



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl. 3: A 61 K 39/395

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



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

628 813

⑳① Gesuchsnummer: 4287/77

⑦③ Inhaber:
Nordisk Insulinlaboratorium, Gentofte (DK)

⑳② Anmeldungsdatum: 05.04.1977

⑳③ Priorität(en): 06.04.1976 DK 1628/76

⑦② Erfinder:
Jörgen Frederik Hansen, Rødovre (DK)

⑳④ Patent erteilt: 31.03.1982

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.03.1982

⑦④ Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑤④ **Verfahren zur Gewinnung von Immunglobulin.**

⑤⑦ Das Verfahren zur Gewinnung von Immunglobulin aus Blutplasma oder Serum durch Ausfällen mit einem polykondensierten Diol oder Polyol wird in Gegenwart einer C₄-C₁₂-Mono- oder -Polyalkansäure durchgeführt; vorzugsweise wird Caprylsäure verwendet und bei einem pH von 4,5 bis 5,5 gearbeitet. Dadurch werden die Reinheit des Produktes und die Ausbeute erhöht.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Gewinnen von Immunglobulin durch fraktioniertes Ausfällen von Blutplasma, Serum oder einer Fraktion desselben mit einem polykondensierten Di- oder Polyol, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausfällen in Gegenwart einer Mono- oder Polyalkansäure mit 4 bis 12 Kohlenstoffatomen durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mono- oder Polyalkansäure eine Alkansäure mit 6 bis 9 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise Caprylsäure, ist.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Ausfällen mit der Alkansäure bei einem pH-Wert von 3 bis 7, vorzugsweise von 4,5 bis 5,5, durchgeführt wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Gewinnen von intravenös verabreichbarem Immunglobulin durch fraktioniertes Ausfällen von Blutplasma, Serum oder einer Fraktion desselben mit einem polykondensierten Di- oder Polyol.

Immunglobuline, hierunter Gammaglobuline, sind therapeutisch wichtig, da sie zur Herstellung immunisierender Präparate verwendbar sind.

Immunglobulin findet sich in Blutplasma tierischen Ursprungs, aus dem es durch verschiedene Ausfällungs- und Reinigungsprozesse gewonnen werden kann. So kann beispielsweise Gammaglobulin in Form konzentrierter Lösungen mit Hilfe einer von Cohn et al., vgl. J. Clin. Invest. Chem. Soc. 68, 479-75 (1946) entwickelten Methode gewonnen werden. Nach Cohn erhält man eine Fraktion II, d. h. ein 16,5%iges Konzentrat, das intramuskulär injizierbar ist.

Bei dem erwähnten bekannten Verfahren entstehen Molekülaggregate von Gammaglobulin, so dass die Präparate zur intravenösen Verabreichung ungeeignet sind. Die Methode von Cohn umfasst ein Ausfällen mit Alkohol, der wasserverdrängend wirkt und zu einer irreversiblen Denaturierung führen kann, so dass das Globulin antikomplementär wirkt. Man hat versucht, dies mit Hilfe von besonderen Separationsprozessen und/oder durch chemische Modifikation des Gammaglobulins zu vermeiden.

Es ist ein verbesserter Fraktionierprozess bekannt, bei dem das Gammaglobulin mit Polyäthylenglykol (PEG) als Fällungsmittel aus dem Blutplasma ausgefällt wird, vgl. die USA Patentschrift 3 415 804. Durch diese Massnahme wird zwar die unerwünschte Denaturierung vermieden, die Reinheit des ausgefallenen Erzeugnisses ist dabei jedoch unbefriedigend.

Gemäss der dänischen Patentanmeldung 6355/73 ist dieser Fällungsvorgang dadurch verbesserbar, dass statt Polyäthylenglykol ein Blockcopolymer von Äthylenoxid und Polyoxypropylenpolymer der in der Anmeldung ausführlicher angegebenen Art verwendet und bestimmte Fällungsbedingungen eingehalten werden. Dadurch kann bei der Gewinnung von Gammaglobulin die Ausbeute verbessert werden. Die ausgefallenen Produkte weisen jedoch nicht immer eine zufriedenstellende Reinheit und genügend niedrige antikomplementäre Aktivität auf.

Die vorliegende Erfindung fusst auf der Beobachtung, dass das fraktionierte Ausfällen von Immunglobulinen, auch Gammaglobuline genannt, mit Hilfe von Polyäthylenglykol oder einem anderen polykondensierten Di- oder Polyol wesentlich spezifischer erfolgen kann, falls das Ausfällen in Gegenwart einer Mono- oder Polyalkansäure mit 4-12 Kohlenstoffatomen erfolgt, indem u. a. Fibrinogen und Lipoproteine entfernt werden. Die spezifische Wirkung der

Mono- oder Polyalkansäuren beim fraktionierten Ausfällen beruht offenbar darauf, dass mit dem Fibrinogen, den Lipoproteinen und anderen Begleitstoffen Salze oder salzartige Additionsprodukte gebildet werden, welche unter den gegebenen Bedingungen – im Gegensatz zu den Immunglobulinen – unlöslich sind und somit leicht abgetrennt werden können. Beim erfindungsgemässen Verfahren erhält man mit einfachen Mitteln überraschend reines Immunglobulin mit grosser Ausbeute, die der mit den besten der vorgenannten bekannten Methoden erreichbaren Ausbeute völlig entspricht.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist in Verbindung mit einem beliebigen polykondensierten Di- oder Polyglykol wie Polyäthylenglykol (PEG) mit verschiedenem Molekulargewicht, beispielsweise 2000-12 000, vorzugsweise 4000-6000, oder Polypropylenglykol durchführbar. Auch Copolymere von Äthylenoxid mit Propylenoxid oder Polyäthern sind verwendbar.

