



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1573 38

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 07 G 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 G/ 2283 863

(22) 18.03.81

(44) 03.11.82

(71) siehe (72)

(72) UHLIG, HERBERT, DR. RER. NAT. HABIL.; DD;

(73) siehe (72)

(74) DIPL.-JUR. E. FRITZSCHE, INST. F. IMPFSTOFFE, 4500 DESSAU, JAHNSTR. 8

(54) VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON SERUMGONADOTROPIN (PMSG) AUS TIERSEREN

(57) Die Erfindung befaßt sich mit der Isolierung von PMSG aus dem Serum, Plasma oder Blut von traechtigen Stuten oder anderen Tieren. Ziel der Erfindung ist die großtechnische, oekonomisch vertretbare Herstellung eines injizierbaren PMSG-Präparates mit einer hohen Hormonaktivitaet und einem niedrigen Anteil an Begleitproteinen.



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes  
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

1573 38

Int.Cl.<sup>3</sup>

3(51) C 07 G 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 G/ 2283 863

(22) 18.03.81

(44) 03.11.82

(71) siehe (72)

(72) UHLIG, HERBERT, DR. RER. NAT. HABIL.; DD;

(73) siehe (72)

(74) DIPL.-JUR. E. FRITZSCHE, INST. F. IMPFSTOFFE, 4500 DESSAU, JAHNSTR. 8

(54) VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON SERUMGONADOTROPIN (PMSG) AUS TIERSEREN

(57) Die Erfindung befaßt sich mit der Isolierung von PMSG aus dem Serum, Plasma oder Blut von traächtigen Stuten oder anderen Tieren. Ziel der Erfindung ist die großtechnische, ökonomisch vertretbare Herstellung eines injizierbaren PMSG-Präparates mit einer hohen Hormonaktivität und einem niedrigen Anteil an Begleitproteinen.

Zur PS Nr. 1573 38

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

228386 3

-A-

## Verfahren zur Isolierung von Serumgonadotropin (PMSG) aus Tierseren

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein großtechnisches Verfahren zur Isolierung von Serumgonadotropin (Pregnant Mare Serum Gonadotropin = PMSG) aus dem Serum, Plasma oder Blut trächtiger Stuten oder anderer Tiere.

### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß durch Fraktionierung PMSG-haltiger Seren mit Ethanol das Hormon PMSG isoliert werden kann (Zusammenfassung siehe Hanó O. und Padr.Z. Chemie und Biologie der Hormone, VEB Fischer Verlag, Jena 1979, Seite 139).

Es ist ferner bekannt, daß durch Fällungsmittel die Serumproteine ausgefällt werden können und das PMSG durch Adsorption an Benzoessäure isoliert werden kann (Rimington, C., and Rowlands, I.W. Biochem.J. 35, 1 (1941), 736-48).

Bei der Fraktionierung mit Ethanol muß dem Serum die dreifache Menge des Ausgangsvolumens Ethanol zugegeben werden. Dieses Verfahren erfordert eine explosionsgeschützte Technologie mit hohem apparativen Aufwand, die eine ständige Gefahrenquelle darstellt. Die Beseitigung der anfallenden 75 %igen alkoholischen Ablauge ist problematisch. Die Abgabe in das Abwasser verbietet das Umweltschutzgesetz. Bei einer Redestillation ergeben sich rechtliche Konsequenzen aus dem Brantweingesetz.

Eine Entfernung der Serumproteine mit Fällungsmitteln beseitigt nicht die großen Ausgangsvolumina, aus denen an Benzoëssäure das PMSG absorbiert werden muß. Die Aufarbeitung der Benzoëssäure ist großtechnisch ökonomisch kaum durchführbar.

