DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **241 789 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **G 01 N 33/564**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 281 793 1 (22) 16.10.85 (44) 24.12.86

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, 1080 Berlin, Unter den Linden 6, DD
(72) Hiepe, Falk, Dr. med., DD; Schößler, Werner, Dr. rer. nat., DD; Apostoloff, Emil, Prof. Dr. sc. med., BG; Precht, Klaus, Prof. Dr. sc. med., DD; Becker, Manfred, Dr. rer. nat., DD

(54) Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen

(57) Die Erfindung beschreibt ein Adsorbens für die selektive Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten durch biospezifische Bindung derselben an das Protein C1q, das an zellulosehaltige feste Phasen über eine Brückenverbindung immobilisiert ist, wobei die so gebundenen Immunkomplexe durch Abtrennung der festen Phase separiert werden und die feste Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien regeneriert wird.

ISSN 0433-6461

9 Seiten

Titel der Erfindung

Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Adsorbens für die selektive Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten unter wiederholtem und reproduzierbarem Einsatz eines beschichteten Trägers. Das Adsorbens ist anwendbar in der pharmazeutischen Industrie sowie der Medizin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es gilt als gesichert, daß den in Körperflüssigkeiten, z. B. im Blut, zirkulierenden Antigen-Antikörper-Komplexen (Immunkomplexen) eine wesentliche pathogenetische Bedeutung bei einer Vielzahl von Erkrankungen (u. a. Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes visceralis und Rheumatoid-Arthritis, Transplantatabstoßung, Infektionen, möglicherweise auch bei Neoplasien) zukommt. Zirkulierende Immunkomplexe können sich an den Gefäßwänden ablagern und über verschiedene Wirkungsmechanismen entzündliche Reaktionen in den jeweils disponierten Organen mit den entsprechenden Symptomen (u. a. Vasculitis, Arthritis, Nephritis, Serositis, Karditis, Cerebritis, Anämie, Leukopenie, Thrombopenie) induzieren. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen korreliert die Immunkomplexkonzentration im Serum/Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten mit der Aktivität der Erkrankung. Deshalb erscheint es sinnvoll, den Pathomechanismus dieser Erkrankungen durch Entfernung zirkulierender Immun-

komplexe aus den Körperflüssigkeiten zu beeinflussen, um dadurch das Fortschreiten der oben erwähnten Erkrankungen und unerwünschte Immunreaktionen zu verhindern, die Krankheitsaktivität zu mindern, die damit verbundenen Symptome zu lindern bzw. zu beseitigen. Die Erfolge der Plasmapharesebehandlung werden u. a. auf die Beseitigung bzw. Reduzierung der pathogenetisch bedeutsamen Immunkomplexe zurückgeführt [vgl. E. Apostoloff et al., Dt. Gesundheitsw. 34, 64 (1979); H. F. Parry et al., Ann. Rheum. Dis. 40, 224 - 228 (1981); T. Sharon et al., Plasma Ther. Transfus. Technol. 3, 163 - 169 (1982); M. Valbonesi et al., Int. J. Art. Organs 4, 234 - 236 (1981); J. V. Jones et al., Arthritis Rheum. 24, 1113 - 1120 (1981)].

Nachteile dieser Methode sind das nicht selektive Entfernen aller Plasmabestandteile und die dadurch erforderliche Zuführung größerer Mengen Fremdplasma oder Humanalbumin, die auch aus Kapazitäts- und ökonomischen Gründen limitierend sein können. Aus den genannten Gründen existieren seit einigen Jahren Bemühungen um die Entwicklung von Adsorbentien, die eine selektive Entfernung zirkulierender Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten erlauben. Hierbei wurden im wesentlichen folgende Wege beschritten.

