



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **321159**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/548 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19981530	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.10.03 PCT/DE96/01910
(22)	Inng.dag	1998.04.03	(85)	Videreføringsdag	1998.04.03
(24)	Løpedag	1996.10.03	(30)	Prioritet	1995.10.05, DE, 19538641
(41)	Alm.tilgj	1998.06.04			
(45)	Meddelt	2006.03.27			
(73)	Innehaver	Privates Institut Bioserv GmbH, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock, DE			
(72)	Oppfinner	Hans-Werner Heinrich, Riemserort, DE Wolfgang Ramlow, Bad Doberan, DE Hans-Friedrich Boeden, Berlin, DE Hans-Georg Neumann, Rostock, DE Udo Meyer, Hastorf, DE Joachim Teller, Güstrow, DE			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Pasientspesifikke immunoabsorpsjonsmidler, fremgangsmåte for fremstilling derav og anvendelser derav for utenomkroppslig aferese og for utvinning og bearbeidelse av patologisk viktige kroppsegne stoffer.			
(56)	Anførte publikasjoner	CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Bd. 53, 1983, OXFORD UK, s. 529-535, C. BRUNEAU et al. US 4 551 435 A1			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår fremstilling av pasientspesifikke immunoabsorbenter som kan anvendes for ekstrakorporal aferese i pasienter som lider av sykdommer forårsaket av disregulering av immunsystemet. Konvensjonelle metoder anvendes for å isolere immunkompleksene fra pasientens blod, og egnede metoder anvendes for å separere immunkompleksene i antigener og antistoffer. De således reaktiverte antigener og antistoffer kobles individuelt eller som en blanding kovalent til egnede bærere som anvendes som immunoabsorbenter for den pasient fra hvilken immunkompleksene stammer. Dette letter produksjonen av spesifikke immunoabsorbenter selv for pasienter som lider av sjeldne autoimmune sykdommer.

Foreliggende oppfinnelse gjelder immunoabsorpsjonsmidler absorpsjonsmidler basert på spesifikke antistoffer og/eller antigener, som som følge av immunopatologiske prosesser er ansvarlige for utløsning eller opprettholdelse av flere sykdommer. Dette gjør det mulig å inngripe målrettet i den immunopatologiske reguleringskrets som er ansvarlig for de kliniske følger uten at hele immunsystemet påvirkes, noe som f eks er tilfelle med den sedvanlige terapi ved medikamentell immunosuppresjon. Videre vedrører oppfinnelsen fremgangsmåte for fremstilling av immunoabsorpsjonsmidlene og anvendelser derav.

Videre muliggjør fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anriking og renfremstilling av de patologisk relevante kroppsegne stoffer og åpner ved dette nye muligheter for utforskning av årsaker og terapiutvikling.

Det funksjonelle grunnlag for immunreaksjonen er komplisert og beror på det godt regulerte samvirke mellom lokale og systemisk virksomme cellulære og humorale elementer i det uspesifikke immunforsvar og det spesifikke immunforsvarssystem, som består av aktiverte celler i det lymfopoetiske system og mediatorer og antistoffer som produseres av disse.

Avhengig av stimuleringens art kan de fremtredende immunforsvarsvirkninger være forskjellige.

Denne økning av forsvarstilstanden oppnås på vanlig vis i forløpet av en infeksjonsbegivenhet eller på kunstig vis, ved hjelp av medikamenter. Dette skjer både systemisk og lokalt over slimhinnene i respirasjonsskanalen, fordøyelseskanalen og urogenitalkanalen.

Normalt reagerer organismen straks på en infeksjon. Kvaliteten og kvantiteten av straksreaksjonen avhenger av antigenets natur og inntrengningssted. Prinsipielt like reaksjoner følger med tilførsel av vaksinasjonsmidler og andre kroppsfremmede substanser. Et spesifikt immunforsvar som kan måles for eksempel ved påvisning av spesifikke antistoffer, vil først være aktivt etter noen dager. Dersom den utløsende årsak er uskadeliggjort, nedreguleres produksjonen av spesifikke antistoffer og blir til slutt innstilt. Etter påfølgende biologisk nedbrytning av antistoffene viser kun forekomst av spesifikke "hukommelsesceller" hvilke antigener organismen tidligere har vært utsatt for. Under visse omstendigheter som

i detalj har en nærmest ubestemmelig årsakssammenheng, reagerer organismen på overdrevet måte på kroppsegne strukturer. Den således fremkalte autoimmunreaksjon fører til fortløpende ødeleggelse av kroppsegne vev hvis nedbrytningsprodukter
 5 ytterligere stimulerer immunsystemet. Dersom denne patologiske reguleringskrets ikke avbrytes, vil sluttresultatet, i det minste for det angrepne vev, være fatalt.

Sykdommer med patologisk herkomst eller deltakelse forekommer hyppig. Grunnet deres kroniske forløp og vanskelige
 10 behandlingsbarhet innskrenker de livskvaliteten til rammede mennesker i vesentlig grad og forårsaker enorme økonomiske tap. En av de hyppigst forekommende autoimmunsykdommer er reumatoid artritt som rammer tilnærmet 1 % av befolkningen. Sykdommen fremtrer hyppigst rundt en alder av 40 år. Etter 10
 15 år er ca 50 % av pasientene arbeidsuføre og 10-20 % er alvorlig handikappede. De til nå oppnådde behandlingserfaringer ved suppresjon og understøttende terapier er utilstrekkelige og ender hyppig med behandlingsavbrudd. Etter 3 år er maksimalt kun ca 50 % av pasientene som behandles med basisterapeutika,
 20 fortsatt under effektiv medisintilførsel.

Grunnet den hyppig utilstrekkelige effektivitet og alvorlige bivirkninger av den for tiden benyttede suppresjonsbehandling, letes det stadig etter nye fremgangsmåter for behandling av autoimmunsykdommer. (J. Sany: Early approaches
 25 to immunotherapy of rheumatoid arthritis. EUR-J-RHEUMATOL-INFLAM: 11 (1991), 139-147).

Disse behandlingsformer sikter mot å påvirke humorale og cellulære immunmekanismer så vel som mediatorsystemer. Det dreier seg her om eksperimentelle behandlingsforsøk som har
 30 gitt gode resultater i dyreforsøk, og ved klinisk utprøving. Et definitivt gjennombrudd i prognosen for pasienter med autoimmunsykdommer er imidlertid hittil ikke oppnådd.

Plasmautbyutting og plasmasorpsjon har med hell blitt benyttet i et stort antall autoimmunsykdommer og sykdommer med
 35 patologisk innslag (R.T. Baldwin, R. R. Pierce og O.H. Frazier: Guillain-Barre syndrome after heart transplantation. J-HEART-LUNGTRANSPLAN: 11 (1992), 817-819; J. Braun, J. Sieper, A. Schwarz, F. Keller, J. Heitz og H.V. Ameln: Severe lupus crisis with agranulocytosis and anuric renal failure due

to a mesangial lesion (WHO IIB)-Successful treatment with cyclophosphamide pulse followed by plasmapheresis (2). BR-J-RHEUMATOL: 30 (1991), 312-313; P. C. Dau: Plasmapheresis in acute multiple sclerosis: Rationale and results. J-CLIN-APHERESIS: 6 (1991), 200-204; H. H. Euler, J. O. Schroeder, R. A. Zeuner og E. Teske: A randomized trial of plasmapheresis and subsequent pulse cyclophosphamide in severe lupus: Design of the LPSG trial. INT-J-ARTIF-ORGANS: 14 (1991), 639-646; D. C. Hess, K. Sethi og E. Awad: Thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: Effective treatment with plasma exchange and immunosuppression. J-RHEUMATOL: 19 (1992), 1474-1478; R. Korinthenberg og M. Sauer: The Guillain-Barre syndrome in childhood. Clinical course and therapeutic measures. MONATSSCHR-KINDERHEILKD: 140 (1992), 792-798).

