



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl. 3: C 07 G 7/00

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



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

632 277

②① Gesuchsnummer:	15931/76	⑦③ Inhaber:	Armour Pharmaceutical Company, Scottsdale/AZ (US)
②② Anmeldungsdatum:	17.12.1976		
③① Priorität(en):	17.12.1975 DE 2556733	⑦② Erfinder:	Dr. Waldemar Schneider, Hagen (DE) Dr. Dietrich Wolter, Hagen (DE) Christian Fröhlich, Dortmund (DE)
②④ Patent erteilt:	30.09.1982		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	30.09.1982	⑦④ Vertreter:	Bovard & Cie., Bern

⑤④ **Verfahren zur Abtrennung ausgefällter Eiweissstoffe aus einer albuminhaltigen Suspension.**

⑤⑦ Die Gewinnung von Albumin für nicht-therapeutische Verwendungszwecke aus einer aus Blutplasma gewonnenen Suspension erfolgt durch Schwemmfiltrierung der Suspension an einem Gewebefilterelement. Die nicht-albuminhaltigen Bestandteile der Emulsion werden auf dem Gewebefilterelement gesammelt und als Filtrat wird eine klare Albumin-Lösung gewonnen. Das Verfahren ermöglicht die Abtrennung von hitzegefällten Eiweissstoffen aus der Suspension mit gegenüber bekannten Filtrationsverfahren wesentlich geringeren Aufwand innert kürzerer Filtrierdauer und unter Vermeidung einer Verstopfung der Filtereinsätze.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Abtrennung ausgefällter Eiweissstoffe aus einer albuminhaltigen, bei der Gewinnung von Albumin für nicht therapeutische Verwendungszwecke aus Blutplasma gewonnenen Suspension, gekennzeichnet durch Schwemmfiltrierung der Suspension an einem Gewebefilterelement, auf dem die nicht-albuminhaltigen Bestandteile gesammelt werden und eine klare Albumin-Lösung als Filtrat gewonnen wird.

2. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Filtrierung in einem Zentrifugal-Reinigungsfilter mit geschlossenem Druckkessel und einer Maschenweite der Filterelemente von 20–200 μ , vorzugsweise 70–90 μ , erfolgt.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Filtrierung über horizontal angeordnete Filterelemente erfolgt, die Metalltressengewebe mit 80 μ Maschenweite aufweisen.

4. Verfahren gemäss Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass eine Suspension mit einem Gehalt von 4–6 Gew.% Plasmaeiweiss mit 30–70 g Kieselgur-Filterhilfsmittel pro Liter versetzt wird.

5. Verfahren gemäss Patentanspruch, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zellulose-Filterhilfsmittel in vorgequollenem Zustand verwendet wird.

6. Verfahren gemäss den Patentansprüchen 1, 2 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass das in der Anschwemmungsmasse befindliche Trubvolumen durch eine Restvolumenfiltereinrichtung ausgebracht wird, nachdem entweder eine Abreinigung durch Rotation und Gegenspülung oder eine im Kreislaufverfahren erfolgte Klärung des Filterapparatevolumens stattgefunden hat.

7. Verfahren gemäss den Patentansprüchen 2 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass bei einem Filtrationsüberdruck von $4,0 \pm 2,5$ bar gearbeitet wird.

8. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die klare albuminhaltige Lösung durch eine Dialyse-Membran diagefiltert wird.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Abtrennung ausgefällter Eiweissstoffe aus einer albuminhaltigen, bei der Gewinnung von Albumin für nicht-therapeutische Verwendungszwecke aus Blutplasma gewonnenen Suspension.

