CH 640 267 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.[3]: C 12 N 9/12

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

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 640 267

(21) Gesuchsnummer: 1437/79

(22) Anmeldungsdatum: 14.02.1979

(30) Priorität(en): 15.02.1978 US 878001

(24) Patent erteilt: 30.12.1983

(45) Patentschrift veröffentlicht: 30.12.1983

(73) Inhaber:
E.I. Du Pont de Nemours & Company, Wilmington/DE (US)

(72) Erfinder:
John Arthur Buege, Newark/DE (US)
Michael Edwin Hickey, Newark/DE (US)
Gopal Singh Rautela, Newark/DE (US)

(74) Vertreter:
R. A. Maspoli, R. Siebert, Patentanwälte, Zürich

(54) Verfahren zur Abtrennung der Isoenzyme von Kreatinkinase aus einem Gemisch davon und Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens.

(57) Zur Abtrennung der Isoenzyme von Kreaktinkinase aus einem Gemisch der Isoenzyme wird das Gemisch mit einem Bett gemischter Harze in Kontakt gebracht, worauf anschliessend zuerst das MB-Kreatinkinaseisoenzym eluiert wird.

Das in der Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens vorliegende Harzgemisch enthält Kationenaustauscherharze zu Anionenaustauscherharze im Volumen-Verhältnis von 5:1 bis 10:1.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Abtrennung der Isoenzyme von Kreatinkinase aus einem Gemisch der Isoenzyme durch Kontakt des Gemischs mit einem Ionenaustauscherharz und selektives Eluieren der Isoenzyme von dem Harz, dadurch gekennzeichnet, dass man das Gemisch mit einem Bett gemischter Harze in Kontakt bringt und zuerst das MB-Kreatinkinase-isoenzym eluiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Bett aus gemischten Harzen ein Gemisch eines schwach basischen Anionenaustauscherharzes und eines schwach sauren Ketionenaustauscherharzes einsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Anionenaustauscherharz ein Diäthylaminoäthyl-substituiertes quervernetztes Dextran und als Kationenaustauscherharz ein Acrylpolymergitter, das durch eine saure funktionelle Gruppe substituiert ist, einsetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Verhältnis von Kationenaustauscherharz zu Anionenaustauscherharz von 5:1 bis 10:1 einsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Verhältnis von Kationenaustauscherharz zu Anionenaustauscherharz von etwa 6:1 einsetzt.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man das Bett aus dem gemischten Harz auf einen pH-Wert von 6,0 bis 6,4 puffert.

7. Vorrichtung zur Ausführung des Verfahrens gemäss Patentanspruch 1, gekennzeichnet durch ein Bett gemischter Harze in einem Behälter.

8. Vorrichtung gemäss Patentanspruch 7, in dem das Harzgemisch in einer Pufferlösung in eine Säule gepackt ist.

9. Vorrichtung gemäss Patentanspruch 8, in dem das Bett aus gemischtem Harz ein Gemisch aus einem Diäthylaminoäthylsubstituierten quervernetzten Dextran-Anionenaustauscherharz und einem Kationenaustauscherharz mit einem Acrylpolymergitter, substituiert durch eine saure funktionelle Gruppe ist. worin das Valumen-Verhältnis von Kationenaustauscherharz zu Anionenaustauscherharz 5:1 bis 10:1 beträgt.

10. Vorrichtung gemäss Patentanspruch 9, in dem das Volumen-Verhältnis von Kationenaustauscherharz zu Anionenaustauscherharz etwa 6:1 beträgt und der pH-Wert des Puffers 6,0 bis 6,4 beträgt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtrennung der Isoenzyme von Kreatinkinase aus einem Gemisch dieser Isoenzyme. Kreatinkinase, die in manchen Literaturstellen auch als Kreatinphosphokinase bezeichnet wird, wird abgekürzt zu CK. Es gibt drei bekannte CK-Isoenzyme, wobei das MM vorwiegend in dem Skelettmuskelgewebe, das BB vorwiegend im Gewebe des Gehirns und das MB vorwiegend im Herzgewebe gefunden werden. Die Anwesenheit erhöhter CK-MB Gehalte im Serum zeigt einen Myocardinfarkt an.