Gjennomførbarheten av å oppnå $F(ab')_2$ -fragmenter med antistoffaktivitet fra immunkomplekser i blodomløpet (CIC) og tilstedeværelsen av en sykdomsspesifikk antistoffspesifisitet i ankyloserende spondylitis-CIC er blitt beskrevet i litteraturen (Bruneau & Bonin, Clin. Exp. Immunol. (1983) **53**, 529-35), hvor det foreslås tilstedeværelse av et sykdomsspesifikt antigen, men typen til det involverte antigen gjenstod imidlertid fortsatt å bli belyst.

Plasmatutbytting er den eldste av disse behandlingsfremgangsmåter hvor det separerte plasma (membranplasmaferese eller sentrifugering) fjernes og samtidig erstattes med donorplasma eller humanalbumin. I løpet av en behandling byttes fra en enkelt opp til en dobbelt mengde plasma. Denne fremgangsmåten er ikke selektiv. For å fjerne én eller noen få patogenetisk viktige bestanddeler blir hele plasmaet utbyttet og substanser som er essensielle for pasienten, fjernet. For pasienten har dette tungtveiende konsekvenser som man forsøker å utveie med forskjellige former for substitusjonsterapi. I tillegg er det fare for overførsel av sykdomsvekkere som HIV eller hepatittvirus.

Ved plasmasorpsjon blir det allerede separerte plasma ført over et adsorpsjonsmateriale. Til adsorpsjonsmaterialet er det koblet stoffer som bindes til bestemte plasmabestanddeler og således fjerner disse fra pasientplasmaet. Dersom plasmasorpsjonen benyttes til fjerning av immunologisk viktige forbindelser, betegnes fremgangsmåten som adsorpsjon. Fremgangsmåten

besitter, avhengig av det anvendte adsorpsjonsmateriale, varierende selektivitet og spesifisitet. Dette gir begrenset effektivitet av behandlingen og fare for bivirkninger. Forskjellige ligander og bærerstoffer har blitt benyttet klinisk for adsorpsjon av globuliner og komplekser fra separert plasma:

Tabell 1:

Eksempler på ligander med klinisk anvendelse i fremgangsmåter i utenomkroppslig aferese

- stafylokokk-protein A
- 10 - hydrofobe aminosyrer (tryptofan eller fenylalanin)
- dekstransulfat
- aggregert IgG
- anti-human-IgG
- blodgruppe-antigener
- 15 Den påfølgende tabell gir en oversikt over autoimmun-sykdommer som med hell har blitt behandlet ved utenomkroppslig adsorpsjon.

Tabell 2:

Autoimmunsykdommer med vellykket aferese/adsorpsjonsbehandling

- 20 - subakutt glomerulonefritt, fokal glomerulosklerose
- systemisk Lupus erythematoses
- anti-fosfolipidsyndrom
- vaskulitter; f eks Periarteriitis nodosa, M. Wegener
- reumatoid artritt
- 25 - immunologisk trombocytopenisk purpura
- hemmere av koagulasjonsfaktorer
- hyperimmuniserte hhv. ABO-inkompatible mulige transplantatmottagere
- polymyositt
- 30 - neurologiske sykdommer, f eks Guillain-Barre-syndrom, polyneuropati, amyotrof lateralsklerose, Myasthenia gravis, multippel sklerose

Ulemper ved medikamentell behandling av autoimmunsykdommer

- 35 Medikamentell suppresjon er ikke-selektiv og uspesifikk. Også nyere immunologiske behandlingsformer (monoklonale eller polyklonale antistoffer mot aktiveringsmarkører eller reseptorstrukturer på immunceller og mediatorer) undertrykker immunforsvaret ikke-selektivt og/eller induserer selv

immunfenomener i organismen.

Ulemper ved dagens aferese/adsorpsjonsfremgangsmåter ved behandling av autoimmunsykdommer

5 Ulempen ved alle hittil kjente aferese/adsorpsjonssystemer ligger, på samme måte som for medikamentell suppresjon, i deres utilstrekkelige selektivitet. Dette gjelder for den allerede anvendte fremgangsmåte til Balint og Hargreavens (US patentskrift nr 4.681.870) som immobiliserte protein A fra *Staphylococcus*
10 *aureus* til et egnet bærerstoff. Med denne fremgangsmåte fjernes IgG og IgG-komplekser uspesifikt fra pasientens blod. Dette skjer også ved fremgangsmåten beskrevet av Davis (PCT-søknad WO 86/07152), som benytter uspesifikke proteiner koblet til bærer-
15 stoffer, fortrinnsvis globuliner av forskjellige grupper, som adsorbenter fra komplekser. Ved denne fremgangsmåte fjernes riktig nok immunkomplekser fra blodet, men ikke de reaktive enkeltbestanddeler som stadig nydannes ved autoimmunsykdommer.

Liberti og Pollora (US patentskrift nr. 4.551.435) beskriver en fremgangsmåte for fjerning av stoffer og immunkom-
20 plekser fra blodet, hvor pasientens blod tilsettes spesifikke antistoffer ved en bestemt konsentrasjon som så danner immunkomplekser med forbindelsen som skal fjernes. Disse fjernes fra blodet med faktorer som Clq, reumafaktorer, Fc-reseptorer og Fc-reseptorbærende celler som er immobilisert til et fast bærer-
25 stoff. Denne fremgangsmåte forutsetter at den utløsende årsak er kjent, noe som ikke er tilfelle for de fleste autoimmunsykdommer, og at det forårsakende antigen foreligger i ren tilstand for fremstilling av antistoffer. Selv fjerningen av immunkompleksene foregår uspesifikt, ikke ved hjelp av protein A, men ved biomole-
30 kyler som under fysiologiske betingelser har høy affinitet overfor globuliner.

Det må tas i betraktning at de patofysiologisk relevante immunstrukturer er forskjellige ved de forskjellige autoimmun-
sykdommer, likeså immunfenomenene ved én og samme sykdom. An-
35 vendelse av de i dag foreliggende aferesesystemer fører ikke bare til eliminering av de patologisk viktige globuliner, men også de som er fysiologisk viktige og essensielle for kroppens forsvær. Resultatet er en generell svekkelse av immunsystemet med fare for septiske komplikasjoner.

Foreliggende oppfinnelse har som mål å tilveiebringe en behandlingsform for pasienter som lider av sykdommer som skyldes feilregulering av immunsystemet eller som via patologiske prosesser utvikler seg til kroniske tilstander som er
5 vanskelige å behandle. Til grunn for dette ligger oppgaven å utvikle et adsorpsjonsmiddel som er spesifikt for hver enkelt pasient, og med hvis hjelp de patogenetisk viktige immunkomplekser, autoantistoffer og antigener, kan fjernes fra pasientens blod eller plasma ved adsorpsjon.

10 Denne oppgave løses ifølge kravene 1 og 7, mens underkravene er foretrukne varianter.

For å oppnå dette fjernes immunkompleksene fra pasientens plasma ved hjelp av kjente fremgangsmåter, for eksempel ved hjelp av protein A-adsorpsjonsmidler og oppdeles i sine
15 biologisk aktive bestanddeler etter påfølgende eluering. Etter dette kan bestanddelene kobles til et passende bærer materiale ved kjente fremgangsmåter, for eksempel ved gelkromatografi, samlet eller hver for seg, f.eks. som en blanding av antistoffer og antigener. Ved hjelp av dette adsorpsjonsmiddel kan
20 immunkompleksene, antistoffer og antigener som er av betydning for sykdommer, spesifikt fjernes fra pasientens plasma ved hjelp av plasmaferese. Disse kolonner er reaktiverbare og beregnet for flere gangers bruk. Fremstilling av slike pasient-spesifikke adsorpsjonsmidler er generelt mulig for hver sykdom
25 hvor autokomplekser spiller en patogenetisk rolle.

Løsningen av disse oppgavene følger av patentkravene.