In der DE-OS 2 415 079 ist ein Verfahren zur Isolierung von Albumin aus Blut, Blutprodukten, anderen Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakten, durch Abtrennen des Plasmas von den festen Bestandteilen des Blutes, Ausfällen und Abtrennen der Globuline und Anreichern des Albumins beschrieben, bei welchem die abgetrennte Flüssigkeit zum Ausfällen der Globuline in Anwesenheit mindestens eines Alkohols der Formel $\text{CH}_3-\text{n}(\text{CH}_2)-\text{OH}$, wobei n für Null, 1 oder 2 steht, und mindestens einer albuminstabilisierenden Substanz auf 60–75°C erhitzt wird, worauf die Globuline ausgefällt und abgetrennt werden und das in der erhaltenen Flüssigkeit befindliche Albumin angereichert wird.

Die Abtrennung der ausgefällten Globuline und eventueller anderer ausgefallener Eiweissstoffe aufgrund einer Hitze-fällung geschieht gemäss dem in der genannten Veröffentlichung beschriebenen Verfahren vorzugsweise bei einem pH-Wert von 4,4 durch Zentrifugieren im kontinuierlichen Fluss. Die abgeschiedenen Eiweissstoffe sammeln sich in den Rotoren, und das Albumin verbleibt in der überstehenden Flüssigkeit.

Bei der bekannten Abtrennmethode wird als unvoll-

kommen empfunden, dass relativ viel Albumin in dem abgeschiedenen Konzentrat verbleibt, so dass noch mehrere Wasch- und Zentrifugier-Arbeitsgänge zur Gewinnung des wertvollen Restalbumins erforderlich sind. Ausserdem ist das Zentrifugieren sehr zeit- und arbeitsaufwendig und erzeugt grossen Lärm. Trotz dieser Nachteile wurde keine andere Arbeitsweise in Erwägung gezogen, weil es bei der seit vielen Jahren praktizierten Cohn-Methode (siehe entsprechenden Hinweis der genannten Veröffentlichung) üblich und notwendig ist, die Suspension, bestehend aus gefällten Globulinen und gelöstem Albumin, durch Zentrifugieren zu trennen. Versuche haben ergeben, dass die Suspensionen gemäss der Cohn-Methode praktisch bei normalen Anforderungen nicht zu filtrieren sind.

Es sind verschiedene Filtermethoden getestet worden, um die bei der kalten Äthanol-Fraktionierung gewonnenen gefällten Proteine zu entfernen. Nach der gewonnenen Erfahrung können diese Niederschläge durch Filtration nicht kostengünstig gewonnen werden. Dies ist offenbar auf die besondere Konsistenz der Stoffe zurückzuführen. Trotz dieser Erfahrung wurden verschiedene Filtriermethoden verwendet, da festgestellt worden war, dass Globuline, die bei der Hitze-Äthanol-Fällung gewonnen wurden, sich beträchtlich von denen unterschieden, die bei der Kalt-Fällung gewonnen wurden.

Entgegen Erfahrung und Erwartung lässt sich überraschenderweise die Aufgabe lösen, mit wesentlich geringerem Aufwand die hitze-gefallenen Eiweissstoffe aus der Suspension abzutrennen, indem gemäss der Erfindung die Abtrennung durch eine Schwemmfiltrierung der Suspension an einem Gewebefilterelement erfolgt, auf dem die nicht-albuminhaltigen Bestandteile gesammelt werden und eine klare Albumin-Lösung als Filtrat gewonnen wird. Das Schwemmfiltrieren ist an sich bekannt. Die Schwemmfiltrierung erfolgt üblicherweise in Zentrifugal-Reinigungsfiltern, die im wesentlichen aus einem geschlossenen Druckkessel bestehen, in dem auf einer zentrisch laufenden Hohlwelle runde Filterelemente angeordnet sind, die entweder horizontal oder vertikal parallel zueinander liegen. Die Filterelemente sind üblicherweise mit einem Metalltressengewebe ausgerüstet.

Die zu filtrierende Substanz wird mit Filterhilfsmitteln versetzt, üblicherweise Kieselgur, die je nach Trübungsart und Charakter der Rückstände dosiert zugemischt werden.

