



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

632 930

⑳ Gesuchsnummer: 8906/77

㉔ Anmeldungsdatum: 19.07.1977

㉔ Priorität(en): 27.08.1976 JP 51-102763

㉔ Patent erteilt: 15.11.1982

㉔ Patentschrift
veröffentlicht: 15.11.1982

㉔ Inhaber:
The Green Cross Corporation, Osaka (JP)

㉔ Erfinder:
Satoshi Funakoshi, Katano-shi (JP)
Takao Oomura, Toyonaka-shi (JP)

㉔ Vertreter:
Ammann Patentanwälte AG Bern, Bern

㉔ Verfahren zur Herstellung eines vernetzten wasserunlöslichen Haptoglobinpräparates.

㉔ Zur Herstellung des Haptoglobinpräparates werden Fibrinogen, Haptoglobin, Thrombin und eine bifunktionelle Verbindung zugleich oder in bestimmter Reihenfolge nacheinander zur Reaktion gebracht und zu einem Vernetzungsprodukt verknüpft. Man erzielt hierbei ein Präparat mit hohem Gehalt an aktivem Haptoglobin und einer hohen Hämoglobinbindungskapazität, das als Adsorptionsmittel für Hämoglobin in einem extrakorporalen Kreislaufsystem verwendet und hierauf gut regeneriert werden kann.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines wasserunlöslichen Haptoglobinpräparats, dadurch gekennzeichnet, dass man Fibrinogen, Haptoglobin, Thrombin und eine bifunktionelle Verbindung zu einem Vernetzungsprodukt verknüpft.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Fibrinogen und Haptoglobin menschlichen Ursprungs verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als bifunktionelle Verbindung Glutardialdehyd oder Carbodiimid verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als bifunktionelle Verbindung Glutardialdehyd verwendet.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als bifunktionelle Verbindung Carbodiimid verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert von 6 bis 8 durchführt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion unter Anwendung eines Reaktantenverhältnisses von 1 g Haptoglobin, 0,5 bis 3,0 g Fibrinogen, 1 bis 50 Millimol einer bifunktionellen Verbindung und 15 bis 300 NIH-Einheiten Thrombin durchführt.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion bei Temperaturen von 0 bis 40 °C durchführt.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion stufenweise durchführt, wobei zunächst die bifunktionelle Verbindung mit einem Gemisch aus Fibrinogen und Haptoglobin und anschliessend das erhaltene Reaktionsgemisch mit Thrombin umgesetzt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion stufenweise durchführt, wobei zunächst Thrombin mit Fibrinogen und anschliessend das erhaltene Fibrin und Haptoglobin mit der bifunktionellen Verbindung umgesetzt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktionsteilnehmer gleichzeitig miteinander umsetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mit Thrombin bei Temperaturen von 20 bis 40 °C durchführt.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mit Thrombin bei Temperaturen von 20 bis 40 °C durchführt.

14. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mit der bifunktionellen Verbindung bei Temperaturen von 0 bis 10 °C durchführt.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mit der bifunktionellen Verbindung bei Temperaturen von 0 bis 10 °C durchführt.

16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Hilfsträgers durchführt, um die Kontaktoberfläche zu vergrössern.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Hilfsträger natürliche oder synthetische Fasern verwendet.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man synthetische Fasern aus einem Polyolefin, Acrylnitril-Polymerisat, Polyester, Polyacetat oder Vinylalkohol-Polymerisat verwendet.

Haptoglobin (nachstehend auch mit Hp bezeichnet) ist ein Blutplasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 86 000 bis 400 000. Es spielt im Stoffwechsel von im Blut freigesetztem Hämoglobin eine wichtige Rolle. Bei übermässiger Freisetzung von Hämoglobin (nachstehend mit Hb bezeichnet) im Blut wird dieses durch die Nierentubuli in den Urin ausgeschieden, was nicht nur einen Eisenverlust, sondern auch Störungen der Nierentubuli hervorruft. Haptoglobin spielt eine wichtige Rolle bei der Eisenrückgewinnung und bei der Verhinderung der Störung der Nierenfunktion, da es in vivo eine selektive und feste Bindung des Hämoglobins bewirkt und Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe bildet, die leicht vornehmlich durch die Leberparenchymzellen aufgenommen und dort verstoffwechselt werden.