Es gibt verschiedene Methoden zur Trennung der CK-Isoenzyme, einschliesslich der Elektrophoresen, wie sie in American Journal of Cardiology 33, Seite 650 (1974) beschrieben werden und der Ionenaustauscher-Chromatographie, die in Clinical Chemistry 20, Seite 36 (1974) beschrieben wird. Einige Forscher haben die Anwendung eines handelsüblichen Anionenaustauscherharzes mit Diäthylaminoäthyl-Substituenten. DEAE Sephadex, für die Trennung durch Ionenaustauscher-Chromatographie vorgeschlagen; Clin. Chem. Acta, 38, Seiten 285-90 (1972); Clin. Chem. 21, Seite 1088 (1975). Andere haben empfohlen, diese Verfahrenweise zu modifizieren durch Anwendung von DEAE Cellulose, Clin. Chem. 21, Seite 392 (1975), DEAE Glasperlen, Clin. Chem. 21, Seite 844, (1975) und eines anderen handelsüblichen Harzes, eines starken Anionenaustauschers, dem Handelsprodukt AG MP-1 der Bio-Rad Laboratories, Clin. Chem. 22, Seite 92 (1976). Bei allen diesen chromatographischen Verfahren handelt es sich bei dem zuerst zu eluierenden Isoenzym um das allgemein vorwiegende CK-MM. Bei diesem handelt es sich gewöhnlich nicht um das Isoenzym, an dem das Hauptinteresse besteht. So erfordern diese Methoden einen zusätzlichen Zeitaufwand und eine zusätzliche Stufe zur Isolierung des CK-MB.

Durch die Erfindung wird ein Verfahren zum Eluieren von CK-MB als erste Fraktion aus einem Ionenaustauscherharzbett bereitgestellt, wodurch die Analyse beschleunigt und vereinfacht wird und die CK-MB-Analyse leichter automatisiert werden kann.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Abtrennung der Isoenzyme von Kreatinkinase aus einem Gemisch der Isoenzyme ist im vorangehenden Patentanspruch 1 charakterisiert.

Es ist ersichtlich, dass die Wahl eines Harzgemisches sowie der verschiedenen Elutionsparameter, wie dem pH-Wert, der Grösse des Harzbetts und der Probe, der Elutionsgeschwindigkeit und dergleichen miteinander in Beziehung stehen. In der folgenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen werden spezielle Harze und Bedingungen aufgeführt. Bei diesen Parametern handelt es sich um bevorzugte Parameter, jedoch werden hierdurch nicht andere Kombinationen von Harzen oder Harzgemischen und Elutionsparametern aus dem Rahmen der vorliegenden Erfindung ausgeschlossen. Ist einmal ein spezielles gemischtes Harzbett gewählt, so kann die Bestimmung der optimalen Elutionsparameter leicht vom Fachmann vorgenommen werden.

Das erfindungsgemäss bevorzugte Bett aus gemischtem Harz stellt ein Gemisch aus einem DEAE-substituierten quervernetzten Dextran-Anionenaustauscherharz und einem Kationenaustauscherharz dar, in dem ein Acrylpolymergitter mit einer sauren funktionellen Gruppe substituiert ist. Derartige Harze sind im Handel erhältlich, wobei das Anionenaustauscherharz unter dem Namen DEAE «Sephadex» A-25 und das Kationenaustauscherharz unter dem Namen «Bio-rex 70» vertrieben werden. Bevorzugt ist ein Verhältnis von 5 bis 10 abgesetzten Bettvolumina des Kationenaustauscherharzes pro abgesetztes Bettvolumen des Anionenaustauscherharzes, wobei ein Volumenverhältnis von etwa 6:1 besonders bevorzugt ist.

Präparatsätze bzw. Kits, die die vorstehenden Harzgemische enthalten, insbesondere Kits, in denen das Harz in Säulen gepackt bzw. gefüllt ist, werden ebenfalls von der Erfindung umfasst. Bei der Anwendung werden die erfindungsgemässen gemischten Harze im allgemeinen in einen Puffer eingetaucht. Der bevorzugte pH-Wertbereich für die bevorzugten erfindungsgemässen Harze liegt bei etwa 6,0 bis etwa 6,4. Am unteren Ende dieses Bereiches werden CK-MM und CK-BB leichter durch das Harz zurückgehalten. Am oberen Ende des pH-Wertbereiches wird CK-MB leichter eluiert, jedoch tritt auch eine gewisse Elution von CK-BB auf. Erhöhte Ausbeuten an CK-MB und CK-BB erhält man aus der Säule, wenn die Grösse der Probe erhöht wird.

