



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: G 01 N 33/50

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



PATENTSCHRIFT A5

11

632 091

<p>21) Gesuchsnummer: 8002/81</p> <p>62) Teilgesuch von: 4653/77</p> <p>22) Anmeldungsdatum: 14.04.1977</p> <p>30) Priorität(en): 17.04.1976 DE 2616984</p> <p>24) Patent erteilt: 15.09.1982</p> <p>45) Patentschrift veröffentlicht: 15.09.1982</p>	<p>73) Inhaber: Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn (DE)</p> <p>72) Erfinder: Dr. Hans Bohn, Marburg (DE)</p> <p>74) Vertreter: Brühwiler & Co., Zürich</p>
---	---

54) Verfahren zur Herstellung eines gegen das plazentaspezifische Glycoprotein gerichteten Antiserums.

57) Plazentaspezifisches Protein PP₅ wird zur Herstellung eines gegen das PP₅ gerichteten Antiserums verwendet. Dabei immunisiert man die Tiere mit PP₅ und gewinnt aus dem Blut der immunisierten Tiere das Antiserum.

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung eines gegen das plazentaspezifische Protein PP₅ gerichteten Antiserums, dadurch gekennzeichnet, dass man eine PP₅ enthaltende Proteinlösung bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 mit einem an einen unlöslichen Träger gebundenen Antikörper gegen das PP₅ in Berührung bringt, den Träger, der das PP₅ gebunden enthält, von der flüssigen Phase abtrennt, zur Ablösung des PP₅ mit einem wässrigen Medium vom pH-Wert 2 bis 4 oder mit einer Lösung eines Proteinbindungen dissoziierenden Stoffes bei einem pH-Wert von 4 bis 9 behandelt, mit dem erhaltenen PP₅ Tiere immunisiert und aus dem Blut der immunisierten Tiere das Antiserum gewinnt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines gegen das in der menschlichen Plazenta vorkommende, von H. Bohn 1972 im wässrigen Plazentenextrakt gefundene und als PP₅ bezeichnete Plazentaprotein gerichteten Antiserums.

Wie von H. Bohn in Archiv für Gynäkologie, Bd. 212, Seite 165 bis 175, 1972, beschrieben, kann mit Hilfe von Antiseren, die durch Immunisierung von Plazentenfraktionen gewonnen worden waren, im Extrakt von Plazenta eine Reihe löslicher Antigene immunologisch nachgewiesen werden. Für das mit PP₅ bezeichnete Protein konnte gezeigt werden, dass es offensichtlich plazentaspezifisch ist, denn die Nachweisversuche dieses Proteins mit immunologischen Standardtechniken in einer Reihe von embryonalen und adulten menschlichen Organen oder auch im Humanplasma sowie Erythrozytenlysaten führten zu keiner positiven Reaktion.

In der elektrophoretischen Wanderung in Agar zeigt sich PP₅ als β_1 -Globulin. In einem Polyacrylamidgel wandert es im Vergleich zu Albumin = 100 mit einer relativen Beweglichkeit von 75. Aufgrund seines Verhaltens bei der Gelfiltration auf quervernetztem Dextran wurde ein Molekulargewicht für PP₅ von etwa 50 000 abgeleitet. Das PP₅ ist selbst im Plazentenextrakt in relativ niedriger Konzentration vorhanden, so dass seine Reindarstellung trotz aufwendiger Verfahren der biochemisch präparativen Techniken bisher nicht möglich war, insbesondere weil diese Verfahren nicht hinreichend selektiv sind.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass PP₅ durch Immunadsorption soweit angereichert werden kann, dass in einer anschließenden Reinigung nach konventionellen Fraktionierungsmethoden oder auch in einem weiteren Immunadsorptionsverfahren, in welchem die restlichen Serumproteine und Plazentenproteine entfernt werden können, das reine PP₅ erhalten werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung eines gegen das plazentaspezifische Protein gerichteten Antiserums durch Anreicherung des Proteins PP₅ aus dessen Lösungen, vorzugsweise aus dem wässrigen Extrakt von Plazenten und Immunisieren von Tieren mit dem gewonnenen Protein.

Serologisch mit PP₅ verwandte Antikörper sind zur adsorptiven Gewinnung sowohl von PP₅ als auch von damit antigenverwandten Proteinen einsetzbar.