Det pasientspesifikke adsorpsjonsmiddel består ifølge oppfinnelsen av atskilte antigener og/eller antistoffer fra immunkomplekser mellom patologisk relevante immuneffektorer
30 fra pasienter, bundet til et aktivert, fast bærerstoff. Det inneholder atskilte antigener og/eller antistoffer fra pasienter som lider av en sykdom som er oppstått eller opprettholdt ved feilregulering.

Autoimmunsykdommer eller patologiske immuntilstander
35 er blant annet reumatoid artritt, subakutt glomerulonefritt, systemisk lupus erythematosus, antifosfoidsyndrom, vaskulitter, vevsinkompatible transplantatmottakere, polymyositt, neurologiske autoimmunsykdommer eller patologiske feilreguleringer som følge av infeksjonssykdommer. Egnede bærerstoffer

er alle biokompatible stoffer som kan binde tilstrekkelig mange immunkompleksbestanddeler kovalent til sin overflate, anvendelse av "sepharose" og cellulose i kuleform foretrekkes.

Fremgangsmåten for fremstilling av de pasientspesi-
5 fikke adsorpsjonsmidler kjennetegnes ved følgende trinn:

Immunkomplekser fjernes først fra pasientens plasma ved kjente ikke-selektive fremgangsmåter, f eks ved hjelp av protein A-adsorpsjonsmidler, og spaltes etter påfølgende elue-
ring i sine biologisk aktive bestanddeler. Etter dette kan
10 bestanddelene ved hjelp av kjente fremgangsmåter, f eks gel-
kromatografi, atskilt eller enkeltvis f eks som en blanding av
antistoffer og antigen, kobles til et passende bærerstoff. Det
foretrekkes å spalte immunkompleksene til sine enkeltbestand-
deler i surt hhv alkalisk miljø, fortrinnsvis i pH-området fra
15 2-5, hhv 10-12, som deretter, enten etter fraksjonering eller
etter tilsetning av salter som NaCl, MgCl₂, LiCl eller urea
eller guanidinhydroklorid, er i stand til å holde kompleksbe-
standdelene i dissosiert tilstand ved en bestemt konsentra-
sjon. Bestanddelene kobles så til det faste bærerstoff i et
20 pH-område mellom 2-12 ved hjelp av i seg selv kjente frem-
gangsmåter.

Ved hjelp av dette adsorpsjonsmiddel kan pasientens
"egne" immunkomplekser, antistoffer og antigener av betydning
for sykdommen, fjernes fra pasientens plasma ved hjelp av
25 utenomkroppslig adsorpsjon. Disse kolonner er reaktiverbare og
beregnet for flere gangers bruk. Fremstilling av slike
pasientspesifikke adsorpsjonsmidler er generelt mulig for en-
hver sykdom hvor autoimmunkomplekser spiller en patogenetisk
rolle.

30 Fremgangsmåten muliggjør i tillegg til den terapeutiske
anvendelse isolering av stoffer som i det minste er med-
ansvarlige for utløsning av den immunologiske feilregulering av
pasientens blod. Dette forenkler undersøkelser av patogenesen
til autoimmunsykdommer hhv sykdommer som forsterkes i sitt
35 forløp ved immunologiske feilreaksjoner. Fordelen framfor sed-
vanlige løsninger er:

1. Det er ikke bare immunkompleksene som fjernes, men
også de hittil ikke omfattede enkelte reaksjonspartnere.

2. Substitusjon med fremmedglobuliner er ikke lenger nødvendig (sykdomsoverføring som HIV utelukkes, tilleggs-kostnader unngås).

5 3. Uten kjennskap til sykdomsårsakene kan prisgunstige, pasientspesifikke adsorpsjonsmidler fremstilles. Med disse kan det klargjøres spesifikke behandlingsverktøy, også for slike autoimmunsykdommer hvor industrien av prisgrunner ikke har utviklet målrettede behandlingsformer grunnet lav sykdomshyp-
10 pighet.

4. Antigener og/eller antistoffer som er ansvarlige for utløsning hhv opprettholdelse av autoimmunsykdommen hos de enkelte pasienter, kan spesifikt anrikes og isoleres, og så-
15 ledes stilles til disposisjon for videre undersøkelser.

I det påfølgende beskrives oppfinnelsen nærmere.

Pasienter som lider av en autoimmunsykdom som f eks reumatoid artritt, lupus erythematosus eller multippel skle-rose, gjennomgår en utenomkroppslig aferese ved anvendelse av
20 stafylokokk-protein A-adsorpsjonsmidler. Etter avsluttet aferesesyklus vaskes kolonnen grundig med en buffer som er tilsatt detergenter, eller de adsorptivt bundne plasmabe-standdeler fjernes fra kolonnen ved å øke ionekonsentrasjonen (f eks 1-3 mol/l NaCl). Fravær av adsorptive plasmabestand-
25 deler bekreftes ved elektroforese eller immunanalyse av vaskebuffere. Deretter følger eluering av globulinet, immunkomplekset og de dissosierte immunologiske reaksjonspartnere ved hjelp av pH-gradient (f eks sitrat- eller acetatbuffer pH 7-2) eller konsentrerte saltløsninger med forskjellige pH-verdier
30 (mellom 4 og 7). Ved hjelp av elektroforese, kromatografi eller andre egnede separasjonsfremgangsmåter undersøkes de eluerte fraksjoner med hensyn til proteinspektrum og dissosiasjonsgrad av immunkompleksene.

For immobilisering til et fast bærerstoff anvendes
35 fraksjoner i hvilke immunkompleksene er spaltet i sine reaktive bestanddeler. Disse kan etter behov separeres ved egnede separasjonsfremgangsmåter før kobling. Immunkompleksbestanddelene kobles enkeltvis eller i blanding ved hjelp av kjente fremgangsmåter til ONB-karbonat- eller N-hydroksy-suc-

cinimidetylesteraktiverte bærerstoffer. Etter fjerning av alle ubundne bestanddeler står et pasientspesifikt og regenererbart adsorpsjonsmiddel til disposisjon, med hvis hjelp kun de stoffer som er ansvarlige for den patologiske orale feilregulering, selektivt kan fjernes fra pasientens blod.

I det påfølgende belyses oppfinnelsen nærmere ved eksempler.

Eksempel 1

10 Modellundersøkelser for bestemmelse av den biologiske aktivitet av immobilisert humant IgG ved binding av anti-humant IgG (geit) - tabell 3.

Kobling av humant IgG til sedvanlige bærerstoffer ("Sephrose 6FF" og cellulose i kuleform) skjedde under elueringsbetingelser. Cl-CO-ONB-aktivert gel med ca 30 μ mol ONB-karbonatgrupper per ml ble benyttet for kobling av det humane IgG.

1 ml antiserum (5,3 mg anti-humant IgG) ble fortynnet med 1 ml PBS og applisert på bærerstoffet (gjennomstrømningshastighet 0,1 ml/min). Kolonnene ble vasket med flere kolonnevolumer PBS og 3 M NaCl pH 5,0. Deretter fulgte eluering med 0,1 M glysin-HCl, 0,05 % "Tween 20", pH 2,0 (gjennomstrømningshastighet 1,0 ml/min, 2-6 °C). Bestemmelsen av protein-konsentrasjoner ble utført spektrofotometrisk ved en bølglengde på 280 nm etter nøytralisering av eluatet med 0,5 M K_2HPO_4 . Den relative antistoffbindingskapasitet per ml gel er basert på kobling av humant IgG under standardbetingelser (0,5 M fosfatbuffer, 0,05 % "Tween 20", pH 7,2).

