



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 56844

C (45) Patentti myönnetty 10.04.1980
Patent meddelat
(51) Kv.lk.2/Int.Cl.2 C 07 G 7/00

SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning 763610
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 15.12.76
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 15.12.76
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 18.06.77
(44) Nähtävöksiänon ja kuuljulkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utskriften publicerad 31.12.79
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 17.12.75

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2556733.3

- (71) Plasmesco AG, Hänibühl 8, 6300 Zug, Sveitsi-Schweiz(CH)
(72) Waldemar Schneider, Hagen, Dietrich Wolter, Hagen, Christian Fröhlich,
Dortmund, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
(74) Leitzinger Oy
(54) Menetelmä saostuneiden plasmaproteiinien erottamiseksi albumiinipitoi-
sista suspensioista - Förfarande för separering av utfällda plasma-
proteiner ur albuminhaltiga suspensioner

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä saostettujen plasmaproteiinien erottamiseksi
ihmisen veri-plasmasta.

Tuotettaessa albumiinia verestä tai verituotteista albumiinipitoiset kehon nesteet
ja sen tapaiset saadaan albumiinipitoisena suspensiona joka sisältää liuenneen albu-
miinin ohella saostuneita plasmaproteiineja, varsinkin globuliinia. Saksalaisessa
hakemusjulkaisussa 2 415 079 on esitetty menetelmä albumiinin eristämiseksi ihmi-
sen verestä ja sen tapaisista, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- a) plasma erotetaan veren kiinteistä ja hyytymistä edistävistä liukoisista aineo-
sista ja haluttaessa liukoiset ei-albumiinipitoiset aineosat otetaan talteen;
- b) globuliini saostetaan kuumentamalla jäännösliuos 7 - 12 tilavuusprosenttisten
alkoholien läsnäollessa, ja albumiinin stabilisaattoreiden, esimerkiksi nat-
riumkaprylaatin läsnäollessa lämpötilassa noin 60 - 75°C, ja neste erotetaan
globuliineista;
- c) albumiini väkevöidään albumiinipitoisesta liuoksesta.

Saostetun globuliinin ja mahdollisten muiden saostuneiden plasmaproteiinien erotus

suoritetaan kuumasaoastamalla pH-arvossa 4,4 ja käyttämällä jatkuvaa linkousta. Erottuneet plasmaproteiinit jäävät roottoreihin ja albumiini jää supernatanttiin.

Tunnetun menetelmän puutteena on, että verraten paljon albumiinia jää erotettuun väkevöitteeseen, joka siis on pestävä ja lingottava useita kertoja arvokkaan jäännösalbumiinin talteenottamiseksi. Lisäksi linkoaminen on hyvin aikaa vievää ja aiheuttaa työkustannuksia sekä kovaa melua. Cohn-menetelmässä (kts. vastaavaa saksalaista hakemusjulkaisua 2 415 079) on välttämättömyyden erottaa suspensio, jonka muodostavat saostetut globuliinit ja liukoinen albumiini. Kokeet ovat osoittaneet, että Cohn-menetelmien mukaiset suspensiot eivät ole helposti suodatettavissa.

On kokeiltu erilaisia suodatusmenetelmiä kylmässä etanoli-jakotislauksessa saatujen saostettujen proteiinien poistamiseksi. Saatujen kokemusten mukaan näitä sakkoja ei taloudellisesti voida suodattaa. Tämä johtuu ilmeisesti aineen erikoisesta rakenteesta. Tästä kokemuksesta huolimatta on käytetty erilaisia suodatusmenetelmiä, koska on havaittu, että globuliinit, jotka saadaan kuuma-etanolisaostuksella, eroavat huomattavasti niistä, jotka on saatu kylmäsaostuksella.

Julkaisussa Vox Sang. 23: 12-25 (1972) on kuvattu plasmafraktiointia, jossa proteiinit erotetaan kylmäetanoli-fraktioinnilla. Tällöin tuote ei kuitenkaan ole täysin puhdas joten se on edelleen puhdistettava jälkikäsittelyvaiheessa.

Monivaiheista plasmafraktiointia on myöskin kuvattu julkaisussa Vox Sang. 31: 141-151 (1976). Fraktiointi on monivaiheinen ja soveltuu lähinnä laboratoriokäyttöön.