Das auf den Filterelementen sich ansammelnde Filtrat kann durch Rotation der Filterelemente und Gegenspülung abgeschwemmt und die Rückstände können als sogenannter Slurry ausgetragen werden.

Das Schwemmfiltrieren bietet im vorliegenden Falle überraschende Vorteile, da andere Filterarten und Filtriermethoden derartig lange Filterzeiten benötigt, dass sie keinerlei Vorteile gegenüber der zeitraubenden Zentrifugiermethode ergeben. Dabei wurden folgende Filtermethoden getestet: Klärfiltration mit Kohle- und Asbestscheibenfilter; Filterschichten auf Zellulosebasis; Glasfaserfilter; gesintertes Glas. Die verwendeten Filtriermethoden führten entweder zu übermässig langen Filtrierzeiten, Verstopfungen der Filtereinsätze oder zu trüben gefilterten Flüssigkeiten. Nur die Verwendung eines Schwemmfilters ermöglicht es, klare Filtrate zu erhalten, die keine zusätzlichen Klärfiltrationen notwendig machen und die damit ein optimales Arbeiten bei der Albumin-Gewinnung ermöglichen.

Insbesondere wird vorgeschlagen, die Filtrierung in einem Zentrifugal-Reinigungsfilter mit geschlossenem Druckkessel und einer Maschenweite der Filterelemente zwischen 20 und 200 μ durchzuführen.

Insbesondere wird für die vorliegenden Flüssigkeiten mit einer Maschenweite von 70–90 μ gearbeitet. Bei dieser Maschenweite ergibt sich ein Optimum zwischen erreich-

barem Durchsatz und vollständiger Ausfiltrierung, wobei jeweils nur ein Filtergang durchgeführt werden muss.

Um die Filterfläche ausreichend für die nachfolgende Filtrierung vorzubereiten, ist in manchen Fällen günstig, zunächst eine Primäran Schwemmung mit einer Neutralflüssigkeit vorzunehmen, bei der das Filterelement mit einer Schichtdicke von etwa 0,5 cm des Filterhilfsmittels belegt wird. Als Filterhilfsmittel eignen sich üblicherweise im Handel angebotene Kieselgur-Sorten mit den Markenbezeichnungen «Hyflo-Super-Cel», «Celite 545» oder «Perlite». Daneben eignen sich auch Zellulose-Filterhilfsmittel bekannter Art, jedoch mit weniger guten Filterleistungen. Mit ihnen lässt sich ebenfalls ein für viele Fälle ausreichendes Produkt gewinnen. Es empfiehlt sich, das Filterhilfsmittel vorzuquellen.

Günstige Filtereffekte ergeben sich mit einem horizontal angeordneten, mit 80 µ Maschenweite versehenen Metalltressengewebe-Filterelement.

Als günstige Rezeptur erweist sich eine Suspension mit einem Gehalt von 4–6 Gew.% Plasmaeiweiss, und ein Versetzen dieser Suspension mit 20–70 g Kieselgur-Filterhilfsmittel pro Liter. Diese Suspension kann anschliessend filtriert werden. Niedrigere Eiweiss-Konzentrationen bedingen u. U. auch niedrigere Filterhilfsmittelmengen.

Um auch das sich im Trubvolumen (Slurry) befindliche Albumin noch zu gewinnen, wird vorgeschlagen, dass durch eine Restvolumenfiltereinrichtung mit einem kleinen Teil der Gesamtfilterfläche auch dieses ausgebracht wird, nachdem eine Abreinigung durch Rotation und Gegenspülung oder eine im Kreislaufverfahren erfolgte Klärung des Filterapparatvolumens stattgefunden hat. Um die Ausbeute zu vergrössern, kann ohne Einbusse der Filterfähigkeit mit einem Druck von $4,0 \pm 2,5$ bar gearbeitet werden.