Die Anreicherung erfolgt durch in Berührung bringen einer PP₅ enthaltenden Proteinlösung, vorzugsweise den wässrigen Extrakt von Plazenten - im besonderen menschlichen Plazenten -, bei einem pH-Wert zwischen 4 und 9 mit einem an einen unlöslichen Träger gebundenen Antikörper gegen das PP₅ durch Abtrennung des Trägers, der das PP₅ gebunden enthält, von der flüssigen Phase und durch Behandlung zur Ablösung des PP₅ mit einem wässrigen Medium vom pH-Wert 2 bis 4 oder mit einer Lösung eines Proteinbindungen dissoziierenden

Stoffes bei einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise etwa pH 7.

Als Ausgangsmaterial dient bevorzugt die menschliche Plazenta, aus der man etwa 10 bis 20 mg PP₅ pro Plazenta durchschnittlicher Grösse (etwa 500 bis 600 g) extrahieren kann. Zur Herstellung des wässrigen Extraktes werden zerkleinerte Plazenten mit Wasser oder einer geeigneten Salzlösung behandelt und die flüssige Phase gewonnen.

Geeignete Salze für die Salzlösung sind möglichst inerte Salze, wie sie als Bestandteile von Lösungen für die Extraktion von Geweben bekannt sind. Verwendet werden dazu Neutralsalze und Puffersubstanzen, insbesondere Kochsalz oder Tris-hydroxymethylaminomethan, ferner Alkalisalze der Phosphor- oder Citronensäure. Zweckmässig liegen die Salzkonzentrationen bei 0,1 bis 5%.

Bei dem obigen Anreicherungsverfahren kann das PP₅ aus üblicherweise verwendeten Plazentenextrakten, in denen es in einer Konzentration von etwa 1 bis 2 mg pro 100 ml vorliegt bis zu einer Konzentration von etwa 100 bis 1000 mg/100 ml angereichert werden. Die spezifische Anreicherung liegt bei etwa 2500 bis 5000.

Der für die Anreicherung des PP₅ benötigte Antikörper, der in bekannter Weise an einen festen Träger gebunden werden kann, wird durch Immunisierung von Tieren mit PP₅ erhalten. Solange das Reinprotein nicht zur Verfügung steht, wird der für die Immunisierung von Wirbeltieren, insbesondere Kaninchen, mit einer durch Fällungsverfahren in Bezug auf PP₅ angereicherten Plazentenfraktion hergestellt: beispielsweise nach der von H. Bohn 1972 beschriebenen Methode.

Bei der Immunisierung mit derartigen Rohfraktionen werden Antiseren mit multispezifischen Antikörpern erhalten. Die nicht spezifisch gegen PP₅ gerichteten Antikörper werden mit geeigneten Antigenen aus Blutserum und Plazentenfraktionen behandelt, wonach mit Hilfe der resultierenden Antigen-Antikörperreaktion die unspezifischen Antikörper entfernt werden können.

Die Gewinnung der Immunglobulinfraktion, in der sich PP₅-Antikörper befinden, erfolgt in bekannter Weise. Das danach erhaltene Anti-PP₅ wird entsprechend bekannten Verfahren an geeignete Träger gebunden. Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Ann. Rev. Biochem. 40, 1971, Seite 259, Naturwissenschaften 58 (1971), Seite 389 oder Nature 314 (1967), Seite 1302. Besonders geeignete Träger sind hochpolymere Kohlenhydrate, wie Cellulose oder Agar, synthetische Harze, wie Polyacrylamid oder Co-Polymere aus Äthylen/Maleinsäure-Anhydrid; auch Glaspartikel können als Träger verwendet werden.

Besonders bevorzugt als Trägermaterial ist eine gereinigte Agarose in Form von kleinen Kügelchen mit einem Durchmesser von 20-200 μ m an die nach der oben zuletzt genannten Methode die Antikörper gegen PP₅ kovalent gebunden werden können.

Für die Isolierung des PP₅ aus Lösungen, im besonderen aus Plazentaextrakten, die ausserdem andere Proteine und Kohlenhydrate enthalten, wird die PP₅-Lösung mit dem den Antikörper tragenden Adsorbens in Berührung gebracht, wobei der pH-Wert auf >4 eingestellt wird. Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wird der pH-Wert nicht höher als 9 eingestellt. Die Salzkonzentration der Lösung ist nicht kritisch. Jedoch sollten Bedingungen vermieden werden, die geeignet sind, die Bindung von Antigenen an Antikörper zu lösen. Vorteilhaft enthält die wässrige Lösung neutrale Salze und/oder Puffersubstanzen, wie sie allgemein in biochemischen Reaktionen verwendet werden, insbesondere Natriumchlorid, Phosphatpuffer, Tris-Hydroxymethylaminomethan oder andere bekannte Puffersubstanzen, wie sie beispielsweise in Handbook of Biochemistry, published by the Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, USA, 2nd Edition S.J238, beschrieben sind. Die

Konzentration dieser Substanzen liegt zweckmässig im Bereich zwischen 0,01 und 2 Mol/l. Das Verhältnis Proteinlösung: Adsorbens ist zweckmässig im Bereich 1:1 bis 10:1, vorzugsweise 2:1. Das Adsorbens sollte mit der Proteinlösung 0,1 bis 5 Stunden in Berührung bleiben, damit genügend Zeit zur Verfügung steht, die Antigen-Antikörper-Bindung zu knüpfen.

Die Adsorption und die Elution des PP₅ kann sowohl im sogenannten Batch-Verfahren als auch in einer Chromatographie-Säule durchgeführt werden. Hierzu wird das Adsorbens von der Lösung abgetrennt, im Batch-Verfahren durch Zentrifugierung oder Filtration mehrfach mit einer neutralen Salzlösung gewaschen, um überschüssige Salze und unspezifisch adsorbierte Verunreinigungen zu eliminieren. In dem Säulenverfahren wird die Lösung durch gründliches Spülen mit Pufferlösung aus der Säule entfernt.

Die Elution des PP₅ vom Antikörper-haltigen Träger kann auf bekannte Weise durch Massnahmen erfolgen, die die Auflösung von Antigen-Antikörper-Bindungen bewirken. So erfolgt die Elution durch Behandlung des Trägers mit einem wässrigen Medium vom pH-Wert zwischen 2 und 4. Die entsprechende Lösung sollte im allgemeinen Salze und geeignete Puffersubstanzen in geeigneter Konzentration, vorzugsweise 0,2 bis 8 Mol/l enthalten.

Im Batch-Verfahren empfiehlt es sich, die Dispersion des Adsorbens in dieser Lösung 0,1–2 Stunden lang zu belassen, wobei das PP₅ vom Immunadsorbens desorbiert wird. Im Säulenverfahren lässt man die Elutionslösung durch die Säule hindurchfliessen. Nach Abtrennung des Adsorbens wird der pH-Wert der das PP₅ enthaltenden Lösung im allgemeinen auf etwa neutral (pH 6 bis 8) gestellt. Die angereicherte PP₅-Lösung kann gewünschtenfalls einer weiteren Reinigung unterworfen werden.

Die Elution des PP₅ vom Antikörper-haltigen Träger erfolgt auch mit Hilfe von Proteinbindungen dissoziierenden Stoffen, beispielsweise Harnstoff- oder Guanidinlösungen oder Lösungen von sogenannten chaotropen Salzen wie NaNO₃, NaBr, NaClO₄, CF₃COONa, NaSCN oder CCl₃COONa erfolgen. Die Konzentration dieser Salze im Elutionsmedium beträgt zweckmässig 2 bis 8 Mol/l. Zur Entfernung der chaotropen Salze aus der Lösung nach der Desorption des PP₅ und zur Abtrennung des Adsorbens kann die Lösung gegen eine Neutralsalzlösung oder Pufferlösung der Konzentration 0,1 bis 1 Mol/l dialysiert werden.

Das nach dieser Anreicherung erhaltene PP₅ besitzt einen Reinheitsgrad von 50 bis 80%. Durch weitere Reinigungsverfahren kann es auf über 99% angereichert werden.

Falls eine Weiterreinigung des durch Immunadsorption angereicherten PP₅ gewünscht wird, kann diese mit gängigen Fraktionierungsverfahren vorgenommen werden. Bevorzugt werden dabei Fraktionierungsverfahren mit Hilfe eines Molekularsiebs mit dem Ziel, die PP₅-Anteile in den Fraktionierungsbereichen von Molekülen mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000 anzureichern. Ein weiteres gängiges anwendbares Verfahren ist die Ionenaustausch-Chromatographie. Dabei werden die Ladungseigenschaften des PP₅ verwertet, das sich bekanntlich wie ein β_1 -Globulin verhält. Eine weitere Möglichkeit zur Reindarstellung des PP₅ ist in Immunadsorptionsverfahren gegeben, bei denen nicht die Antikörper gegen PP₅ sondern gegen die zu entfernenden Verunreinigungen als trägergebundene Adsorbentien Verwendung finden. Das PP₅ befindet sich nach Anwendung dieses Verfahrens in den nicht gebundenen Anteilen.