#### Ziel der Erfindung

Das Ziel des neuen Verfahrens ist, aus PMSG-haltigen Seren im großtechnischen Maßstab ein PMSG-Präparat zu isolieren, das weitgehend frei von Begleitproteinen ist. Das Verfahren benötigt keinen Explosionsschutz und läßt keine umweltbelastenden Abprodukte entstehen. Der Einsatz an Hilfsstoffen sowie der apparative Aufwand sind ökonomisch vertretbar.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Es wurde gefunden, daß nach Ausfällung der Serumproteine aus dem Serum, Plasma oder Blut (vorwiegend Serum und/oder Plasma) mit m-Phosphorsäure eine PMSG-haltige Lösung zurückbleibt, die nach Ausfällung der durch Hydrolyse entstandenen Phosphorsäure (als Phosphate) und niedrigmolekularer  $\text{HPO}_3$ -Proteinverbindungen mit Kalziumchlorid durch Ultrafiltration oder in einer Rotationsdünnschichtapparatur eingeeengt werden kann. Dadurch kann das Ausgangsvolumen um mehr als 99 % verringert und der PMSG-Gehalt pro Volumeneinheit entsprechend erhöht werden.

Die Verarbeitung der geringen Volumina erfolgt durch Fraktionierung mit Ethanol unter Verwendung von Azetatpuffer oder durch Dialyse und anschließender Gefriertrocknung.

Das Serum wird bei Zimmertemperatur mit der 1-1,5fachen Menge Wasser verdünnt und dazu unter Rühren eine 0,2 - 0,4 molare frisch hergestellte m-Phosphorsäure-Lösung langsam zugetropft. Nach Erreichen des pH-Wertes von 3,3 - 3,7 (bevorzugt 3,5) wird noch ca. 2 Stunden gerührt und die ausgefallenen Serumproteine werden durch Separation oder Filtration entfernt. Die abgetrennten Serumproteine werden mit einer 0,01 - 0,02 molaren frisch hergestellten m-Phosphorsäure-Lösung gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und mit ca. 10 %iger Natronlauge neutralisiert (pH 7,5 - 8,0). Dann werden soviel ml einer 5 %igen Kalziumchlorid-Lösung zugegeben bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Die PMSG-haltige Lösung wird dann durch Ultrafiltration

oder in der Rotationsdünnschichtapparatur (RDA) eingeengt. Nach der Einengung in der RDA werden die Salze durch Dialyse oder Mischbettionenaustauscher entfernt. Nach Einstellung der Isotonie, Sterilfiltration oder Gefriertrocknung ist diese konzentrierte PMSG-Lösung bereits als Injektionspräparat geeignet. Eine weitere Reinigung der geringen Volumina mit einem hohen Gehalt an PMSG kann durch Umfällen mit Ethanol unter Verwendung von Azetatpuffer bei pH 5 erreicht werden.

#### Ausführungsbeispiele

##### 1. Beispiel

100 kg PMSG-haltiges Serum oder Plasma werden in einem Rührgefäß mit 100 kg entionisiertem Wasser gemischt und unter ständigem Rühren eine frisch zubereitete 0,25 molare m-Phosphorsäure-Lösung langsam zugetropft bis ein pH-Wert von 3,5 erreicht ist. Nach ca. zweistündigem Rühren wird der Niederschlag abgetrennt und mit einer 0,02 molaren m-Phosphorsäure-Lösung von der anhaftenden Mutterlauge befreit. Die klaren Lösungen werden vereinigt und mit 10 %iger Natronlauge ein pH von 7,5 eingestellt. Dann wird soviel 5 %ige Kalziumchlorid-Lösung langsam zugetropft, bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Dabei muß der pH-Wert durch ständige Zugabe von 10 %iger Natronlauge bei pH 7,5 gehalten werden. Nach ca. einer Stunde wird der Niederschlag abgetrennt. Die PMSG-haltige Lösung wird klar filtriert und durch Ultrafiltration auf weniger als 1 l eingeengt. Nach Einstellung der Isotonie und Sterilfiltration wird bereits ein injektionsfähiges PMSG-Präparat mit einer hohen Hormonaktivität erhalten, das wegen der besseren Haltbarkeit noch gefriergetrocknet werden sollte.

Ist eine weitere Reinigung notwendig, siehe Ethanolfällung Beispiel 4.

##### Beispiel 2

Wie Beispiel 1 bis zur Abtrennung des Niederschlages nach der Fällung mit Kalziumchlorid.

Die PMSG-haltige Lösung wird dann in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf ca. 10 l eingeengt. Die eingeengte Lösung wird in einer kontinuierlichen Dialyse von Salzen befreit, wobei das

Volumen auf ca. 15 l ansteigt. Die Lösung wird nun erneut in der Rotationsdünnschichtapparatur oder einem Vakuumumlaufverdampfer bis auf weniger als 1 l eingeengt.