Die Erfindung wird an den nachfolgenden Beispielen erläutert. Die beiden Beispiele gehen aus von zwei verschiedenen Suspensionen. Bei Beispiel 1 wird ausgegangen von einer Suspension, die mit Hilfe des Verfahrens gemäss DE-OS 2 415 079 gewonnen worden ist. Die prozentualen Konzentrationsangaben sind gewichtsmässig.

Beispiel 1

Aus Humanblut werden die festen Bestandteile, d.h. Blutzellen und Blutplättchen, abgetrennt und die Gerinnungsfaktoren entzogen. Die Ausgangslösung enthält etwa 5–6% Plasmaeiweiss. Gemäss dem in der DE-OS 2 415 079 dargestellten Verfahren werden der Gerinnungsfaktor VIII und das Fibrinogen durch Kryo-Äthanol-Sedimentation entfernt. Der Prothrombin-Komplex wird durch Absorption entfernt. Das ursprüngliche Plasma ist HBAg-negativ, hat normale Transaminase-Werte und enthält kein sichtbares Hämoglobin. Dem Ursprungsplasma wird Natriumcaprylat zugefügt, bis eine Konzentration von 0,004 Mol erhalten wird. Die Mischung, welche etwa 9% Äthanol enthält, wird bei einem pH-Wert von 6,5 erhitzt. Der pH-Wert wird durch 0,5 n HCl erreicht. Die Temperatur wird innert etwa 3 Stunden bei gleichmässiger Wärmezufuhr bis auf 68°C gebracht. Anschliessend wird die Flüssigkeit abgekühlt auf 10°C. In einem mittels Aussenmantel kühlbaren Zentrifugal-Reinigungsfilter wird die Suspension bei 10°C weiterverarbeitet. Die zur Weiterverarbeitung gelangende Lösung enthält 2–2,5% Albumin.

In der Zeichnung ist in einer Prinzipskizze dargestellt, wie die Ausgangslösung verarbeitet wird. Zentrale Vorrichtung der gesamten Einrichtung ist ein Filterkessel 20 mit Doppelmantel, der sowohl erhitzt als auch gekühlt werden kann. Der Kessel hat eine Kapazität von etwa 220 Liter und eine Filteroberfläche von ungefähr 3 Quadratmetern. Die runden Filterelemente (Filterscheiben) 22 sind mit einer zentralen, rota-

tionsfähigen Hohlwelle 21 so verbunden, dass das Filtrat, nachdem es durch die Filteroberfläche und das Filtermedium hindurchgetreten ist, welches jedes Filterelement bedeckt, in die Mittelsäule fliesst und anschliessend dort abgesaugt und über eine Leitung 23 und ein Klarlaufventil 8 zum Klartank ausgebracht wird. Die Filterelemente sind mit einem Metalltressengewebe bespannt. Die Filterelemente stellen im Prinzip eine hohle Lade dar, die mit der Hohlwelle 21 in Verbindung steht. Das Filterhilfsmittel und die gefüllten Globuline werden zwischen den Filtrationszyklen durch zentrifugales Abschleudern von den Filterelementen entfernt und mit 1% NaCl-Lösung nachgewaschen, so dass der Filter dann wieder vorbereitet ist für den nächsten Zyklus.

Die ungefilterte Ausgangslösung wird in einem Trübtank 24 unter ständigem Rühren mittels Rührwerk 3 in Suspension gehalten. Mittels einer Pumpe 2 wird die Ausgangssubstanz über das Trübzulauf-Ventil 10 über zwei Einlaufventile 11, 12 in den Filterkessel 20 eingebracht. Der Kessel kann über ein Druckluft-Ventil 5 mit Druckluft beaufschlagt werden.

Zunächst werden die Filterelemente mit in aqua dest. aufgeschwemmten Filterhilfsmittel in einer Aufschwemmung von 1 kp «Celite» 545 (Warenzeichen für ein Kieselgur-Filterhilfsmittel) in 500 Liter Wasser mit einer Primäran Schwemmung von etwa 0,2 cm Dicke bei Atmosphärendruck belegt. Anschliessend werden 500 Liter albuminhaltige Suspension mit 25 kp «Celite» 545 versetzt und verrührt. Die Mischung wird vom Trübtank in den Filterkessel gegeben und bei einem Überdruck von 2 bar durch die Filterflächen der Elemente 22 gedrückt. Vor dem eigentlichen Abfüllen der gefilterten Flüssigkeit zum Klartank wird im sogenannten Kreislaufverfahren über Kreislaufventil 6 und Pumpe 2 immer wieder die Substanz durch die Filterelemente hindurchgeschickt, bis am Schauglas 25 das Filtrat hinreichend klar erscheint. Anschliessend wird das Filtrat über das Ventil 8 zum Klartank abgefüllt.

Sobald die gereinigte, albuminhaltige Lösung das Filter verlässt, wird eine 1%ige wässrige Kochsalz-Lösung gleichzeitig durch den Filter gepumpt. Die Menge dieser Lösung ist etwa gleich dem Volumen der halben Einsatzmenge.

Die Durchflussmenge beträgt etwa 150 Liter pro Stunde. Die Proteinkonzentration des Filtrats am Anfang des Prozesses beträgt etwa 2,5%, während die Endkonzentration ungefähr 0,05% beträgt. Die sich ergebende Lösung ist klar mit einer Proteinkonzentration von ungefähr 1,5% Albumin und einer Osmolalität von etwa 1000 mosm.

Das klare Filtrat wird anschliessend diagefiltert unter Verwendung eines «Millipore Pellicon» Kassetten-Systems (Filteroberfläche etwa 0,9 m², Hersteller: Millipore GmbH Neu-Isenburg, Deutschland) bis eine 25%-Protein-Lösung mit einer Osmolalität zwischen 100–200 mosm erreicht ist. Die Durchflussrate bei Beginn des Verfahrens beträgt 5–6 Liter Filtrat pro Minute. Diafiltration ist eine Filtration durch eine Dialyse-Membran.

Die Filterreinigung erfolgt durch Rotation der Filterelemente mit Hilfe des Antriebsmotors 1 und Austragen des Slurry über das Austragsventil 9. Über das Ventil 4 kann die ausgetragene Substanz nochmals aufgeschwemmt und filtriert werden.

Die Flüssigkeit weist schon nach Durchgang durch den ersten Filter keinen Tyndall-Effekt mehr auf und ist wasserklar. Die Flüssigkeit ist praktisch frei von Begleitsubstanzen, wie Lipiden oder Fremdeiweissen. Sie kann auch unmittelbar der Albuminanreicherung und dem beschriebenen nachfolgenden Filtrationsprozess zugeführt werden. Die Albuminanreicherung ist an sich bekannt und in der DE-OS 2 415 079 beschrieben.

Im Prinzip werden folgende Schritte insgesamt durchgeführt:

Plasma, 600 kg
enthält: 33,6 kg Protein, davon 18,48 kg Albumin (= 55%)

1. + 9% Äthanol
+ 0,004 M Natrium-Caprylat
+ HCl (auf pH-Wert 6,5)
2. Hitzefällung: 30 Minuten, 68 Grad Celsius
3. + HCl pH-Wert 4,4
4. Schwemmfiltrierung

Filtrat

5. Diafiltration (Konzentration und Dialyse)
6. + NaOH pH-Wert 7,0
7. Klarfiltration

Albumin-Lösung mit 17,2 kg Albumin (Wirkungsgrad 93%).

Beispiel 2

Aus einem Placenta-Extrakt wird zunächst mit Lösungsmitteln, wie z.B. Trichlor-Essigsäure, Chloroform, Diäthyläther, das vorhandene Hämoglobin entfernt. Anschliessend wird der eiweisshaltige Überstand bei pH-Wert 6,5 auf 68°C erhitzt. Nach Abkühlung und Einstellen des pH-Wertes von 4,4 durch Zufügen von 0,5 n-HCl werden 100 Liter der erhaltenen Flüssigkeit mit 3 kg Filterhilfsmittel versetzt und verrührt (Filterhilfsmittel: «Hyflo-Super-Cel»; Warenzeichen für ein Kieselgur-Filterhilfsmittel).