Tabell 3: Bestemmelse av biologisk aktivitet av immobilisert humant IgG (koblet under elueringsbetingelser) ved hjelp av bindings-elueringsforsøk med anti-humant IgG-antistoff (geit) ved affinitetskromatografi

5

10

15

20

25

30

ONB-aktivitet	Koblings-betingelser	Mengde koblet humant IgG mg/ml gel	Anti-human IgG-bind.evne mg antistoff/ml gel	Bind.effektivitet av immobil. IgG µg antistoff IgG	Relativ bærer-aktivitet (%)
Cellulose i kuleform	0,5 M fosfat pH 7,2	2,3	4,1	1800	100
Cellulose i kuleform	0,5 M fosfat pH 7,2	6,2	4,1	660	100
Cellulose i kuleform	0,1 M sitrat pH 3,0	6,2	2,2	360	54
Cellulose i kuleform	0,1 M sitrat pH 3,0	3,8	4,3	1100	105
Cellulose i kuleform	4,5 M MgCl ₂ pH 6,0	1,4	2,5	1790	61
Sepharose 6FF	0,5 M fosfat pH 7,2	3,5	3,2	910	78
Sepharose 6FF	0,1 M sitrat pH 3,0	1,2	2,5	2080	61
Sepharose 6FF a)	0,1 M sitrat pH 3,0	5,0	3,3 b)	660	80
Sepharose 6FF a)	0,1 M sitrat pH 3,0	5,0	3,8 c)	760	93
Sepharose 6FF	0,1 M fosfat pH 12,0	2,8	3,2	1140	78
Sepharose 6FF	4M guanidin* HCl	2,0	3,7	1850	90

35

a) Aktivert med Cl-CO-ONB i nærvær av tertiære aminer (basekatalysert), aktiveringsgrad: 20 µmol ONB-karbonatgrupper/ml gel, koblingseffektivitet: 57 %

b) 53 mg affinitetskromatografisk rensset antistoff i 9,2 ml nøytralisert elueringsbuffer, gjennomstrømningshastighet 0,1 ml/min, vaskebuffer: PBS, 3 M NaCl (pH 5,0), eluering ved en gjennomstrømningshastighet på 1 ml/min, 63 % av det påsatte antistoff ble eluert.

c) 5,3 mg affinitetskromatografisk rensset antistoff i 9,2 ml nøytralisert elueringsbuffer, gjennomstrømningshastighet 0,1 ml/min, vaskebuffer: PBS, 3 M NaCl (pH 5,0), eluering ved en gjennomstrømningshastighet på 0,5 ml/min, 70 % av det påsatte antistoff ble eluert.

Eksempel 2

Modellundersøkelser for bestemmelse av bindingskapasiteten til humant IgG (antigen), immobilisert ved hjelp av baseaktivert ONB-karbonat-"Sephacrose 6FF" ved pH 3,0, ved hjelp av affinitetskromatografi ved anvendelse av anti-humant IgG (antistoff) i overskudd - tabell 4.

For koblingen ble humant IgG (Sigma) løst i koblingsbuffer og filtrert (0,2 µm). Denne løsning ble tilsatt løsemiddelfuktet aktivert sepharose. Koblingen foregikk ved romtemperatur (1 time) under forsiktig omrøring. Etter blokkering (1 M etanolamin i 0,1 M borat, pH 8,0) i 1 time ble gelen grundig vasket for eksempel på et filter med 10 gangers søylevolum av hver løsning i rekkefølgen: koblingsbuffer - vann - 0,01 N HCl - vann - 24 timer 0,1 M boratbuffer pH 8,3 - vann.

Affinitetskromatografien foregikk ved 2-6 °C med ECONO-systemet (Bio-Rad) ved anvendelse av kolonnen "Omnifit" 5,0 x 0,3 cm indre diameter (350 µl gel). Gjennomstrømningshastigheter mellom 0,25 og 1,0 ml/min ble benyttet. Elueringen ble fulgt ved hjelp av et UV-gjennomstrømningsfotometer (280 nm). Etter binding av antistoff og vask med PBS ble antistoffet eluert ifølge følgende program:

1. 30 min PBS
 2. 60 min 3 M NaCl pH 5
 3. 30 min PBS
 4. 60 min 0,1 M glysin*HCl pH 2,0
 5. 30 min PBS
- Gjennomstrømningshastighet 0,25 ml/min

Tabell 4: Bestemmelse av bindingskapasiteten til humant IgG [antigen(Ag)], immobilisert ved hjelp av baseaktivert ONB-karbonat-"Sephrose 6FF" ved pH 3,0, ved hjelp av affinitetskromatografi ved anvendelse av anti-humant IgG [antistoff(Ab)] i overskudd

Forsøk nr	Immobil. Ag ng/ml gel	Ab på- satt mg/- kjøring	Ab- kons. µg/ml	Ab-bindinget.		Strømm. hastig- het	PBS- vask Gel-vol	Mengde eluert Ab mg/ml gel	Bind.kapasitet % ^{b)} 2Ab/Ag
				Forh. Ab:Ag	Gjen- nom- føring				
1	5,0	6,2	1030	2,5	BA	3t RT	20	10,4	104
2	5,0	-	-	2,5	BAE	Batch	400 ^{a)}	7,1	71
3	5,0	-	-	2,6	BAE	Batch	320 ^{a)}	7,5	75
4	5,0	3,1	210	4,2	BAL	0,02	22	13,7	37
5	5,0	4,1	1050	2,3	ML	0,1	22	7,1	71
6	5,0	4,1	210	2,3	ML	0,1	86	7,7	77
7	5,0	5,7	300	3,3	ML	0,02	22	11,4	114
8	5,0	5,6	925	3,2	MC	0,5	200 ^{a)}	9,7	97
9	5,0	7,2	210	4,1	MC	0,5	300 ^{a)}	9,7	97
10	5,0	4,2	525 ^{c)}	2,4	MCAC	0,5	400 ^{a)}	9,7	97

RT: romtemperatur

25 BA: batchutførelse

BAE: eluering av Ab bundet batchutførelse (forsøk 1) etter PBS-vask i kolonnen

BAL: ytterligere tilsetning av antistoff til antistoff bundet i batchutførelse, vask og eluering over kolonnen

30 ML: mikroaffinitetskromatografi med usedvanlig påsetning av rensed antistoff

MC: mikroaffinitetskromatografi med påsetning av søylen ved sirkulering av det rensede antistoff

35 MCAC: mikroaffinitetskromatografi med antiserum fortynnet i PBS ved sirkulasjon

a) For å fjerne antistoff tilført i overskudd og/eller adsorptivt bundne proteiner ble det vasket med PBS. Vasken ble

avsluttet etter flere timer (f eks 16 timer) før elueringsprogrammet ble startet.

- b) Mengden anti-humant IgG (Ab) ble bestemt spektrofotometrisk ved λ_{280} ($E^{0,1\%} = 1,38$) etter nøytralisering etter nøytralisering med 0,5 M K_2HPO_4 . En bindingskapasitet på 100 % antas når hvert immobiliserte IgG-molekyl binder 2 molekyler anti-IgG.
- c) Antiserum, 1:8 fortynnet i PBS

10 Eksempel 3

- a) Eluering av anti-HSA-antistoffer (kanin) fra anti-stoff-antigenkomplekser med HSA ved anvendelse av HSA-belagte mikrotiterplater for å fastsette alle elueringsbetingelser for affinitetskromatografien (tabell 5).
- 15 96-brønners mikrotiterplater ble belagt med HSA. Hver brønn ble inkubert med 0,1 μ g anti-HSA. Som deteksjonssystem (ELISA) ble anti-kanin-IgG konjugert med alkalisk fosfatase (substrat: 4-nitrofenylfosfat, λ_{405} nm) benyttet. 200 μ l av den benyttede elueringsbuffer ble utpipettert i brønnene. Elue-
- 20 ringen foregikk ved romtemperatur i løpet av 1 time under stadig bevegelse av mikrotiterplaten. Etter grundig vask av brønnene fulgte deteksjon av anti-HSA. For evalueringen ble middelverdien fra målinger av hver av 8 brønner beregnet (%CV=4,4). Prosent eluert anti-HSA-antistoff med PBS ble fast-
- 25 slått til 0 %.