- Staphylokokken-Protein A, an einen unlöslichen Träger fixiert (fixierte Staphylokokken, Protein A-Sepharose) [vgl. D. S. Torman et al., J. Immunol. 124, 798 (1980); New England J. Med. 305, 1195); E. Behm u. H. Klinkmann, in Plasma Separation and Plasma Fractionation, S. 254 - 265 (Karger, Basel 1983)]
- Poröses Harz vom Akrylsäureester-Typ [z. B. XAD-7, geliefert von Rohm und Hass Co., USA; vgl. T. Agishi, Zinko Zoki, 9, 264 (1980)]
- Kationenaustauschglied wie Carboxymethylcellulose [vgl. L. D. Johnson et al., Can. J. Biochem. 42, 795 (1964)]

- Adsorbens, enthaltend eine Oberfläche und mit der Oberfläche verbunden wenigstens ein hydrophobes Glied mit 6 - 700 Kohlenstoff-Atomen und wenigstens eine negative Ladung erzeugendes Glied [T. Kuroda et al., japanisches Patent J. P. P58-59199, P58-59197]

Diese Adsorbentien haben jedoch verschiedene Nachteile, Protein A ist in der Lage, Immunkomplexe zu binden; jedoch nicht ausreichend selektiv, denn es bindet ebenfalls nicht immunkomplexgebundenes IgG. Außerdem ist Protein A ein Fremdprotein mit den ihm anhaftenden Nachteilen beim Einsatz des Adsorbens, wenn es in Berührung mit den Körperflüssigkeiten gehalten wird. Die Herstellungskosten für Protein A sind sehr hoch. Die Verwendung inaktivierter Staphylokokken als "natürlichen" Träger des Protein A ermöglicht den Einsatz des Protein A ohne seine weitere Reinigung, bringt aber zusätzlich Probleme bei Berührung der Körperflüssigkeit mit den inaktivierten Bakterien (z. B. Freisetzen von Pyrogenen) mit sich. Weiterhin sollen Protein-A-Träger das Komplementsystem aktivieren. Das poröse Harz vom Acrylsäureester-Typ und Carboxymethylcellulose besitzen nur ungenügendes Adsorptionsvermögen und unzureichende Adsorptionsspezifität (u. a. wird Albumin aus Körperflüssigkeit absorbiert). Das aus einem hydrophoben und einem eine negative Ladung enthaltenden Glied bestehende Adsorbens ist ebenfalls für die Adsorption von Immunkomplexen nicht ausreichend spezifisch.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, zirkulierende Immunkomplexe selektiv, einfach und schonend aus Körperflüssigkeiten unter Nutzung sterilisierbarer Träger zu entfernen. Die Träger sollen sich einfach, schnell und reproduzierbar zwecks Wiederverwendung regenerieren lassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, zirkulierende Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten an eine feste Phase (Träger) biospezifisch

zu binden, wobei die feste Phase wiederverwendbar sein soll. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß das Protein C1q - eine Untereinheit der ersten Komplementkomponente - an zellulosehaltige Materialien, vorzugsweise Perlzellulose oder flächenförmige Zelluloseträger, über eine Brückenverbindung kovalent gebunden wird und dieses trägergebundene C1q zur Bindung und Entfernung der zirkulierenden Immunkomplexe eingesetzt wird, wobei die an das C1q gebundenen Immunkomplexe aus den Körperflüssigkeiten durch Abtrennung der festen Phase separiert werden und die feste Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien funktionell regeneriert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß das im menschlichen und tierischen Blut vorkommende und für die Bindung von Immunkomplexen und deren physiologische Eliminierung verantwortliche Protein C1q an einen geeigneten zellulosehaltigen Träger mit hinreichend großer Oberfläche und Porosität auf an sich bekannte vorherige chemische Oberflächenmodifizierung des Trägers, vorzugsweise durch Chlorameisensäureester, CNBr, Cyanurchlorid, Carbodiimiden (Übersicht: M. D. Lilly: Methods in Enzymology 44, (1976), 46) gebunden wird und dieses trägergebundene C1q für die in vivo- und in vitro-Entfernung der zirkulierenden Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten eingesetzt wird und danach die so gebundenen Immunkomplexe durch nicht denaturierende Medien wieder abgespalten werden, so daß der mit C1q beladene Träger erneut eingesetzt werden kann.