Die sogenannte Hämolyse, d.h. die Freisetzung von Hämoglobin, wirft heutzutage grosse Probleme auf. Hämolyse wird beispielsweise durch Transfusion von unverträglichem Blut, schwere Verbrennungen, Herzoperationen und hämolytische Erkrankungen hervorgerufen. Dabei leidet der Patient häufig gleichzeitig an Nierenstörungen, die zu einer lebensbedrohenden Niereninsuffizienz führen können.

Der Verwendung von Haptoglobin bei derartigen, auf Hämolyse zurückzuführenden Nierenstörungen wurde bereits besondere Aufmerksamkeit zugewandt. Es wurde ein Verfahren zur Herstellung von hochgereinigten Haptoglobinpräparaten vorgeschlagen; vgl. JA-OS 77516/75, GB-PS 1 426 039, DE-OS 2 409 650 und FR-OS 2 251 314. Auf diese Weise werden injizierbare Haptoglobinpräparate zur kausalen Behandlung der vorerwähnten Nierenstörungen erhalten. Bei der intravenösen Verabfolgung von Haptoglobinpräparaten verbindet sich Haptoglobin mit freigesetztem Hämoglobin und sorgt somit für eine Normalisierung des Hämoglobinstoffwechsels.

In jüngster Zeit wurden erhebliche Fortschritte bei Operationen unter Anwendung von extrakorporalem Blutkreislauf, beispielsweise eines künstlichen Herz-Lungen-Systems oder von künstlichen Nieren, gemacht. Bei einer längerdauernden Zirkulation des Bluts durch ein derartiges extrakorporales System erfolgt Hämolyse unter Freisetzung von Hämoglobin. Das freigesetzte Hämoglobin verursacht häufig Nierenstörungen, die eine Fortsetzung der Operation mit extrakorporalem Kreislauf erschweren. Eine Behandlung mit Haptoglobinpräparaten ist auch in derartigen, durch die fortgesetzte Anwendung des extrakorporalen Kreislaufs verursachten Fällen von Hämolyse wirksam. Jedoch können Haptoglobinpräparate nach der Verabfolgung an den lebenden Körper nicht zurückgewonnen werden, d.h. die Haptoglobinpräparate können nicht wieder verwendet werden. Ausserdem vereinigt sich das in den lebenden Körper injizierte Haptoglobin mit dem Hämoglobin unter Bildung eines Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes (nachstehend mit Hb-Hp bezeichnet). Dieser Komplex wird in die Leber transportiert und dort dem Stoffwechsel unterworfen. Dabei tritt eine zu schwere Belastung von Patienten mit reduzierter Nierenfunktion ein. Demzufolge ist die intravenöse Injektion von Haptoglobinpräparaten bei derartigen Patienten unzweckmässig.

Es wurde bereits ein Verfahren zur Entfernung von freigesetztem Hämoglobin aus dem Blut vorgeschlagen, wobei die sogenannte Affinitätschromatographie angewendet wird. Dabei wird Haptoglobin an einen Agarose enthaltenden Träger gebunden, wodurch das Haptoglobin fixiert und unlöslich gemacht wird. Das erhaltene Produkt wird als Adsorptionsmittel verwendet; vgl. M. Klein und C. Mihaesco, Biochemical and Biophysical Research Communications, Bd. 52 (1973), Nr. 3, S. 774-778.

Das vorstehende Verfahren wurde für therapeutische Zwecke fortentwickelt. Dazu wurde ein Verfahren und eine

Vorrichtung zur Verfügung gestellt, die als Blutfiltrationsvorrichtung bezeichnet werden kann. Mit dieser Vorrichtung wird freigesetztes Hämoglobin entfernt, indem man das Hämoglobin im zirkulierenden Blut an unlöslich gemachtes Haptoglobin, das auf verschiedene Trägerstoffe aufgebracht ist und in einem extrakorporalen Kreislaufsystem, beispielsweise einem künstlichen Herz-Lungen-System, enthalten ist, bindet. Auf diese Weise gelingt es, das Hämoglobin direkt aus dem Körper zu entfernen, ohne die Leber zusätzlich zu belasten; vgl. JA-OS 105 186/76, 79 717/76 und 79 718/76. Jedoch erwiesen sich alle diese in Wasser unlöslichen fixierten Haptoglobinpräparate für praktische Zwecke in bezug auf die Menge an fixiertem Hp, die Hb-Bindungskapazität, die physikalische Festigkeit und das Verhalten nach der Regeneration als nicht zufriedenstellend.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein wasserunlösliches Haptoglobinpräparat mit einem hohen Gehalt an aktivem Haptoglobin und einer hohen Hämoglobinbindungskapazität zur Verfügung zu stellen. Dieses Präparat soll eine ausreichende physikalische Festigkeit aufweisen, dass es als Adsorptionsmittel für Hämoglobin in einem extrakorporalen Kreislaufsystem verwendet werden kann. Ferner soll dieses Haptoglobinpräparat nach der Verwendung als Adsorptionsmittel für Hämoglobin in einem extrakorporalen Kreislaufsystem unter günstigen Ergebnissen regeneriert werden können.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung des Haptoglobinpräparates ist dadurch gekennzeichnet, dass man Fibrinogen, Haptoglobin, Thrombin und eine bifunktionelle Verbindung zu einem Vernetzungsprodukt verknüpft. Dieses Verfahren beruht auf dem überraschenden Befund, dass Fibrin als Träger zur Fixierung von Haptoglobin besonders wirksam ist.