Tabell 5:

Elueringsbuffer for oppløsning av Ab-Ag-komplekser
Eluert anti-HSA-Ab (%)

30	PBS, pH 7,3	0
	PBS + 1 % SDS, pH 7,3	51
	0,10 M sitrat, pH 2,5 ⁿ	100
	0,10 M sitrat, pH 3,0 ⁿ	73
35	0,10 M sitrat, pH 3,5 ⁿ	27
	0,10 M sitrat, pH 4,0 ⁿ	8
	0,05 M sitrat, pH 2,5 ⁿ	100
	0,10 M sitrat/fosfat, pH 7,3	0
	0,10 M sitrat/fosfat, pH 6,0	0

	0,10 M sitrat/fosfat, pH 5,0	0
	0,10 M sitrat/fosfat, pH 4,0	2
	3,00 M KSCN, pH 7,3	41
	3,00 M NaCl, pH 5,0 ^a	0
5	3,00 M guanidin*HCl, pH 7,3	66
	4,00 M guanidin*HCl, pH 7,3	90
	6,00 M urea, pH 7,3	7
	0,10 M borat, pH 11,0	35
	0,10 M fosfat, pH 11,5	49
10	0,10 M fosfat, pH 12	91
	^a med 0,05 % "Tween 20"	

b) Immobilisering av anti-HSA-HSA til basekatalysert, aktivert ONB-karbonat-"Sephacrose 6FF" i koblingsmedier som benyttes som elueringsmiddel for affinitetskromatografi (tabell 6).

Koblingsmedier ble tilsatt proteinene som skulle kobles, ble filtrert (0,45 µm) og tilsatt fuktig, aktivert ONB-karbonat-"Sephacrose 6FF". Koblingen foregikk i en time ved romtemperatur under forsiktig omrøring. Deretter ble det blokkert i en time ved romtemperatur med etanolamin i boratbuffer (pH 8,1). ONB-karbonatgruppene ble bestemt spektrofotometrisk (λ_{maks} : tilnærmet 267 nm).

0,5 M fosfatbuffer, pH 7,3, ble benyttet for bestemmelse av en referanseverdi for maksimal immobilisering.

Vask ble utført som i eksempel 2.

Anti-HSA-antistoffene ble utvunnet i et forforsøk ved hjelp av affinitetskromatografi (0,05 - 0,1 M sitrat, pH 2,0), nøytralisert med 0,5 M K_2HPO_4 , oppbevart ved -20 °C, og forberedt kobling ved justering av pH 3,0 hhv 4,0 med fortynnet HCl etter opptining.

For kobling av Ag-Ab-blandingen ble HSA løst i PBS, justert med fortynnet HCl til den tilsvarende pH-verdi og tilsatt antistoffløsningen.

Proteinbestemmelsene i koblingsbuffer ble utført spektrofotometrisk ved OD 280 nm (antistoff $E^{0.1\%} = 1,38$ og HSA $E^{0.2\%} = 0,67$). De immobiliserte proteiner ble bestemt ved Lowry-metoden etter behandling av gelen med 1 N NaOH i overskudd.

Koblingsresultatet (%) er den relative mengde immobilisert protein i forhold til den tilsatte proteinmengde.

Tabell 6: Immobilisering av anti-HSA-HSA til basekatalysert, aktivert ONB-karbonat-"Sephacrose 6FF" i koblingsmedier som benyttes som elueringsmedier for affinitetskromatografi

	$\mu\text{mol ONB-karbonatgr. pr ml gel}$	Koblings-medium	pH	Tilsatt mg/ml gel	Protein-mengde mg/ml løsning	Immobil. protein mg/ml gel	Koblings-resultat %
10	19,8	0,5 M fosfat	7,3	1,6 A	0,3	1,1	70
	31,6	0,5 M fosfat	7,3	3,9 HSA	3,9	1,7	43
15	5,1	0,1 M fosfat	7,3	1,6 A	0,3	0,6	34
	22,3	Eluerings-buffer	3,0	3,2 A	0,6	2,3	70
	20,3	Eluerings-buffer	3,0	5,0 D	1,6	3,4	67
20	10,8	Eluerings-buffer	3,0	3,8 B	0,5	2,3	60
	19,8	Eluerings-buffer	4,0	3,8 B	0,7	1,2	32
	22,3	Eluerings-buffer	3,0	5,7 C	0,9	2,9	50
25	19,8	4 M guanidin *HCl	7,3	11,3 B	11,3	4,9	43
	22,3	0,1 M fosfat	12,0	4,8 B	2,0	1,3	28
30							

A anti-HSA

C anti-HSA/HSA 1:2

B anti-HSA/HSA 1:1

D antihuman-IgG/humant IgG 1:1

Eksempel 4

Påvisning av biologisk aktivitet (bindingsevne) av antigener og antistoffer i en modell med anti-HSA/HSA etter immobilisering under spaltingsbetingelser for immunkomplekser (tabell 7).

Anti-HSA/HSA ble koblet til basekatalysert, aktivert ONB-karbonat-"Sephrose 6FF" under elueringsbetingelser (pH 3,0, pH 4,0, 4 M guanidin*HCl) som beskrevet i eksemplene 1 og 3b). Etter vask av kolonnen ble HSA hhv anti-HSA bindingsbuffer tilsatt. Etter ny vask av kolonnen med PBS fulgte eluering (pH 2,0) og fotometrisk bestemmelse av proteinkonsentrasjonen.

Med disse modellforsøk ble det bevist at så vel antigen (HSA) som antistoff (anti-HSA) som immobiliseres under spaltingsbetingelser til et bærerstoff, beholder sin bindingsevne.

10 HSA immobilisert fra immunkomplekser bandt fortsatt anti-HSA som etter ny eluering utmerket seg ved høy affinitet ovenfor HSA i ELISA (resultater ikke vist). Under forutsetning av at 1 mol HSA binder 1 mol anti-HSA ble det fra immunkomplekset (forsøk 3) immobilisert 0,9 mg HSA/ml gel som bandt 2,1 mg

15 anti-HSA. Tilsvarende resultater lar seg reproducere med forsøkene 5, 7, 13 og 16. Det fra immunkompleksene immobiliserte anti-HSA (kanin-IgG) immobiliseres riktig nok effektivt også under standardkoblingsbetingelser i denne modell, resultatet kan påvises med anti-kanin-IgG, men åpenbart skjer koblingen

20 her i et molekylært miljø som fører til sterisk hindring av binding av HSA. Antistoffene selv beholder sin biologiske aktivitet.

25

30

35

Tabell 7: Påvisning av biologisk aktivitet (bindingsevne) av antigener og antistoffer i en modell med anti-HSA/HSA etter immobilisering til basekatalysert, aktivert ONB-karbonat-"Sepharose 6FF" under spaltingsbetingelser for immunkomplekser

5	Immobiliseringsbetingelser a)	Tilsatt protein/ml gel	Konsentrasjon µg/ml	Bindingsbetingelser	PBS-vask	Bindingskapasitet µg/ml gel
10	1. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	3,0 mg HSA	1055	0,3 ml/min, 43 min sirkulasjon	0,028 ml/min, 43 min	100-200
15	2. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	13,4 mg HSA	937	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	100-200
20	3. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	3,7 mg anti-HSA	164	0,5 ml/min, 135 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	2100 (=0,9 mg HSA)
25	4. 19,8 µmol anti-HSA, pH 7 1,1 mg/ml	6,1 mg HSA	531	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	100-200
30	5. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 4 1,2 mg/ml	4,2 mg anti-HSA	368	0,5 ml/min, 180 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	1211 (=0,5 mg HSA)
35	6. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M guanidin 4,9 mg/ml	8,3 mg HSA	578	0,5 ml/min, 90 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	spor

5

10

15

20

25

30

Immobiliseringsbetingelser a)	Tilsatt protein/ml gel	Konsentrasjon µg/ml	Bindingsbetingelser	PBS-vask	Bindingskapasitet µg/ml gel
7. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M guanidin 4,9 mg/ml	7,3 mg anti-HSA	470	0,5 ml/min, 180 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	4714 (=2,1 mg HSA)
8. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M guanidin 4,9 mg/ml	5,1 mg anti-kan. IgG	360	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	1977 (36 %)
9. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	5,1 mg anti-kan. IgG	360	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	1480 (54 %)
10. 19,8 µmol anti-HSA, pH 7 1,1 mg/ml	5,1 mg anti-kan. IgG	360	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	2246 (100 %)
11. 22,3 µmol anti-HSA, pH 3 2,3 mg/ml	5,1 mg anti-kan. IgG	360	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	2246 (48 %)
12. 22,3 µmol anti-HSA, pH 3 2,3 mg/ml	13,8 mg HSA	926	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	100-200