Monivaiheinen suodatusmenetelmä 100 %:sesti puhtaan albumiinin erottamiseksi on myöskin kuvattu suomalaisessa patenttijulkaisussa 52 868 sekä julkaisussa Proc. Biochem. 1975, Sept. 11-14.

Nyt on yllättäen havaittu, että 100 %:sesti puhdasta albumiiniliuosta voidaan yksinkertaisesti ja suuremmassa mittakaavassa valmistaa siten, että saostunut globuliini ja mahdollisesti muut plasmaproteiinit erotetaan lietesuodattamalla suspensiokudossuotimilla, joiden silmukkakoko on 20-200 mikrometriä ja käyttämällä samanaikaisesti piihappo-suodatusapuaainetta.

Lietesuodatus on sinänsä tunnettu. Se tapahtuu tavallisesti suodattimessa, joka oleellisesti muodostuu suljetusta paineastiasta, johon keskitetysti pyörivälle ontolalle akselille on sovitettu pyöreät suodatuselimet, jotka ovat toistensa suuntaisia joko vaakasuorassa tai pystysuorassa asennossa. Suodatuselimet on tavalli-

sesti varustettu metallikudoksella.

Suodattavaan aineeseen lisätty suodatusapuaine annostellaan jätteiden sameuden ja luonteen mukaan.

Suodatuselimien päälle kerääntynyt suodos lietetään pyörittämällä suodatuselimää ja vastahuuhtelemalla ne. Jäännökset poistetaan lietteenä.

Lietesuodatus tarjoaa esillä olevassa tapauksessa yllättäviä etuja muihin suodatusmenetelmiin nähden, jotka vaativat pitkiä suodatusaikoja, eivätkä ole sen edullisempia kuin aikaa vievät linkoamismenetelmät. On kokeiltu seuraavia suodatusmenetelmiä ja suodattimia: selkeytyssuodatus hiili- ja asbestilevysuodattimilla, suodatuskerrokset selluloosa-alustan päällä; lasikuitusuodattimet, varsinkin sintrattu lasi. Käytetyt suodattimet johtavat liian pitkiin suodatusaikoihin, suodatuslaitteiden tukkeutumiseen ja epätydyttäviin suodatustuloksiin kuten sameisiin suodoksiin. Ainoastaan käytettäessä lietesuodatinta on mahdollista aikaansaada kirkkaita suodoksia, joita ei välttämättä enää tarvitse uudelleen suodattaa lisäkirkastusta varten.

Erityisen edullinen suodatustulos saadaan suodatinelimillä, joiden silmukkakoko on 70-90 µm. Tällä silmukakoolla saadaan optimi tulos mitä suodatusmäärään ja laatuun tulee ja jolloin tarvitaan kulloinkin ainoastaan yksi suodatusvaihe.

Jotta suodatuspinta olisi riittävä suodatusta varten on monissa tapauksissa edullista suorittaa primääriliettäminen neutraalilla nesteellä suodatuselimen päällystämiseksi noin 0,5 cm paksulla kerroksella suodatusapuainetta. Suodatusapuaineiksi soveltuvat tavalliset kaupalliset tuotteet. Näiden ohelle soveltuvat myöskin tunnetut selluloosasuodatusaineet, jotka kuitenkin ovat teholtaan heikompia. Niillä voidaan kuitenkin saada monia tapauksia varten tarpeeksi hyvä tuote. On sopivaa esipaisuttaa suodatusapuaine.

Edullisessa prosessissa käytetään plasmaproteiinina noin 4-6-prosenttista suspensiota, johon sekoitetaan 20-70 g piimaasuodatusapuainetta litraa kohti. Sen jälkeen tämä suspensio suodatetaan. Alemmat proteiinipitoisuudet edellyttävät mahdollisesti pienempiä suodatusapuainemääriä.

Jotta myöskin jätelietteessä oleva albumiini saataisiin talteen, voidaan lietesuodattusta käyttää jälkisuodatuksessa kun puhdistus on ensin suoritettu linko- ja vastahuuhtelupuhdistuksen tai kiertokulkumenetelmää seuraavan selkeyttämisen jälkeen. Saannon suurentamiseksi voidaan työskennellä paineessa 400 ± 250 kPa ilman suodatus-
tehokkuuden vähenemistä.