Bei der bestmöglichen Durchführungsform für die Erfindung wird das gemischte Harzbett wie folgt hergestellt. DEAE-Sephadex A-25 wird in einem Puffer, vorzugsweise Morpholinäthylsulfonsäure, eingestellt auf den pH-Wert 6,0, während 48 Stunden hydratisiert. Am Ende dieses Zeitraums wird der pH-Wert mit HCl wieder auf 6,0 eingestellt. Bio-Rex 70 (Korngrösse 0,149-0,074 mm bzw. 100-200 mesh) wird in dem gleichen Puffer vom pH-Wert 6,0 während des

gleichen Zeitraums hydratisiert, worauf der pH-Wert erneut mit Natriumhydroxid auf 6,0 eingestellt wird. Kleine Teilchen werden von beiden Harzen entfernt und ein abgesetztes Bettvolumen Sephadex wird zu 6 abgesetzten Bettvolumen Bio-Rex unter leichtem Rühren gefügt. Man vermischt weitere 15 Minuten vorsichtig und der pH-Wert wird auf 6,0 eingestellt. Schliesslich wird das Harzbett mit drei Bettvolumina des Puffers, eingestellt auf den pH-Wert 6,0, gewaschen. Man belässt dass Harz eingetaucht in dem auf den pH-Wert 6,0 eingestellten Puffer. Unter diesen Bedingungen ist das zum Eluieren von CK-MB von der Säule verwendete Eluiermittel entionisiertes Wasser.

Diese Bedingungen lassen sich bevorzugt der Trennungsverfahrensweise mittels einer Testpackung anpassen, die auf einem automatischen klinischen Analysator, aca, (Handelsprodukt der E. I. du Pont de Nemours and Company) verwendet wird.

Beispiel 1

Säulen in aca-Testpackungsköpfen bzw. -Rohrverbindern mit einem Volumen von 1,7 ml können mit dem wie vorstehend beschrieben hergestellten Gemisch von Bio-Rex 70 und DEAE Sephadex A-25 gepackt bzw. gefüllt werden. Jede Testpackung kann eine einzige Probe von 0,34 ml Volumen aufnehmen, die auf die Harzsäule aufgespritzt wird. Die Proben werden mit 2,0 ml entionisiertem Wasser in die Reaktionskammer der Packung in einer Geschwindigkeit von 1,0 ml/Min. eluiert.

Die Anwesenheit von Kreatinkinase in dem Eluiermittel bestimmt man durch Modifikation der UV-enzymatischen Untersuchung, die von Oliver, I.T. Biochem J., 61, Seite 116 (1955) und Rosalki, S.B., J. Lab. Clin. Med., 69, Seite 696 (1967) beschrieben wird. Die Bildungsgeschwindigkeit von $NADH_2$, das bei 340 nm absorbiert, ist proportional zur Konzentration der Kreatinkinase.

Die Methode von Oliver-Rosalki unterscheidet nicht zwischen den CK-Isoenzymen, jedoch kann die Wirksamkeit der chromatographischen Trennung der Isoenzyme wie folgt gezeigt werden.

Die Gewinnung der drei CK-Isoenzyme kann durch Messung ihrer Einzelaktivität vor und nach dem Eluieren durch die Säule mit dem gemischten Harzbett bestimmt werden. Bei der Isoenzymquelle, die für diese Bestimmungen verwendet wird, handelt es sich um menschliches Gewebe. Die nachstehende Tabelle zeigt typische Isoenzymgewinnungen, unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Säule mit dem gemischten Harzbett.

TABELLE I

(Säulenelution der CK-Isoenzyme)

CK-Isoenzym (in menschlichem Serum)	Aktivität (IE bzw. IU/l) ohne Säule	Aktivität (IE bzw. IU/l) mit Säule	Prozent Gewinnung
MM	134	1	<1%
MB	286	196	69%
MM	197	2	1%
BB	785	361	46%

Beispiel 2

Unter Verwendung des gleichen Gemischs der Ionenaustauscherharze und der gleichen Säulengrösse mit einer Probengrösse von 0,20 ml und Eluieren der Säule mit 2,0 ml entionisiertem Wasser in einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/Min. werden im wesentlichen das gesamte CK-MM und CK-BB zurückgehalten, wobei lediglich das CK-MB-Isoenzym gewonnen wird. Die Wirkung des pH-Wertes des Harzes auf die Leistungsfähigkeit der Säule mit dem gemischten Harzbett unter diesen Bedingungen wird in der folgenden Tabelle gezeigt:

TABELLE II

(Säulenelution der CK-Isoenzyme)

CK-Isoenzym (in menschlichem Serum)	Aktivität (IE bzw. IU/l) ohne Säule	mit Säule pH-Wert des Harzes	mit Säule der Säule
		6,1	6,25	6,4
MM	107	0	2	84
MB	297	120	241	283
BB	124	0	13	95