35

5	Immobiliseringsbetingelser a)	Tilsatt protein/ml gel	Konsentrasjon µg/ml	Bindingsbetingelser	PBS-vask	Bindingskapasitet µg/ml gel
10	13. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:2, pH 3 2,9 mg/ml	6,9 mg anti-HSA	477	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	3586 (=1,6 mg HSA)
15	14. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:2, pH 3 2,9 mg/ml	11,2 mg	784	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	100-200
20	15. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:1, pH 12 1,3 mg/ml	6,8 mg HSA	600	0,5 ml/min, 70 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 60 min	100-200
25	16. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:1, pH 12 1,3 mg/ml	4,4 mg HSA	424	0,5 ml/min, 120 min sirkulasjon	0,5 ml/min, 90 min	1579 (=0,7 mg HSA)

a) µmol-verdi: aktive grupper pr ml gel

30

35

Eksempel 5

Affinitetskromatografi av plasma fra en *Lupus erythematoses*-pasient (samtidig standard utførelse).

Plasma fra en pasient som led av *Lupus erythematoses* sto til disposisjon. For utvinning av totalt γ -globulin ble en protein A-kolonne (PHARMACIA) benyttet. Immobilisering av antistoffet ble utført over ONB-karbonataktivert "Sephrose 6FF" (20 μ mol/ml).

¹⁰ Bufferløsninger for adsorpsjonen

Buffer PA pH 7,0	1000 ml	pH-verdien innstilles med HCl eller NaOH
Trinatriumsitrat	3,30 g	
Natriumacetat x 3H ₂ O	5,45 g	
¹⁵ Natriumklorid	4,90 g	
Dinatriumhydrogenfosfat	2,91 g	
Kaliumdihydrogenfosfat	0,26 g	
²⁰ Elueringsmiddel PA pH 2,2	1000 ml	pH-verdien innstilles med HCl eller NaOH
Sitronsyre x H ₂ O	6,12 g	
Natriumklorid	9,00	
²⁵ Vaskebuffer 3 M NaCl pH 7,0	1000 ml	pH-verdien innstilles med HCl eller NaOH
Trinatriumsitrat	3,30 g	
Natriumacetat x 3H ₂ O	5,45 g	
Natriumklorid	175,00 g	
³⁰ Dinatriumhydrogenfosfat	2,91 g	
Kaliumdihydrogenfosfat	0,26 g	
Tween 20	0,50 g	
³⁵ Sitratbuffer 0,1 M pH 2,2	250 ml	pH-verdien innstilles med NaOH
Sitronsyre	5,25 g	

Fremgangsmåter:

En kolonne tilkoblet protein A (5 ml gel, Pharmacia) ble ekvilibrert med buffer PA. 20 ml ferskt plasma, sentrifugert ved høy hastighet, ble blandet 1:2 med buffer PA og på-

5 satt kolonne. Til kromatografien benyttet vi oss av et "Econo-Systems" (BIORAD). Plasmaet ble etter at det hadde forlatt kolonnen, på nytt påsatt kolonnen for å oppnå fullstendig adsorpsjon. Omfattende vask med 5 kolonnevolumer PA var nødvendig for å fjerne ikke-adsorbert materiale. Uspesifikke

10 bindende proteiner ble fjernet med vaskebuffer tilsatt 3 M NaCl. Immunoglobulinene og proteiner fra immunkompleksene ble eluert som en skarp topp med 0,1 M sitratbuffer, 0,05 % "TWEEN 20" pH 2,2. Eluatvolumet utgjorde 6,5 ml. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av UV-adsorpsjonen ved $\lambda_{280 \text{ nm}}$ til

15 17,6 mg/ml. Straks etter elueringen fulgte kobling av de atskilt foreliggende IgG og proteiner til ONB-karbonataktivert sepharose. For å oppnå dette ble 6 ml gel forbehandlet ifølge produsentens anbefalinger og avsugd væske tilsatt eluatet og omrystet i 1 time. Eluatet har grunnet buffervirkningen av de

20 løste proteiner en pH-verdi mellom 3 og 4. Frie bindinger ble fjernet med 1 M etanolamin i 0,1 M boratbuffer pH 8,0. Ved sammenligning av proteinkonsentrasjonen i de sammenslåtte vaskeløsninger med protein A-eluatet fastslo vi en bindings-effektivitet på 57 %. Etter grundig vask står gelen til disposisjon som bærer for affinitetskromatografiske eksperimenter.

25

I tillegg ble 40 ml pasientplasma sentrifugert, for-
tynnet 1:2 med PA og påsatt søylen 2 ganger. Ubundet hhv uspesifikt materiale ble fjernet ved på hverandre følgende vaskinger med 10 volumer av hver av PA, vaskebuffer og PA.

30 Spesifikt bundet protein ble eluert med 0,1 M sitratbuffer pH 2,2 (figur 1).

Plasmaproteinene og de kromatografisk utvunne fraksjoner ble analysert ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) ifølge standardfremgangsmåter ("Miniprotean II",

35 Biorad). Gelene var gradientgeler med fra 10-25 % monomerkonsentrasjon. Farging ble utført med Comassie Brilliant Blue R-250 (figurene 2 og 3).

Fra figur 2 kan det ses at det i protein A-eluatet i tillegg til antistoffer også foreligger andre proteiner. Etter

immobilisering av disse er de i stand til å binde sine respektive reaksjonspartnere spesifikt fra pasientplasmaet. I elueringsstopp 2 (0,1 M sitratbuffer pH 2,2) etter affinitetskromatografien (fig. 1) kunne flere proteiner identifiseres ved PAGE. I tillegg til globulinet og flere høymolekulære proteiner anrikes spesielt 3 proteiner som etter PAGE av protein A-eluatet bare kunne påvises som knapt synlige bånd (fig. 3). De har en relativ molmasse på 40 kD.

10 Eksempel 6

Affinitetskromatografi av plasma fra en mutippel sklerose-pasient

Plasmaopparbeidelse, protein A-eluering og kobling av de eluerte proteiner foregikk på tilsvarende måte som i eksempel 5. Etter avvasking av adsorberte proteiner fra adsorpsjonsmiddelet (topp 1, figur 4) ble spesifikt bundet protein løsnet fra kolonnematerialet med elueringsbuffer, og viste seg etter PAGE (fig. 5) å bestå av en proteinblanding som hovedsakelig inneholdt globuliner.

20

Eksempel 7

Affinitetskromatografi av plasma fra en reumatoid artritt-pasient

Plasmaopparbeidelsen, protein A-eluering og kobling av de eluerte proteiner foregikk på samme måte som i eksempel 5. Etter avvasking av adsorberte proteiner fra adsorpsjonsmiddelet (topp 1, fig. 6) ble spesifikt bundet protein løsnet fra kolonnematerialet med elueringsbuffer, og viste seg etter PAGE (fig. 7) å bestå av en proteinblanding i hvilken det hovedsakelig forelå globuliner.

30

Tekst til figurene 1 til 7

Fig. 1:

Elueringsprofil av pasientplasma etter adsorpsjon til "Sephrose 6FF" tilkoblet homologe antistoffer og antigener ifølge standardfremgangsmåten.

Markeringene angir bufferskifte ved vask og eluering (påsetting av søylen vises ikke):

Nr. 1 - vaskebuffer, nr. 2 - 0,1 M sitratbuffer pH 2,2.

Fig. 2:

PAGE av eluat fra protein-A-kolonnen før og etter kobling til ONB-karbonataktivert sepharose.