Bei einer Temperatur von 18°C und einem Druck von 4 bar wird die Flüssigkeit durch ein bereits beschriebenes Anschwemm-Filter mit 70 µ Maschenweite gedrückt. Es wird demnach ohne Primäranschwemmung gearbeitet. Die Flüssigkeit wird im Kreislauf solange geführt, bis sie am Schauglas wasserklar und frei vom Tyndall-Effekt erscheint. Anschliessend wird durch bekannte Verfahren das in der Flüssigkeit befindliche Albumin in die gewünschte Konzentration gebracht.

Nach Durchsatz der Gesamtflüssigkeit wird das sich im Anschwemm-Filter befindliche Trubvolumen mit aqua dest. oder 0,9%iger NaCl-Lösung nachgewaschen. Auch die hierbei gewonnene Flüssigkeit ist wasserklar und enthält noch etwa 0,5–20% Albumin. Sie kann ebenfalls unmittelbar

der Albumin-Konzentration zugeführt werden, wie sie z.B. in der DE-OS 2 415 079 erläutert ist.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Schwemmfiltrierung sowohl mit als auch ohne Primäranschwemmung durchgeführt werden kann. Die Abreinigung der Filterelemente erfolgt durch Rotation und Gegenspülung, wobei die Filterelemente in Drehung gebracht und die Rückstände als Slurry ausgetragen werden.

Bei Anwendung genügender Waschflüssigkeit (aqua dest. oder NaCl-Lösung) kann eine Ausbeuteerhöhung bis auf etwa 96% der eingesetzten Albuminmenge erreicht werden. Die bei anderen Separationsverfahren, wie z.B. der Zentrifugiertechnik, insbesondere bei der Elution der erstmals abgeschiedenen Eiweissstoffe erhaltenen Trubstoffmengen – verursacht durch Änderung des Dichteverhältnisses Lösungsmittel: Feststoff und feinste mechanische Verteilung – werden durch eine Restvolumenfiltration vermieden, nachdem entweder eine Abreinigung durch Rotation und Gegenspülung oder eine im Kreislaufverfahren erfolgte Klärung des Filterapparatvolumens stattgefunden hat. Eine Filtration vor der Weiterverarbeitung der verdünnten Albuminlösung kann wegen der grossen Reinheit unterbleiben.

Die Abtrennung der Feststoffe ist temperaturunabhängig. Die Filtrationsgeschwindigkeit ändert sich mit zu- oder abnehmender Temperatur nur geringfügig und kann vernachlässigt werden. Üblicherweise wird das auf pH-Wert 4,4 angesäuerte, hitzebehandelte Plasma bei Zimmertemperatur in einem mittels Aussenmantel kühlbaren Zentrifugal-Reinigungsfilter zur Abtrennung gebracht. Das Filtrierverfahren kann auch bei anderen Temperaturen stattfinden. Die Erfahrungen haben ergeben, dass ein Temperaturbereich von 4 bis 40°C als Arbeitsbereich möglich ist. Der Filtrationsdruck lässt sich nach der fast drucklos erfolgenden Primäranschwemmung auf $4,0 \pm 2,5$ bar erhöhen. Die daraus resultierende Filtrationsleistung beträgt ca. 150 Liter Filtrat/m²/h. Als Filterhilfsmittel erweist sich besonders Kieselgur, wie eingangs genannt, geeignet.

Die in den Beispielen genannten Mengen sind variabel je nach Filterfassungsmenge. Es wurden sowohl Versuche in kleinen Volumina von ca. 10 l als auch in grossen Behältern von ca. 500 l erfolgreich durchgeführt.