Als Mono- oder Polyalkansäure kann eine beliebige Alkansäure mit 4-12 Kohlenstoffatomen benutzt werden. Es wird eine Alkansäure mit 6-9 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise Caprylsäure bevorzugt. Andere geeignete Alkansäuren sind beispielsweise die Capronsäure und die Nonansäure. Auch verzweigte Alkansäuren sind verwendbar. Werden höhere Alkansäuren mit beispielsweise 9-12 Kohlenstoffatomen benutzt, können zweckmässig eine oder mehrere zusätzliche Carboxylgruppen vorhanden sein, wodurch die Wasserlöslichkeit erhöht wird. Die gleiche Wirkung ist mit Alkansäuren mit anderen Substituenten, beispielsweise mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen oder Aminogruppen, erzielbar.

Der immunglobulinhaltigen Lösung werden zweckmässig 1-8 Gew.-% Polyäthylenglykol oder eines anderen polykondensierten Diols oder Polyols sowie 0,1-5 Gew.-% Caprylsäure oder einer anderen Alkansäure mit 4-12 Kohlenstoffatomen beigemischt, indem das Ausfällen mit der Alkansäure erfindungsgemäss zweckmässig bei einem pH-Wert 3-7, vorzugsweise 4,5-5,5 erfolgt.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird nachstehend anhand einiger Beispiele veranschaulicht.

Beispiel 1

415ml humanes Blutplasma mit einem Gehalt von 10 g Immunglobulin per Liter Plasma wird auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Es wird PEG 3000 bis zu einer Konzentration von 6% zugesetzt. Die Lösung wird 45 Minuten abgestellt. Der hauptsächlich aus Fibrinogen bestehende Niederschlag wird abzentrifugiert, und die Flüssigkeitsphase wird auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Zusatz von weiterem PEG 3000 bis zu einer Konzentration von 12% wird 45 Minuten abgestellt. Das Gemisch wird zentrifugiert, und die Albumin und α - und β -Globulin enthaltende flüssige Phase wird entfernt. Zur Erzielung einer Proteinkonzentration von etwa 4% wird der Rückstand bestehend aus unreinem Immunglobulin in einer 0,9%igen Natriumchloridlösung wieder gelöst. Die Lösung wird auf einem Seitz Ek-Filter bis zur Klarheit filtriert. Der gebildeten Lösung werden 5 g Caprylsäure und 30 g PEG 3000 per Liter Lösung zugesetzt, und es wird auf einen pH-Wert von 4,9 eingestellt. Nach zweistündigem Stehenlassen bei 20°C wird das Gemisch zentrifugiert. Die flüssige Phase wird zur Erzielung einer klaren Lösung filtriert. Diese Lösung wird auf pH = 7,0 eingestellt, und es wird PEG 3000 bis zu einer Konzentration von 12% zugesetzt. Dabei fällt reines Immunglobulin aus, das durch Zentrifugieren und Trocknen gewonnen wird. Die Produktionsausbeute beträgt 60%. Die mit DISC PAGE (mit 5% Polyacrylamid) bestimmte Reinheit zeigt im wesentlichen nur zwei Bänder, die jeweils IgG und IgM entsprechen. Die

Analyse wurde durch Auftragen von 500 µg Produkt durchgeführt.

Bei der Immunelektrophorese nach Grabar und Williams unter Verwendung von Kaninchenantikörpern gegen totales humanes Serumprotein sind im wesentlichen nur drei Bögen vorhanden, die jeweils IgG, IgM und IgA entsprechen.

Aus dem gereinigten Erzeugnis ist gewünschtenfalls durch dessen Lösen in 0,9% Salzwasser bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 5% ein intravenös injizierbares Präparat herstellbar, das sich durch eine sehr niedrige antikomplementäre Aktivität auszeichnet und daher zur intravenösen Verabreichung besonders gut geeignet ist.

Beispiel 2

Das Verfahren gemäss Beispiel 1, wobei jedoch statt des humanen Blutplasmas Schweineplasma verwendet wird.

Beispiel 3

Das Verfahren gemäss Beispiel 1, wobei jedoch statt des humanen Blutplasmas Blutserum verwendet wird.

Beispiel 4

100 Liter Plasma oder Serum werden mit 100 Liter einer Lösung von 600 g/Liter PEG 3000 gemischt. Der pH-Wert wird auf 6,5 eingestellt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in 100 Liter destilliertem Wasser mit einem Zusatz von 0,015M NaCl wieder gelöst. Es werden 40 g PEG 3000 per Liter und 5 g Caprylsäure per Liter zugesetzt. Der pH-Wert wird auf 5,0 eingestellt. 45 Minuten abstellen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Dem Zentrifugat werden weitere 40 g PEG 3000 per Liter zugesetzt. Der pH-Wert wird auf 7,5 eingestellt. Der Bodensatz wird abzentrifugiert und in destilliertem Wasser mit 0,002M NaCl wieder gelöst. Die Lösung wird klarfiltriert (beispielsweise mit dem Seitz® Ek-Filter). Die Proteinkonzentration muss 50–100 g/l entsprechen. Es werden 20 g DEAE-Sephades-A25® per 100 g Protein zugesetzt. Nach einstündigem Hinstellen unter Umrühren wird das DEAE-Sephadex abfiltriert. Die Behandlung mit DEAE-Sephadex wird wiederholt. Nach dem Sterilfiltrieren erhält man ein antikomplementärfreies Immunglobulin G Präparat zur intravenösen Verabreichung.