Keksintöä selitetään seuraavissa esimerkeissä. Molemmissa esimerkeissä käytetään lähtöaineena erilaista suspensiota. Esimerkissä 1 lähdetään suspensiosta, joka on saatu saksalaisen hakemusjulkaisun 2 415 079 mukaisella menetelmällä.

Esimerkki 1

Ihmisen verestä erotetaan kiinteät aineosat (verisolut ja verihiutaleet) ja poistetaan hyytymistekijät. Lähtöliuos sisältää noin 5 - 6 % plasmaproteiinia. Saksalaisessa hakemusjulkaisussa 2 415 079 esitetyn menetelmän mukaan hyytymistekijä VIII ja fibriinit poistetaan kryoetanolilaskeuttamisen avulla. Protrombiinikompleksi poistetaan absorptioilla avulla. Tämä veriplasma on HBsAg-negatiivinen, jolla on tavalliset transaminaasiarvot eikä se sisällä mitään näkyvää hemoglobiinia. Veriplasma-liuokseen lisätään natriumkaprylaattiä siksi, kunnes sen pitoisuus liuoksessa on 0,004 moolia. Tätä seosta, johon on lisätty noin 9 % etanolia, kuumennetaan pH-arvossa 6,5. Tämä pH-arvo aikaansaadaan lisäämällä 0,5 n HCl:ää. Lämpötila kohotetaan tasaisesti noin kolmessa tunnissa 68°C:seen. Sen jälkeen neste jäädytetään lämpötilaan 10°C. Ulkovaipalla jäädytettävässä puhdistussuodatinlingossa käsitellään suspensiota edelleen lämpötilassa 10°C. Saatu liuos sisältää noin 2-2,5 % albumiinia.

Piirustuksessa on esitetty periaateluonnos laitteesta lähtöliuoksen käsittelemiseksi. Koko laitteiston keskeisenä laitteena on kaksiseinäinen suodatusastia 20, jossa voidaan sekä kuumentaa että jäädyttää. Astian tilavuus on noin 220 litraa ja suodatuspinta noin 3 m². Pyöreät suodatuselimet (suodatuslevyt) 22 on yhdistetty keskeisen pyöritettävän onton akselin 21 kanssa sillä tavalla, että suodos, kun se on kulkenut suodatuspinnan ja jokaista suodatuselintä peittävän suodatusväliaineen läpi virtaa keskiakselia kohti ja imetään sen kautta pois sekä lasketaan johdon 23 ja selkeytysventtiiliin 8 kautta selkeytyssäiliöön. Suodatuselimet on varustettu metallipunoskudoksella. Suodatusapuaaine ja saostunut globuliini poistetaan suodatusjaksojen välillä keskipakoisesti linkoamalla suodatuselimistä ja pestään 1-prosenttisellä NaCl-liuoksella niin, että suodatin on jälleen valmis seuraavaa kiertojaksoa varten.

Suodattamaton lähtöliuos pidetään säiliössä 24 suspensiona jatkuvasti sekoittaen (sekoituslaite 3). Pumpun 2 välityksellä lähtöaine johdetaan venttiiliin 10 ja kahden syöttöventtiiliin 11, 12 kautta suodatusastiaan 20. Tähän astiaan voidaan syöttää paineilma-venttiiliin 5 kautta paineilmaa.

Aluksi suodatuselimet päällystetään tislattuun veteen lietetyllä apuaineella kp Celite 545 (tavaramerkki piimaa-apuaineelle) 500 litrassa vettä noin 0,2 cm:n paksuisen primäärisuotimen aikaansaamiseksi normaalipaineessa. Sen jälkeen 500 litraan

albumiinipitoista suspensiota sekoitetaan 25 kp Celite 545. Seos johdetaan sameutus-säiliöstä suodatuskattilaan ja painetaan ylipaineessa 2 baaria elimien 22 suodatus-pintojen läpi. Ennen suodatetun nesteen johtamista selkeytyssäiliöön, neste johdetaan nk. kiertomenetelmässä vielä suodatuselimien läpi, kunnes tarkastelulasissa 25 suodos näyttää riittävän kirkkaalta. Sen jälkeen suodos johdetaan venttiilin 8 kautta selkey-tyssäiliöön.