Nr. 1/2 = 5 hhv 10 µl materiale før kobling, nr. 3 = 10 kD-stige, nr. 4 = γ-globulinstandard, nr. 5-8 som 1-4, men etter kobling (dvs. ubundet materiale).

Fig. 3:

PAGE av eluat som utvinnes fra immunsorbentkolonnen ved pH 2,2 etter gjennomkjøring av homologt plasma.

Nr. 1-7/9-15 = toppfraksjoner, nr. 8/17 = 10 kD proteinmarkør, nr. 16 = ettervask.

Fig. 4:

Elueringsprofil for pasientplasma etter adsorpsjon til "Sephacrose 6FF" tilkoblet homologe antistoffer og antigener ifølge standardfremgangsmåten.

Markeringene angir bufferskifte ved vask og eluering (påsetting av kolonnen er ikke vist):

Nr. 1 - vaskebuffer, nr. 2 - 0,1 M sitratbuffer pH 2,2.

Fig. 5:

PAGE av eluat som gjenvinnes ved immunsorbentkolonnen med pH 2,2 etter gjennomkjøring av homologt plasma.

Nr. 1 = 10 kD-standarder, nr. 2 = γ-globulinstandard, nr. 3 = toppfraksjon (topp 2 fig. 4), nr. 4 = toppfraksjon etter konsentrering med "Amicon centrifree".

Fig. 6:

Elueringsprofil for pasientplasma etter adsorpsjon til "Sephacrose 6FF" tilkoblet homologe antistoffer og antigener ifølge standardfremgangsmåten.

Markeringen angir bufferskifte ved vask og eluering (påsetting av søylen er ikke vist):

Nr. 1 - vaskebuffer, nr. 2 - 0,1 M sitratbuffer pH 6,0/"Tween", nr. 3 - 0,1 M sitratbuffer pH 2,2.

Fig. 7:

PAGE av eluat som gjenvinnes fra immunsorbentkolonnen

ved pH 2,2 etter gjennomkjøring av homologt plasma.

Nr. 1-4 = proteiner fra vaskebufferen, nr. 5/6 = topp-
fraksjoner, (topp 3 fig. 6), nr. 7 = 10 kD standarder, nr. 8 =
 γ -globulinstandard.

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

- 5 1. Pasientspesifikke adsorpsjonsmidler,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de omfatter atskilte
antigener og/eller antistoffer kovalent bundet til aktiverte,
faste bærermaterialer, hvor antigenene og antistoffene er
separert fra immunkomplekser av patologisk relevante immun-
10 faktorer fra pasienter som har en immunopatologisk tilstand, som
særlig lider av:
- hurtig utviklende glomerulonefritt, fokal glomerulosklerose,
- systemisk lupus erythematosus,
- antifosfolipidsyndrom,
15 - vaskulitter, f. eks. periarteritis nodosa, M. Wegener,
- reumatoid artritt,
- immunologisk trombocytopenisk purpura,
- inhibitorer mot koagulasjonsfaktorer,
- hyperimmuniserte eller ABO-uforenlige, potensielle trans-
20 plantatmottakere,
- polymyositt, og/eller
nevrologiske sykdommer, f. eks. Guillain-Barre-syndrom, poly-
nevropati, amyotrofisk lateralsklerose, myastenia gravis og
multipel sklerose,
25 og hvor antistoffene har spesifisitet til bestemte epitoper som
dannes av celler, erythrocytter og/eller vev som gjennomgår
immunologisk selvdestruksjon hos pasientene, og hvor antigenene
som særlig er epitoper dannet endogent av pasientene, har
spesifisitet til autoantistoffer.
30
2. Pasientspesifikt adsorpsjonsmiddel ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder atskilte
antigener og/eller antistoffer fra pasienter som lider av syk-
dommer som fremkalles eller opprettholdes ved feilregulering av
35 immunsystemet.
3. Pasientspesifikt adsorpsjonsmiddel ifølge kravene 1 og 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder atskilte
antigener og/eller antistoffer fra pasienter som lider av

autoimmunsykdommer eller patologiske reaksjonstilstander som reumatoid artritt, subakutt glomerulonefritt, systemisk lupus erythematosus, multippel sklerose, anti-fosfoid-syndrom, vaskulitter, vevsuforenlige transplantatmottakere, polymyositt, 5 nevrologiske autoimmunsykdommer eller patologiske feilreguleringer som resultat av infeksjonssykdommer.

4. Pasientspesifikt immunadsorpsjonsmiddel ifølge kravene 1-3, 10 k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder atskilte antigener og/eller antistoffer fra pasienter som lider av reumatoid artritt, lupus erythematosus eller multippel sklerose.

5. Pasientspesifikt immunadsorpsjonsmiddel ifølge kravene 1-4, 15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er bundet til et biokompatibelt stoff som er i stand til å binde tilstrekkelig mange kompleksbestanddeler til sin overflate.

6. Pasientspesifikt immunadsorpsjonsmiddel ifølge kravene 1-5, 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er bundet til sepharose eller cellulose i kuleform.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av pasientspesifikt immunadsorpsjonsmiddel ifølge kravene 1-6, 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at immunkomplekser isoleres fra blod eller andre kroppsvæsker, f eks cerebrospinalvæske, fra pasienter, spaltes i sine aktive bestanddeler antistoffer og antigener, og disse bestanddeler kobles kovalent til det faste bærer materiale.

30 8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at immunkompleksene spaltes i sine enkelte bestanddeler i surt hhv. alkalisk miljø, fortrinnsvis i pH-området fra 2-5 hhv. 10-12, og/eller ved tilsetning av salter som NaCl, MgCl₂, LiCl eller urea eller 35 guanidinhydroklorid, og kobles til det faste støttematerialet i et pH-område fra 2-12 ifølge en kjent fremgangsmåte, enten etter fraksjonering eller etter tilsetning av salter som NaCl, MgCl₂, LiCl eller urea eller guanidinhydroklorid, som er i stand til å holde reaksjonspartnerne i dissosiert tilstand ved en bestemt

konsentrasjon.

9. Anvendelse av det pasientspesifikke adsorpsjonsmiddel
ifølge kravene 1-6 for utenomkroppslig aferese.

5

10. Anvendelse av det pasientspesifikke adsorpsjonsmiddel
ifølge kravene 1-6 for utvinning og bearbeidelse av patologisk
viktige kroppsegne stoffer.

Fig. 1:

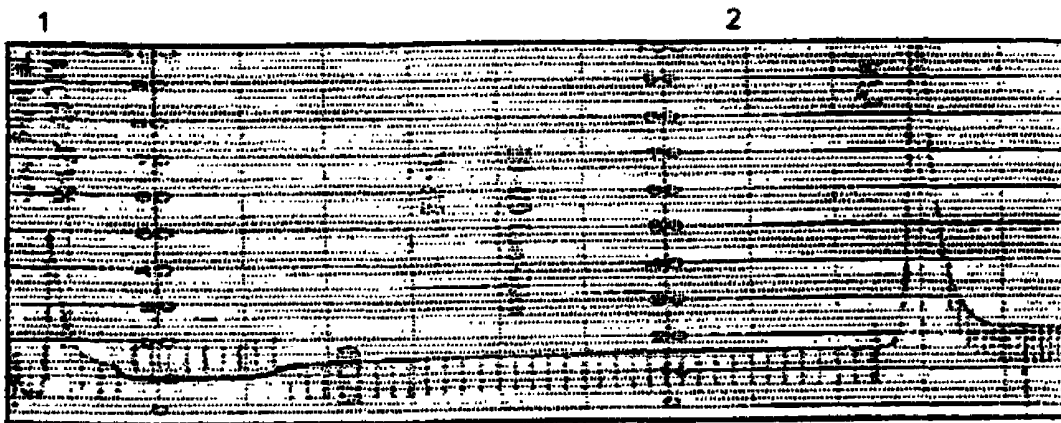


Fig. 2:

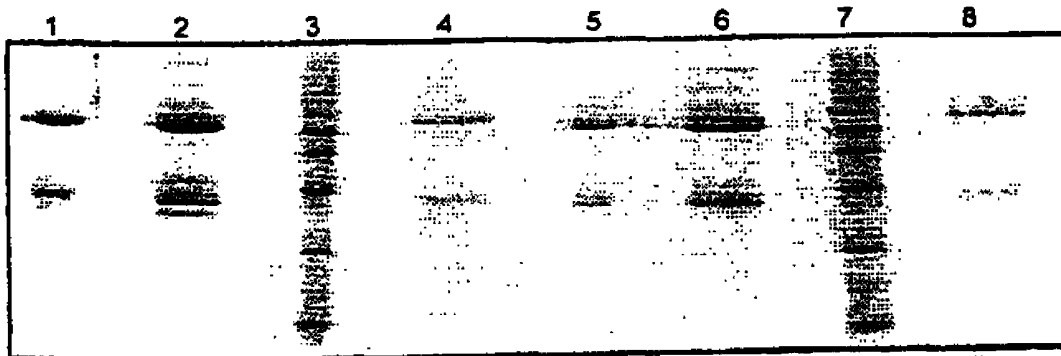


Fig. 3:

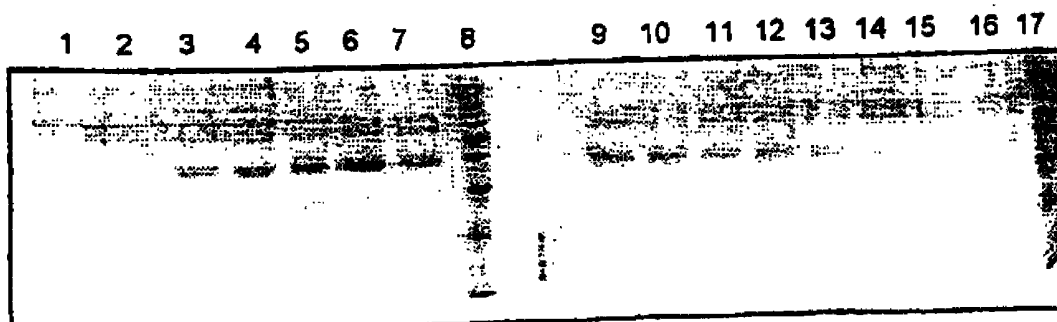


Fig. 4:

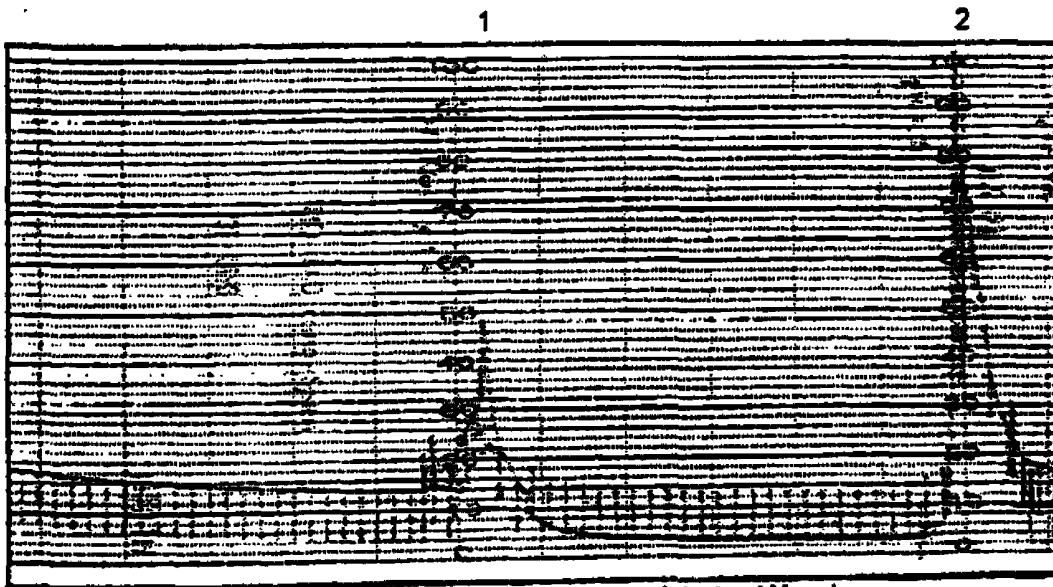


Fig. 5:

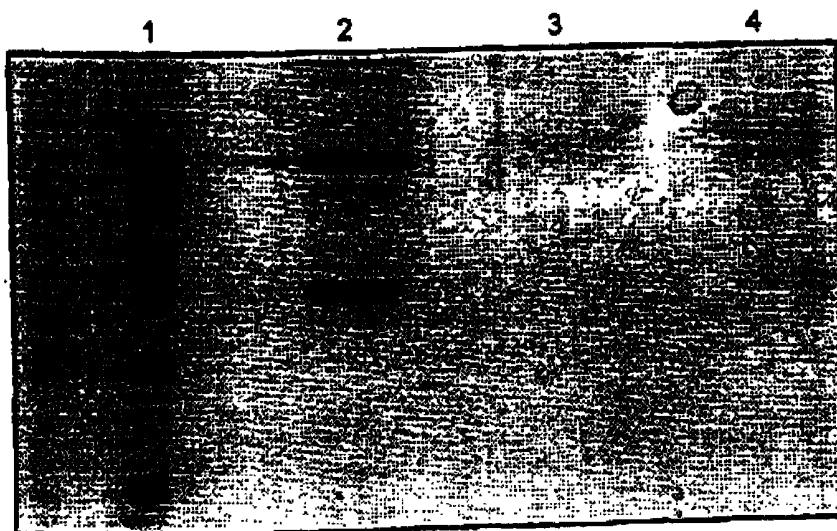


Fig. 6:

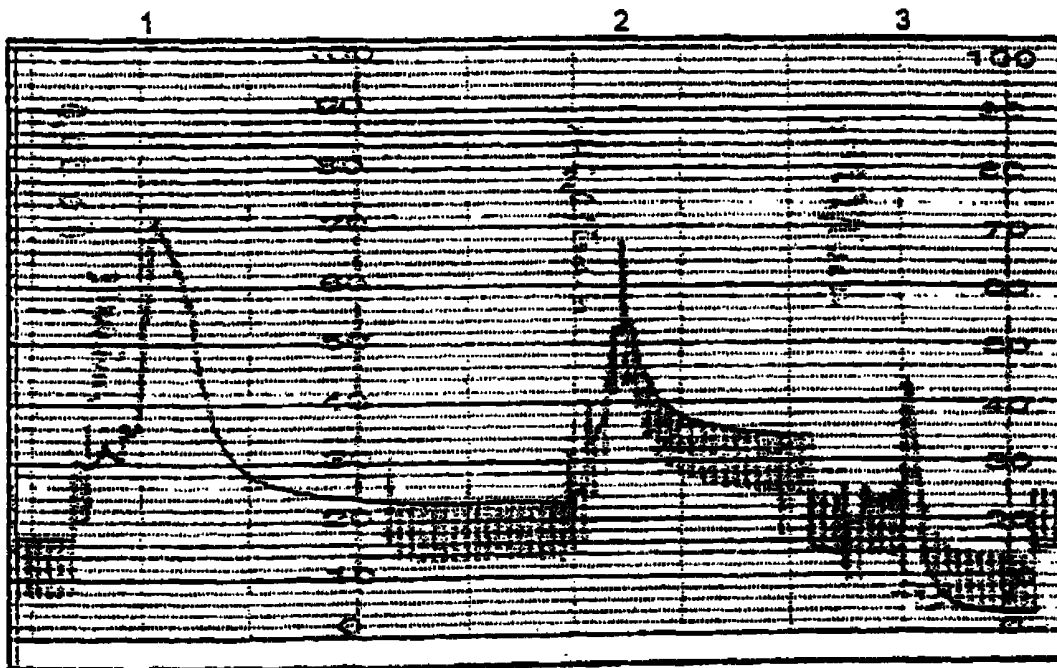


Fig. 7:

