

(19) **DANMARK**



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) **PATENTSKRIFT**

(11) **169522 B1**

(21) Patentansøgning nr.: **4057/84**

(51) Int.Cl.5

C 07 K 3/18

(22) Indleveringsdag: **24 aug 1984**

(41) Alm. tilgængelig: **26 feb 1985**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **21 nov 1994**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **25 aug 1983 DE 3330648**

(73) Patenthaver: ***BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; D-W-3550 Marburg 1, DE**

(72) Opfinder: **Rudolf *Schmidtberger; DE**

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Co. A/S**

(54) **Fremgangsmåde til fraskillelse af lipoproteiner fra en vandig væske ved binding af et polyhydroxymethylen-derivat samt anvendelse af et sådant derivat til udvinding af praktisk taget lipoproteinfrigt blodplasma eller blodserum**

(56) Fremdragne publikationer

DE freml. skrift nr. 2421789

(57) Sammendrag:

4057-84

Fremgangsmåde til binding og fjernelse af lipoproteiner fra vandige væsker, ved hvilken lipoproteinerne bindes til polyhydroxymethylen, som indeholder en påpodet oxethyleret alkohol eller en påpodet oxethyleret carboxylsyre. Eventuelt elueres lipoproteinerne fra polyhydroxymethylenet.

Fremgangsmåden er også egnet til fremstilling af lipoproteinfrigt blodplasma eller blodserum.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fraskillelse af lipoproteiner fra en vandig væske ved binding til et polyhydroxymethylenderivat samt anvendelsen af et sådant polyhydroxymethylenderivat til
5 udvinding af praktisk taget lipoproteinfrigt blodplasma eller blodserum.

Ved klargørelsen af holdbart plasma og serum af humant eller animalsk blod til terapeutiske eller diagnostiske formål har det vist sig hensigtsmæssigt at fjerne alle labile
10 proteiner, såfremt de ikke er nødvendige til den planlagte anvendelse. Lipoproteinerne hører til de plasma- og serumbestanddele, der i særlig grad påvirker holdbarheden af ovennævnte opløsninger.

Lipoproteinerne er den vandopløselige transportform
15 for triglycerider, cholesterolestre og phospholipider i biologiske væsker. Deres vandopløselighed skyldes andele af protein, der hylsteragtigt omgiver de i sig selv vandopløselige lipider. I ekstreme tilfælde kan proteinandelen i lipoprotein andrage kun nogle få procent. Den større eller mindre
20 andel af vandopløselige lipider er også grunden til deres i sammenligning med proteiner og glycoproteiner ringe opløsningsstabilitet. Denne opløsningsstabilitet er imidlertid ved biologiske væsker, der skal anvendes både terapeutisk og diagnostisk, som f.eks. plasma eller sera, en uundgåelig
25 forudsætning for deres anvendelse. Der har derfor ikke været mangel på bestræbelser på at fjerne lipoproteinerne fra plasma eller sera uden derved at ændre de for brugeren vigtige biologiske aktiviteter. Disse ændringer kan f.eks. bestå i en formindskelse af indholdet af antistoffer i et
30 antiserum eller i en uønsket aktivering af en koaguleringsfaktor.

Ifølge teknikkens stade findes tre metoder til fjernelse af lipoproteiner fra biologiske væsker, såsom plasma eller sera.

35 Metoden med flotation af lipoproteinerne ved forøget massefylde kræver anvendelse af centrifuger med høj omdrej-

ning. Fjernelsen af samtlige lipoproteiner fra serum kræver en forøgelse af massefylden til 1,21, hvilket som regel sker ved tilsætning af kaliumbromid. Nødvendigheden af tilbageføring af ikke-lipoproteiner i et fysiologisk miljø før
5 deres terapeutiske anvendelse udgør en yderligere hindring for overførelsen af denne teknik til store mængder.

Til adsorption af lipoproteiner til selektivt bindende adsorbenter er der beskrevet en række adsorbenter, hvis fældes kendetegn er en perleformig, hydrophil grundmasse
10 på polysaccharidbasis, hvortil phenyl- eller alkylgrupper er bundet. Ulemper er uønskede vekselvirkninger med komponenter i de biologiske opløsninger, såsom fibrinogen, men også deres enzymatiske angribelighed. Til de lipoprotein-bindende adsorbenter hører også sådanne på basis af siliciumdioxid. Disse siliciumdioxid, der er tilgængelige i
15 handelen under betegnelsen "Aerosil"®, kan kun anvendes ved en omrøringsfremgangsmåde, hvor der imidlertid af sedimentet indesluttet væsker med opløste stoffer. Disse kan ganske vist genvindes ved en vaskemetode, men foreligger i en ikke-
20 -anvendelig, fortyndet form. En yderligere ulempe ved siliciumdioxid-adsorbenterne ligger i deres tydelige opløselighed ved pH-værdier på 7 og derover. Også selektiviteten er i mange tilfælde utilstrækkelig, således er det f.eks. ikke muligt at befri humant eller animalsk plasma for lipopro-
25 teinerne under opretholdelse af deres koaguleringssegenskaber.

Endvidere er det kendt, at lipoproteiner kan udfældes med polyanioner, såsom dextransulfat eller heparin. Derved skal kationer, såsom Mg^{++} eller Mn^{++} , være til stede. Derefter skal de tiloversblivende mængder af polyanioner og
30 metalioner fjernes.

Endelig kendes der fra DE-fremlæggeskrift nr. 2.421.789-B2 biologisk aktive, vanduopløselige produkter, hvori et biologisk aktivt stof er bundet til en vanduopløselig polyhydroxymethylen, enten direkte eller over en eller
35 flere bifunktionelle organiske forbindelser. Bindingen er i begge tilfælde covalent, og produktet anvendes bundet til

polyhydroxymethylenbæreren. En efterfølgende fraspaltning af det aktive stof er ikke forudset ifølge denne kendte teknik.

Derfor er det ikke muligt at befri plasma eller sera
5 af human eller animalsk oprindelse i en målestok på 100 liter for lipoproteinerne, hvis en ændring af elektrolytforholdene og pH-værdien, en fortynding af plasmaet eller serummet, faren for en indslæbning af stoffer, der fører til ufordrageligheder ved den terapeutiske anvendelse, såsom bakterielle pyrogener, og en ændring af mængdeforholdet mellem
10 i de opløsningen forblivende proteiner skal undgås. Desuden skal fremgangsmåden være anvendelig under sterile betingelser.

Det er derfor den foreliggende opfindelses opgave at
15 finde frem til en fremgangsmåde til fjernelse af lipoproteiner fra vandige væsker, der er tilstrækkelig til disse betingelser.

Overraskende nok har det vist sig, at et vanduopløseligt polyhydroxymethylenderivat, hvorpå en oxetyleret alkohol eller en oxetyleret alifatisk carboxylsyre er blevet
20 påpodet, er i stand til reversibelt at binde lipoproteiner fra vandige væsker.

Genstand for den foreliggende opfindelse er derfor en fremgangsmåde til fraskillelse af lipoproteiner fra en
25 vandig væske ved binding til et hydroxymethylenderivat, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man bringer væsken i kontakt med et polyhydroxymethylen, hvorpå der er påpodet en oxetyleret alkohol eller en oxetyleret carboxylsyre, fraskiller væsken og eventuelt eluerer lipoproteinerne
30 fra polyhydroxymethylenderivatet.

Som alkohol foretrækkes en alkanol med 4-30 carbonatomer og som carboxylsyre en alifatisk carboxylsyre med 4-20 carbonatomer.

Et sådant derivatiseret polyhydroxymethylen (PHM)
35 kan fremstilles ved hydrolyse af polyvinylencarbonat fremstillet ifølge DE-offentliggørelsesskrift nr. 2.556.759-A1.

Særligt egnet er et PHM, der fremstilles ud fra polyvinylencarbonat ifølge eksemplerne ifølge dette DE-offentliggørelsesskrift nr. 2.556.759-A1.

Ved polymerisationen anvendes 1-20, fortrinsvis 2-10
5 vægt-% af en oxetyleret alkohol eller en oxetyleret carboxylsyre. De særlige fordele ved en sådan polymer ligger i en række stofegenskaber, hvorved den adskiller sig fra andre kendte adsorbenter. Polyhydroxymethylen er en syntetisk polymer med en gennemgående kæde af CHOH-enheder, hvori
10 poly-(ethylenoxy)-alkylgrupper er indbygget over ester- eller etherbindinger, fortrinsvis etherbindinger. Slutproduktet indeholder altså kun bindingsarter, der er kendt både for en høj kemisk og termisk og en god enzymatisk stabilitet.

På grund af mangel på ionogene grupper er polyhydroxymethylen ikke i stand til uønskede ionogene vekselvirkninger.
15

De OH-grupper, der er knyttet til hvert enkelt carbonatom i polyhydroxymethylenet, sørger for en god befugtelighed af adsorbenten med vandige opløsninger, hvilket virker gunstigt på opretholdelsen af den native struktur af proteiner, hvis opløsninger bliver behandlet dermed. Polyhydroxymethylen, der er derivatiseret med oxetyleret alkohol kan under udnyttelse af dets alkalistabilitet behandles med en varm alkalimetahydroxidopløsning, hvis neutralisation kan efterfølges af en steril og pyrogenfri anvendelse. Muligheden for en sådan foranstaltning er af stor betydning i forbindelse med oparbejdningen af proteinopløsninger, der skal anvendes terapeutisk. Selv om et ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendt polyhydroxymethylenderivat såvel inden for et bredt pH-værdi-område som fra opløsninger med
20 forskellig elektrolytart og -koncentration kan binde lipoproteiner derudfra, er det en særlig fordel, at det også udviser denne egenskab ved anvendelse på plasma og sera ved fysiologiske salt- og pH-værdi-forhold. Derved overflødiggøres en forudgående ændring af reaktionsbetingelserne og
30 deres tilbageføring efter adsorptionstrinnet.