Kun albumiinipitoinen liuos on läpäissyt suodattimen, sen läpi pumpataan 1-prosent-tista vesipitoista keittosuolaliuosta. Tämän liuoksen määrä on suunnilleen yhtä suuri kuin puolet panosmäärän tilavuudesta.

Läpivirtausmäärä on noin 150 litraa tunnissa. Suodoksen proteiinipitoisuus proses-sin alussa on noin 2,5 %, kun taas loppupitoisuus on noin 0,05 %. Saatu liuos on kirkas ja sen proteiinipitoisuus on noin 1,5 % (albumiini) sekä osmolaliteetti noin 1000 mosm.

Sen jälkeen kirkas suodos jakosuodatetaan käyttäen Millipore Pellicon kasettijärjes-telmää (suodatuspinta noin $0,9 \text{ m}^2$, valmistaja Millipore GmbH, Neue-Isenburg, Saksa) siksi, kunnes 25-prosenttinen proteiiniliuos, jonka osmolaliteetti on välillä 100-200 mosm, on saavutettu. Läpivirtausnopeus menetelmän alussa on noin 5-6 litraa suodosta minuutissa. Toistosuodatus suoritetaan käyttäen dialyysikalvoa.

Suodatuspuhdistus tapahtuu pyörittämällä suodatuselimiä käyttömoottorin 1 välityk-sellä ja poistamalla liete poistuventtiilin 9 kautta. Venttiilin 4 kautta poistet-tu aine voidaan vielä kerran liettää ja suodattaa.

Neste ei ensimmäisen suodattimen läpikulun jälkeen osoita Tyndall-ilmiötä ja se on vesikirkas. Neste on käytännöllisesti katsoen vapaa sivuaineista, kuten lipideista ja proteiini-epäpuhtauksista. Neste voidaan myöskin välittömästi johtaa albumiini-rikastukseen ja sitä seuraavaan suodatusprosessiin. Albumiinirikastus on sinänsä tunnettu ja esitetty mainitussa saksalaisessa hakemusjulkaisussa 2 415 079.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä suoritetaan seuraavat vaiheet:

Plasma, 600 kg

sisältää: 33,6 kg proteiinia, josta 18,48 kg albumiinia (= 55 %)

1. + 9 % etanolia

+ 0,004 M natriumkaprylaattia

+ HCl (pH 6,5)

2. Kuumasaostus: 30 minuuttia, 68°C

3. + HCl, pH 4,4

4. Lietesuodatus

Suodos

5. Toistosuodatus (väkevöiminen ja dialyysi)

6. + NaOH, pH 7

7. Kirkastus

Albumiiniliuos sisältää 17,2 kg albumiinia (saanto 93 %)

Esimerkki 2

Istukka-uutteesta poistetaan aluksi trikloorietikkahapolla hemoglobiini. Sen jälkeen proteiinipitoinen jäännös kuumennetaan pH-arvossa 6,5 lämpötilaan 68°C. Jäähdyttämisen ja pH-arvoon 4,4 säätämisen jälkeen lisäämällä 0,5 n-HCl sekoitetaan 100 litraa saatua nestettä 3 kp:n kanssa suodatusapuainetta (suodatusapuaineena on Hyflo-Super-Cel, tavaramerkki piimaa-suodatusapuaineelle).

Lämpötilassa 18°C ja paineessa 4 baaria neste johdetaan jo selitetyn lietesuodattimen läpi, jonka silmukkakoko on 70 µm. Tämän jälkeen toimitaan ilman primääriliettämistä. Neste kierrätetään niin kauan, kunnes se tarkastuslasissa on kirkas eikä osoita Tyndall-ilmiötä. Tämän jälkeen tunnetuilla menetelmillä nesteessä oleva albumiini saatetaan haluttuun väkevyyteen.

Kun nesteen kokonaismäärä on kulkenut lietesuodattimen läpi se pestään 0,9-prosenttisella NaCl-liuoksella. Myöskin tällöin saatu neste on kirkas ja sisältää vielä noin 0,5 - 20 % albumiinia. Se voidaan myöskin välittömästi johtaa albumiinin väkevöimiseen, kuten on esitetty saksalaisessa hakemusjulkaisussa 2 415 079.

Lietteen suodatus voidaan suorittaa myöskin ilman primääriliettämistä. Suodatuselimien puhdistus tapahtuu vastavirtahuuhtelulla, jossa suodatuselimet saatetaan pyörimään ja jäännökset poistetaan lietteenä.

