aus den spezifizierten Ausgangsmaterialien durch Extraktion oder, indirekt, durch Inkubierung der Ausgangsmaterialien in vitro gewonnen werden.

Die biologischen Untersuchungen zur Feststellung der

Aktivität von relaxinhaltigen Präparaten beruhen normalerweise auf den folgenden Methoden:

- 1. Messung der Inhibierung von spontanen Uteruskontraktionen, sowohl in vivo wie in vitro und
- 2. Bestimmung der Relaxation des Symphis pubis mittels

- a) Palpation beim Meerschweinchen,
- b) Röntgen bei der Maus oder
- c) direkte Messung bei der Maus.

Die biologische Aktivität von relaxinhaltigen Präparaten mit erfindungsgemäss erhaltenem Relaxin wurde gemäss der obigen Methode 2c) bestimmt. Die Aktivität wird in GPU, d. h. Guinea Pig Units, ausgedrückt, um so die Aktivität des erfindungsgemäss erhaltenen Human-Relaxins mit dem aus Schweinegewebe erhaltenen Relaxins gemäss dem Stand der Technik vergleichen zu können. Das letztere Relaxin wird als Standard NIH bezeichnet.

Präparate, die das erfindungsgemäss hergestellte Relaxin enthalten, zeigten auch Aktivität im Uterus-Kontraktionsinhibierungstest (siehe Beispiel 1 weiter unten).

Relaxin kann in verschiedenen pathologischen Konditionen der Schwangerschaft therapeutisch eingesetzt werden (Frühgeburt, Abortgefahr). Ebenso kann Relaxin bei ähnlichen Bedingungen in Bändergeweben eingesetzt werden (Sklerodermi und tropische Ulzeration). Zusätzlich ist Human-Relaxin von ausschlaggebender Wichtigkeit in homologen Radioimmunoassay-Vorrichtungen, welche die Anwesenheit von Relaxin in humanen Körperflüssigkeiten und -geweben erlaubt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Human-Relaxin aus Gewebe-Homogenisat

Human-Plazenta und -Eihäute wurden bei Geburten gesammelt und in einer Hank's-Lösung oder in einer gepufferten Salzlösung bei pH 7,4 gewaschen. Das Material wird sofort bei -30°C eingelagert, bis es weiterverarbeitet wird. Die Plazenta kann dabei vor oder nach der genannten Einlagerung von den Eihäuten abgetrennt werden.

Die Eihäute können gesamthaft weiterverarbeitet werden. Bevorzugterweise wird jedoch zuerst das Amnion von der Dezidua-Chorion-Schicht mittels Delamination abgetrennt und verworfen. Falls erwünscht, kann die Dezidua von der verbleibenden Chorion-Dezidua-Schicht abgetrennt und alleine weiterverarbeitet werden. Die letztgenannte Auftrennung ist jedoch sehr schwierig auszuführen und es scheint, dass sie für die Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens nicht unbedingt nötig ist.

Ungefähr 500 g Eihäute von etwa 20 Geburten wurden zusammen verarbeitet. Das Gewebe wird fein geschnitten und in 200 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Das derart erhaltene Gewebematerial wird dann gemäss einer der folgenden Methoden weiter verarbeitet:

- a) Weiterverarbeitung gemäss Schwabe und Braddon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1126, 1976: Vorerst werden 30 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und die Mischung dann 24 Stunden lang bei 4°C gehalten. Die Mischung wird darauf mit 160 ml kaltem Aceton versetzt und nochmals über Nacht bei 4°C gehalten. Der ausgefallene Feststoff wird mittels Zentrifugierung bei 2000 Umdrehungen pro Min. (15 Min.) abgetrennt und verworfen. Die klare Lösung wird mit 5 Volumen kaltem Aceton 24 Stunden lang behandelt und dann zentrifugiert bei 27 000 Umdrehungen pro Minute (30 Minuten).

- b) Weiterbehandlung gemäss Sherwood, Endocrinology,

104,886, 1979: Die Mischung wird vorerst mit einer Phosphatpufferlösung extrahiert, worauf die Geweberückstände und die schwersten Cellularorganellen mittels Zentrifugierung bei 27 000 Umdrehungen pro Minute abgetrennt wird. Der abgesetzte Feststoff wird verworfen.

In beiden Fällen wird ein rohes, relaxinhaltiges Extrakt erhalten. Das Rohextrakt kann weiterverarbeitet werden mittels serieller Chromatographie auf CM-Cellulose, auf Sephadex G-50 Superfine oder auch Sephadex G-15. Die dabei zu verwendenden Methoden sind diejenigen, die die obengenannten Autoren vorschlagen. Erhalten wird schliesslich ein reines Relaxin mit einer Aktivität zwischen 1500 und 2500 GPU und einer spezifischen Aktivität von 150 bis 1500 GPU/mg Proteinen, je nach Anzahl Chromatographie-Schritten.

Beispiel 2

Human-Relaxin aus in-vitro-Kulturen der Human-Dezidua

Die Dezidua wird von der Dezidua-Chorion-Schicht abgetrennt und fein verschnitten.

1 bis 2 g des fein geschnittenen Gewebes werden in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben, der 40 ml oxygenierter Gey's-Lösung enthält, welche durch die folgenden Zugaben modifiziert worden ist. 20 mmol Hepes, 50 U/ml Penicillin und 10% Kälberserum.

Die Kulturen werden in einem metabolischen Inkubator 10 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Medien werden dann vereinigt und mit 5 Volumen kaltem Aceton versetzt. Darauf werden sie 24 Stunden lang bei 4°C gehalten. Nun wird die erhaltene Mischung bei 27 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (30 Minuten). Erhalten wird ein Pellet, welches 15 das rohe Relaxin-Extrakt mit einer spezifischen Aktivität von 500 bis 2000 GPU/mg Proteinen enthält.

Der Roh-Extrakt kann gemäss bekannten Methoden – zum Beispiel denjenigen des Beispiels 1 – weiter gereinigt werden.