Der als feste Phase dienende Träger hat eine unterschiedliche geometrische Form, wobei kugelförmige oder flächenförmige vernetzte Träger mit oder ohne Zusätzen besonders geeignet sind. Das zellulosehaltige Material ist im wesentlichen Perlzellulose, wobei deren Partikelgröße, Zusammensetzung, Struktur und Porosität unterschiedlich sein kann. Besonders vorteilhaft sind Partikelgrößen zwischen 100 - 400 /um und Porenweiten >500 A. Die maximale Porenweite beträgt ca. 100 /um, wobei mit zunehmender Porenweite die zur Verfügung stehende Fläche und damit die Kapazität des Trägers immer kleiner wird.

Die nicht denaturierenden Medien für die Abspaltung der gebundenen Immunkomplexe setzen sich aus gepufferten Lösungen hoher Ionenstärke zusammen, wobei insbesondere 0,5 - 3 m NaCl-Lösungen geeignet sind.

Die Oberflächenmodifizierung der Zellulose zum Zwecke der Schaffung von Bedingungen für das Eingehen kovalenter Bindungen mit dem Protein C1q erfolgt auf an sich bekannte Art und Weise vorzugsweise durch Chlorameisensäureester, kann aber auch durch andere bekannte Modifizierungsverfahren wie CNBr, Cyanurchlorid, Carbodiimide, Glutaraldehyd erfolgen. Der erfindungsgemäße C1q-Träger ist chemisch stabil, mikrobiell schwer angreifbar und sterilisierbar. Dadurch ist die Wiederverwendbarkeit gewährleistet. Der so mit dem Protein C1q beladene Zelluloseträger wird dann zur Bindung und Entfernung der zirkulierenden Immunkomplexe eingesetzt, wobei der Träger sowohl im Durchflußverfahren in üblicher Weise (Hämoperfusion, Plasmaperfusion) als auch im Batch-Verfahren (bei der Isolierung von Immunkomplexen für in vitro-Untersuchungen) genutzt werden kann. Nach Ablauf der Reaktion und Entfernung des Trägers von den zu behandelnden Körperflüssigkeiten werden die gebundenen Immunkomplexe durch nicht denaturierende Medien wie 1 M NaCl-Lösung abgespalten, so daß das kovalent gebundene C1q für einen erneuten Einsatz zur Verfügung steht.

Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt die physiologische Funktion des Proteins C1q für die selektive und schonende Bindung und damit Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten.

Ausführungsbeispiel

Im folgenden wird die Erfindung durch 2 Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:

Die mit Chlorameisensäureestern aktivierte Perlzellulose (Aktivierungsgrad 63 µmol/ml) wird zunächst stufenweise in das wäßrige Milieu überführt, da die Perlzellulose mit Dioxan ver-

setzt ist. Hierzu wird der Träger mit einem hinreichend großen Überschuß (50 ml Waschlösung/ml Träger) Dioxan-Wasser-Gemischen folgender Abstufungen unter Rühren gewaschen: 90/10; 70/30; 10/90; 0/100. Die Gesamtdauer des Waschprozesses sollte nicht länger als 10 - 15 Minuten betragen, um Hydrolyseverluste an aktiven Gruppen zu vermeiden. Danach wird der Träger mit C1q (1 mg/ml) in PBS-Puffer, pH 7,4, 10 mM EDTA enthaltend, versetzt und 4 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bestimmung des gebundenen C1q erfolgt durch Differenzmessung der Ausgangslösung bzw. des Überstands nach vorheriger Dialyse bei 280 nm ($E^{280}_{1\%}$ = 6,8) oder mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion. Abschließend wird der Träger mit 1 m Äthanolaminlösung in PBS-Puffer, pH 7,4, versetzt, um eventuell noch freie reaktive Gruppen abzublocken. Schließlich wird der Träger mit einem 0,01 m Phosphat-Puffer, pH 7,4, der 0,05 m NaCl enthält, gewaschen.