Bindingen af lipoproteinerne kan ske ved en omrørings-

fremgangsmåde eller ved hjælp af søjleteknik.

Polyhydroxymethylen kan anvendes i hydratiseret eller lyophiliseret form. I sidstnævnte tilfælde er givet muligheden for gennem presning af give adsorbenten en bestemt
5 form. Hensigtsmæssigt udvindes polyvinylencarbonatet, hvorudfra PHM fremstilles ved hjælp af hydrolyse, ifølge DE-offentliggørelsesskrift nr.3.243.591 ved polymerisation i nærværelse af dispergeringsmidler. Ved at udfælde det derivatiserede polyhydroxymethylen fra en alkalisk opløsning
10 er der mulighed for at foretage udfældningen i nærværelse af finkelte partikler. Disse indesluttet af det udfældede polyhydroxymethylen og kan således give co-udfældningen egenskaber, der gør den efterfølgende anvendelse lettere, eller i det hele taget muliggør den. Således kan indeslut-

15 ningen af magnetitpartikler bevirke en magnetisk påvirkelighed. Ved anvendelse af kiselgur er det f.eks. muligt at forbedre strømmeegenskaberne af polyhydroxymethylen-søjlefyldninger. Indesluttede carbonpartikler kan give yderligere adsorptionseffekter.

20 Hvis de lipoproteiner, der er bundet til polyhydroxymethylenet, skal udvindes, kan anvendes alle midler til eluering, der er kendt til dissociation af hydrophobe bindinger.

Opfindelsen angår endvidere anvendelsen af et polyhydroxymethylenderivat, der indeholder en påpodet, oxethylet alkohol eller en påpodet, oxethylet carboxylsyre, til
25 udvinding af praktisk taget lipoprotein frit blodplasma eller blodserum.

Det følgende eksempel forklarer den foreliggende
30 opfindelse.

EKSEMPEL 1

200 g polyvinylencarbonat der er påpodet en oxethylet alkohol eller en oxethylet carboxylsyre, fremstillet
35 ifølge DE-offentliggørelsesskrift nr. 2.556.759-A1, suspenderes i en VA-stålbekholder i 3000 ml 5N NaOH. Suspensionen

opvarmes under omrøring i 30 minutter til 90°C. Derved går polymeren fuldstændig i opløsning. Den endnu varme opløsning fortyndes derefter under omrøring med 40 liter vand. Derved udskilles det vanduopløselige polyhydroxymethylenderivat
5 som et amorft bundfald. Til fremskyndelse af denne udfældning sættes 400 g fast NaCl til suspensionen. Efter tre timer fjernes størstedelen af den væske, der står over bundfaldet, med en hævert. Den i beholderen resterende del af blandingen blandes under omrøring med 10 M HCl, indtil suspensionen
10 har opnået en pH-værdi på 12. Faststoffet og væsken adskilles ved filtrering, og filterremanensen vaskes fri for den resterende opløsning med 0,15 M NaCl-opløsning. Det således opnåede produkt udrøres med 0,15 M NaCl-opløsning til en suspension, hvis pH-værdi indstilles på 7,5 med 1 M HCl, og
15 suspensionen fyldes op til 3 liter.

I denne suspension af polyhydroxymethylenderivatet opløses 11 g tri-natriumcitrat under omrøring. Derefter pakkes en chromatografisøjle med en diameter på 19 cm med denne suspension. 1,4 liter humanplasma, udvundet med citrat-
20 ioner som kompleksdanner, blandes med 27 µg hepatitis B-s-antigen og får lov til at løbe over søjlen.

De mest proteinrige fraktioner af søjlegennemstrømningen kombineres, de har et samlet volumen på 1,6 liter og indeholder 89% af proteinerne i udgangsplasmaet.

25 I det således behandlede plasma kan der ved de kendte metoder hverken påvises kolesterol (CHOD-PAP-metode) eller Apo-B-protein (turbidimetrisk immunreaktion) eller HBsAg (ELISA-teknik).

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fraskillelse af lipoproteiner fra en vandig væske ved binding til et polyhydroxymethylen-derivat, k e n d e t e g n e t ved, at bindingen til poly-
5 hydroxymethylenderivatet sker reversibelt, ved at man bringer væsken i kontakt med et polyhydroxymethylenderivat, hvorpå der er påpodet en oxetyleret alkohol eller en oxetyleret carboxylsyre, fraskiller væsken og eventuelt eluerer lipoproteinerne fra polyhydroxymethylenderivatet.
- 10 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at alkoholen er en alkanol med 4-30 carbonatomer, eller at carboxylsyren er en alifatisk carboxylyre med 4-20 carbonatomer.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at væsken er blodplasma eller blodserum.
- 15 4. Anvendelse af et polyhydroxymethylenderivat, der indeholder en påpodet, oxetyleret alkohol eller en påpodet, oxetyleret carboxylsyre, til udvinding af praktisk taget lipoproteinfrigt blodplasma eller blodserum.