Käytettäessä riittävää määrää pesunestettä (tislattua vettä tai NaCl-liuosta) voidaan saavuttaa albumiinimäärän saanto aina noin 96 %. Muissa erotusmenetelmissä, kuten esimerkiksi linkoamistekniikassa, saadut liuottimen : kiintoaineen tiheys-suhteiden muutoksesta johtuvat suuret suspensiomäärät voidaan välttää jälkisuodatuksella, sen jälkeen kun laitteessa oleva liuos on puhdistettu joko vastavirtahuuhtelulla tai kierrätysmenetelmää seuraavalla selkeyttämisellä. Suodatuksesta ennen laimennetun albumiiniliuoksen edelleen käsittelyä voidaan luopua liuoksen suuren puhtauden johdosta.

Kiinteiden aineiden erottaminen on lämpötilasta riippumaton. Suodatusnopeus muuttuu nousevan ja alenevan lämpötilan mukana ainoastaan vähän ja voidaan jättää huomioonottamatta. Tavalliseen tapaan pH-arvoon 4,4 happamaksi tehty, kuumakäsitelty plasma johdetaan huoneen lämpötilassa erottamista varten ulkovaipalla jäähdytettävään puhdistussuodatinlinkoon. Suodatusmenetelmä voi tapahtua myöskin muissa lämpötiloissa. Kokeet ovat osoittaneet, että lämpötila-alueella 4 - +40°C työskentelyalue on mahdollinen. Suodatuspaine voidaan melkein paineettomasti tapahtuvan primääriliettämisen jälkeen kohottaa arvoon $4,0 \pm 2,5$ baaria. Tästä tuloksena oleva suodatusteho on noin 150 litraa suodosta/m²/h. Edullisiksi suodatusapuaaineiksi ovat osoittautuneet varsinkin piimaat.

Esimerkeissä mainitut määrät ovat vaihdeltavissa kulloinkin suodatusmäärän mukaan. Kokeita on suoritettu menestyksellisesti sekä pienissä tilavuuksissa (noin 10 litraa) kuin myöskin suurissa säiliöissä (noin 500 litraa).

Patenttivaatimus

Menetelmä saostuneiden plasmaproteiinien erottamiseksi albumiinipitoisesta suspensiosta valmistettaessa puhdasta albumiinia ihmisen veriplasmasta, josta hyytymis-tekijät on poistettu, lämpökäsittelmällä plasma-albumiinia stabiloivien yhdisteiden läsnäollessa ja neutraalilla pH-alueella, sekä sitä seuraavalla jäähdytyksellä pH-arvoa alentaen arvoon 4 ja erottamalla muodostunut sakka, joka pääasiassa sisältää globuliinia, jolloin plasman lämpökäsittely suoritetaan noin 7 - 12 %:sen alkoholin läsnäollessa ja lämpötilassa 60 - 75°C, t u n n e t t u siitä, että saostuneen globuliinin ja mahdollisesti muiden plasmaproteiinien erotus suoritetaan lietesuodattamalla kudossuotimilla, joiden silmukkakoko on 20 - 200 mikrometriä, ja käyttämällä samanaikaisesti piihappo-suodatusapuaainetta.

Patentkrav

Förfarande för separering av utfällda plasmaproteiner ur en albuminhaltig suspension vid framställning av rent albumin ur humanblodplasma, ur vilken koaguleringsfaktorer avlägsnats, genom värmebehandling av plasma-albumin i närvaro av stabiliserande föreningar och inom det neutrala pH-området, och efterföljande avkylning under sänkning av pH-värdet till 4 och separering av den bildade fällningen, som i huvudsak innehåller globulin, varvid plasmans värmebehandling utföres i närvaro av 7 - 12 %:ig alkohol vid 60 - 75°C, k ä n n e t e c k n a t därav, att det utfällda globulinet och eventuella andra plasmaproteiner separeras genom slamfiltrering med vävfilter med en maskstorlek av 20 - 200 mikrometer och genom samtidig användning av kiselgur-filterhjälpmedel.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 415 079 (C 07 G 7/00).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 52 868 (C 07 G 7/00).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Vox Sang 23 (1972) 18-25

Vox Sang 31 (1976) 141-151

Proc. Biochem. 1975 Sept. 11-14.