Der Fortschritt der Reinigungsverfahren ist in jedem Falle am einfachsten mit Hilfe entsprechender Antiseren überprüfbar. Bei den jeweiligen Fraktionierungsverfahren werden diejenigen Fraktionen gewonnen, die mit dem spezifisch gegen PP₅ reagierenden Antiseren eine immunologische Reaktion, insbesondere eine Immunpräzipitation, zeigen.

Das derart angereicherte Protein PP₅ ist besonders geeignet, spezifisch dagegen gerichtete Antiseren herzustellen. Es wird deshalb zur Herstellung eines Anti-PP₅-Serums verwendet. Dabei werden Tiere nach bekannten Methoden mit PP₅ immunisiert und aus dem Blut der Tiere das Antiserum gewonnen. Mit Hilfe dieser neuen Antiseren lässt sich PP₅ durch immunologische Methoden, wie beispielsweise dem Hämagglutinationshemmungstest, der Komplimentbindungsreaktion, dem Radioimmunoassay, der Latexagglutination und ähnlichen empfindlichen Methoden, in Körperflüssigkeiten nachweisen.

So lässt sich zeigen, dass PP₅ während der Schwangerschaft in geringen Konzentrationen im Blut der Schwangeren erscheint. Ferner ist PP₅ in der Tumordiagnostik von Bedeutung. Es kann im Blut und Tumorgewebe von Kranken mit trophoblastischen Tumoren nachgewiesen werden. In der Regel bestehen die entsprechenden diagnostischen Mittel im wesentlichen aus Anti-PP₅ und bei bestimmten Verfahren, beispielsweise in radioimmunologischen Testsystemen, wird PP₅ selbst als Standardsubstanz mitgeführt. In diagnostischen Mitteln zum Nachweis von gegen PP₅ gerichteten Antikörpern ist PP₅ der wesentliche Bestandteil des Reagens.

Das nachfolgende Beispiel erläutert das Verfahren.

1. Herstellung des Immunadsorbens

150 ml eines Anti-PP₅-Serums vom Kaninchen werden gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,0) dialysiert und zur Abtrennung der Immunglobuline an DEAE-Zellulose chromatographiert. Die Immunglobulinfraktion (1,3 g Protein) wird dann mit 258 g besonders gereinigter Agarose in Kugelform (Sepharose[®] 4B der Pharmacia Uppsala, Schweden), die mit 16,1 g Bromcyan aktiviert worden war, umgesetzt und so kovalent an diesen Träger gebunden.

Das Verfahren ist beschrieben von Axen R., Porath J., Ern-bach S., Nature 214, 1302 (1967).

Mit Hilfe eines auf diese Weise hergestellten Immunadsorbens kann das Plazentaprotein PP₅ aus dessen Lösungen, insbesondere aus PP₅-angereicherten Plazentaextraktfraktionen isoliert werden.

2. Anreicherung des PP₅ aus Plazentaextrakt

2.1 Anreicherung der PP₅ Eiweissfraktion

150 kg tiefgefrorene Plazenten werden zerkleinert und mit 150 Liter einer 0,5%igen wässrigen Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Der Extrakt wird mit 2 normalen Natriumhydroxid auf pH 8 eingestellt und mit 50 Liter einer 3%igen wässrigen Lösung von Diaminoäthoxyacridinlactat (Rivanol[®]) versetzt. Nach einer Wartezeit von 1 Stunde wird der Überstand, der das PP₅ zusammen mit Gammaglobulin enthält, abgehebert, mit 5% festem Natriumchlorid (11 kg) zur Abscheidung des noch in Lösung verbliebenen Rivanols versetzt, filtriert und mit 26,5%, bezogen auf das Gewicht der Flüssigkeit, festem Ammonsulfat versetzt und gut durchgerührt. Nach 1 Stunde wird der Niederschlag abfiltriert.