Dieses trägergebundene C1q wird nunmehr zur Bindung der Immunkomplexe eingesetzt. Hierzu wird die mit C1q beladene Perlzellulose mit einem Patientenserum, das erhöhte Konzentrationen zirkulierender Immunkomplexe enthält (Patient mit Lupus erythematodes visceralis), im Batch-Verfahren versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Trägers durch Dekantieren oder Zentrifugieren wird dieser im folgenden mit 0,01 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, 0,05 M NaCl, gewaschen und anschließend mit 2 M NaCl in PBS-Puffer, pH 7,4, regeneriert. Die Bestimmung der Immunkomplexe erfolgte mit einem C1q-Festphasen-Enzymimmunoassay. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindungen an den Träger wurde die Eiweißkonzentration im spezifischen Eluat nach Lowry bestimmt sowie eine Immunelektrophorese durchgeführt.

Eine mögliche Aktivierung des Komplementsystems wurde durch quantitative Bestimmung der Komplementkomponenten C1q und C3 verfolgt.

Tabelle 1 zeigt ein charakteristisches Ergebnis einer derartigen Behandlung.

Tabelle 1

	zirkulierende Immunkomplexe (µg/ml Äquivalente aggr. IgG)	(%)
Patientenserum		
vor der Behandlung	90	100
nach der Behandlung	62	69

Eine Aktivierung des Komplementsystems konnte nicht nachgewiesen werden.

Beispiel 2:
An aktivierte Perlzellulose wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, humanes C1q gebunden. Diese Matrix wird in eine Chromatographiesäule (Ø 4 mm) gefüllt und mit einem 0,01 M Phosphat-Puffer pH 7,4, 0,05 M NaCl, gespült. Anschließend wird 1 ml Serum eines Patienten mit erhöhtem Immunkomplexspiegel aufgetragen und mit o. g. Puffer eluiert (Durchfluß 10 ml/h). Die Abspaltung der spezifisch gebundenen Immunkomplexe und die hiermit verbundene Regenerierung der Matrix erfolgt, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit 2 M NaCl-Lösung in PBS-Puffer, pH 7,4. Die Eiweißkonzentration wurde kontinuierlich mit einem UV-Durchflußphotometer verfolgt. Die Ergebnisse entsprachen den in Beispiel 1 dargestellten Resultaten.

Erfindungsanspruch

1. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten auf der Grundlage biospezifischer Wechselwirkungen an feste Phasen, gekennzeichnet dadurch, daß als feste Phase zellulosehaltige Materialien verwendet werden, die über eine Brückenverbindung das Protein C1q kovalent gebunden enthalten und daß nach Bindung der Immunkomplexe an das C1q der festen Phase durch Behandlung mit der Körperflüssigkeit und Abtrennung der festen Phase eine Regenerierung der festen Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien und Wiederverwendung derselben erfolgt.

2. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die eingesetzten zellulosehaltigen Materialien aus sphärischen oder faserförmigen Formkörpern bestehen.

3. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Formkörper durch Packung, Verweben oder durch Bindemittel zu vorzugsweise flächenförmigen Materialien oder Kolonnenpackungen zusammengestellt sind.

4. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten nach Punkt 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß das eingesetzte zellulosehaltige Material Perlzellulose ist, deren Partikelgröße 10 - 500 µm beträgt und deren Porosität >100 A ist.

5. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten nach Punkt 1 - 4, gekennzeichnet dadurch, daß als Brückenverbindung Chlorameisensäureester, CNBr, Carbodiimide, Glutaraldehyd u. ä. eingesetzt werden.

6. Selektives Adsorbens zur Bindung und Entfernung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten nach Punkt 1 - 5, gekennzeichnet dadurch, daß die nicht denaturierenden Medien gepufferte Lösungen hoher Ionenstärke sind.