Nach Einstellung der Isotonie und Sterilfiltration wird bereits ein injektionsfähiges PMSG-Präparat mit einer hohen Hormonaktivität erhalten, das wegen der besseren Haltbarkeit noch gefriergetrocknet werden sollte.

Ist eine weitere Reinigung notwendig, siehe Ethanol-fällung Beispiel 4.

#### Beispiel 3

Wie Beispiel 1 bis zur Abtrennung des Niederschlages nach der Fällung mit Kalziumchlorid.

Die PMSG-haltige Lösung wird in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf ca. 10 l eingeengt. Die eingeengte Lösung wird durch einen Mischbett-Ionenaustauscher von Salzen befreit. Die dabei entstandene Lösung wird nun erneut in der Rotationsdünnschichtapparatur oder einem Vakuumumlaufverdampfer bis auf weniger als 1 l eingeengt. Nach Einstellung der Isotonie und Sterilfiltration wird bereits ein injektionsfähiges PMSG-Präparat mit einer hohen Hormonaktivität erhalten.

Ist eine weitere Reinigung notwendig, siehe Ethanol-fällung Beispiel 4.

#### Beispiel 4

Das eingeengte Endprodukt von Beispiel 1, 2 oder 3 oder die aus Beispiel 2 bzw. 3 im ersten Einengungsschritt gleich auf ca. 1 l eingeengte Lösung können durch Ethanol-fällung weiter gereinigt werden.

1 l konzentrierte PMSG-haltige Lösung wird mit 0,1 l 1 n Azetatpuffer vom pH 5 versetzt. Zu dieser Lösung werden 1,1 l Ethanol unter Rühren getropft und noch ca. 2 Stunden gerührt. Der Niederschlag wird abgetrennt und der klare Überstand mit Ethanol auf 75 % gebracht. Nach ca. 3 Stunden wird der Niederschlag abgetrennt und 2 x mit ca. 100 ml Wasser extrahiert. Nach Einstellung der Wertigkeit wird sterilfiltriert in Rollrandflaschen abgefüllt und gefriergetrocknet.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Isolierung von Serumgonadotropin (PMSG) aus Tierseren dadurch gekennzeichnet, daß man die Serumproteine mit m-Phosphorsäure ausfällt, nach Abtrennung des Niederschlages die PMSG-haltige Lösung neutralisiert und die durch Hydrolyse gebildete Phosphorsäure und die  $\text{HPO}_3$ -Proteinkomplexe durch Kalziumchlorid bei schwach alkalischem pH ausfällt und die stark verdünnte PMSG-haltige Lösung einengt.
2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß die PMSG-haltige Lösung durch Ultrafiltration auf ca. 1/100 des Ausgangsvolumens eingeengt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß die PMSG-haltige Lösung in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf ca. 1/10 des Ausgangsvolumens eingeengt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 und 3 dadurch gekennzeichnet, daß die auf 1/10 eingeengte PMSG-haltige Lösung durch kontinuierliche Dialyse von Salzen befreit wird und erneut in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf weniger als 1/100 des ursprünglichen Ausgangsvolumens eingeengt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 und 3 dadurch gekennzeichnet, daß die auf 1/10 eingeengte PMSG-haltige Lösung durch Mischbett-Ionenaustauscher von Salzen befreit wird und in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf weniger als 1/100 des Ausgangsvolumens eingeengt wird.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3, 4, 5 dadurch gekennzeichnet, daß die konzentrierte PMSG-haltige Lösung durch Fraktionierung mit Ethanol unter Zugabe von Azetatpuffer pH 5 weiter gereinigt werden kann.
7. Verfahren nach Punkt 1 und 6 dadurch gekennzeichnet, daß die PMSG-haltige Lösung in einer Rotationsdünnschichtapparatur auf ca. 1/100 des Ausgangsvolumens eingeengt wird und die konzentrierte PMSG-haltige Lösung durch Fraktionierung mit Ethanol unter Zugabe von Azetatpuffer pH 5 weiter gereinigt werden kann.