500 g des auf dem Filter gesammelten Niederschlags werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und gegen eine 0,01 molare Tris-(oxymethyl)-aminomethan (im folgenden mit «Tris» abgekürzt)-Salzsäure-Pufferlösung vom pH-Wert 7,0, die 0,05% Natriumazid enthält, dialysiert. Die dialysierte Lösung wird zentrifugiert und der Überstand wird mit der gleichen Pufferlösung auf 2000 ml aufgefüllt, mit 0,1 normaler Natriumhydroxidlösung auf pH 8,0 eingestellt und mit 250 g feuchter DEAE-Cellulose eine Stunde verrührt.

Sodann wird die DEAE-Cellulose durch Filtrieren von der Lösung abgetrennt, zweimal mit je einem Liter 0,01 molarem Tris-Salzsäure-Puffer vom pH-Wert 8,0 gewaschen und danach dreimal mit je 500 ml 0,02 molarem Tris-Salzsäure-Puffer, pH 6,5, der 0,85% Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid enthält, eluiert.

Den vereinigten Eluaten wird 30% Ammonsulfat, bezogen auf das Flüssigkeitsgewicht, zugesetzt und das ganze verrührt. Der Niederschlag, der das PP₅ enthält, wird mit 100 ml destilliertem Wasser gelöst und gegen einen 0,1 molaren Tris-Salzsäure-Puffer pH 8,0, der 1,0 Mol NaCl pro Liter und 0,1% Natriumazid enthält, dialysiert. Man erhält 200 ml einer Lösung mit etwa 6% Eiweiss und etwa 30 mg PP₅. Aus dieser Fraktion kann PP₅ durch Immunadsorption isoliert werden.

Das unter 2.1 vorgestellte Anreicherungsverfahren ist nicht erfindungswesentlich. Die Immunadsorption kann auch mit Plazentenextrakt direkt durchgeführt werden.

2.2 Immunadsorption des PP₅

Das Immunadsorbens wird in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), der 1,0 Mol/l NaCl und 0,1% NaN₃ enthält (nachstehend Pufferlösung I) suspendiert, dann in eine Chromatographiesäule gefüllt (3×20cm) und mit Pufferlösung I nachgespült. Dann lässt man langsam 100 ml einer PP₅-haltigen Lösung durch die Säule wandern, wobei PP₅ immunadsorptiv gebunden wird. Man wäscht die Säule gründlich mit Puffer I nach und eluiert dann das adsorbierte Protein mit 0,5 M Glycin-HCl-Puffer (pH 2,5). Die PP₅-haltigen Eluate werden mit 1 n NaOH auf pH 7,0 eingestellt und im Ultrafilter auf etwa 10 ml eingeeengt. Ausbeute pro Adsorption ~2 mg PP₅.

Das Adsorbens in der Säule wird unmittelbar nach der Elution von PP₅ wieder mit Pufferlösung I neutralisiert und gründlich gewaschen; es kann erneut zu immunadsorptiven Bindung von PP₅ eingesetzt werden.

Das durch Immunadsorption gewonnene Protein ist häufig durch unspezifisch gebundene Serumproteine (hauptsächlich IgG und daneben etwas IgA) verunreinigt. Die Abtrennung dieser Begleitproteine gelingt, z. B. durch Gelfiltration, Molekularsiebfractionierung z. B. bevorzugt mit Hilfe von quervernetztem Dextran wie Sephadex[®]G - 100; die Serumproteine können aber auch durch Immunadsorption, d. h. mit Hilfe von trägergebundenen Antikörpern gegen Serumproteine, entfernt werden.

Das im Rahmen der Erfindung verwendete Anti-PP₅-Serum wurde wie folgt erhalten:

Es wurden Kaninchen mit dem gereinigten PP₅ unter Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans über einen Zeitraum von 6 Wochen immunisiert.

Das PP₅ wird in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (Konzentration 0,06 mg/3 ml) und unter Zusatz von Aluminiumhydroxid zu einer Suspension verrührt. Die Kaninchen erhalten an 5 aufeinander folgenden Tagen je 0,06 mg Protein in 3 ml Suspension/Tier i.v. injiziert.

Anschliessend lässt man die Tiere 9 Tage ruhen. Dann immunisiert man wieder an 5 aufeinander folgenden Tagen mit der oben angegebenen gleichen Menge Antigen, lässt die Tiere wieder 9 Tage ruhen und injiziert schliesslich nochmals an 5 aufeinander folgenden Tagen je 0,06 mg des Antigens. Nach einer erneuten Wartezeit von 7 bis 9 Tagen werden die Tiere entblutet. Nach dem Gerinnen des Blutes wird das Serum vom Blutkuchen abgeschleudert und gewonnen.