Im Vergleich zu herkömmlichen fixierten Hp-Präparaten oder Präparaten für Injektionszwecke sind die erfindungsgemässen fixierten Haptoglobinpräparate für praktische Zwecke wesentlich besser geeignet, da sie eine hohe Hämoglobinbindungskapazität aufweisen und ihre Aktivität auch bei längerdauernder kontinuierlicher Verwendung behalten.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von unlöslich gemachtem Haptoglobin kann auf verschiedene Weise ausgeführt werden, beispielsweise durch Einbetten von Haptoglobin in Fibrin nach einem beim Unlöslichmachen von Enzymen üblichen Verfahren oder durch Umsetzen von Haptoglobin und Fibrin oder Fibrinogen mit einer bifunktionellen Verbindung (Vernetzungsmittel), die zur Reaktion mit diesen Substanzen in der Lage ist und sie aneinander binden (vernetzen) kann, und, sofern Fibrinogen verwendet wird, anschliessende Umsetzung des Reaktionsprodukts mit Thrombin zur Umwandlung des Fibrinogenrests in einen Fibrinrest.

Für den erfindungsgemäss verwendeten Haptoglobintyp bestehen keine speziellen Beschränkungen, er hängt vielmehr vom beabsichtigten Verwendungszweck des Präparats ab. Sollen die Haptoglobinpräparate in Vorrichtungen zur Entfernung von Hämoglobin in einem extrakorporalen Kreislaufsystem verwendet werden, wird zweckmässigerweise injizierbares, gereinigtes Haptoglobin menschlichen Ursprungs verwendet, das sich auf die vorstehend beschriebene Weise zur Herstellung von wässrigen Haptoglobinlösungen eignet.

Fibrinogen wird durch Einwirkung von Thrombin zu in Wasser unlöslichem Fibrin umgewandelt. Das erfindungsgemäss eingesetzte Fibrinogen unterliegt keinen besonderen Beschränkungen. Die Wahl des Fibrinogens hängt vom Verwendungszweck des Haptoglobinpräparats ab. Bei der Verwendung des Präparats in einem extrakorporalen Kreislaufsystem wird Fibrinogen menschlichen Ursprungs bevorzugt. Derartiges Fibrinogen wird nach üblichen Verfahren gewon-

nen, beispielsweise nach Cohn durch Fällung mit kaltem Äthanol, wobei die Fraktion I als entsprechende Fibrinogenquelle dient. Haptoglobin, Fibrinogen und Thrombin, die in der erfindungsgemässen Reaktion verwendet werden, werden vorzugsweise zur Inaktivierung von Hepatitisviren nach üblichen Verfahren vorbehandelt, beispielsweise durch Erhitzen oder UV-Bestrahlung. Bei Verwendung von Ausgangsprodukten, die einer derartigen Behandlung unterzogen worden sind, erhält man Präparate, bei denen keine Gefahr einer Hepatitisvirus-Infektion besteht.

Als Vernetzungsmittel werden erfindungsgemäss bifunktionelle Verbindungen verwendet, die als unlöslichmachende, vernetzende Mittel für Enzyme bekannt sind, wie Glutardialdehyd, Hydrazin, Äthylendiamin, Methylendibromid, Bisdiaz-o-dianisidin, Bisdiazobenzidin und Carbodiimid (Cyanamid). Besonders bevorzugt werden Glutardialdehyd und Carbodiimid, da diese Verbindungen eine hohe Vernetzungswirksamkeit aufweisen und zu Produkten führen, deren Hb-Bindungskapazität in ausreichendem Masse erhalten bleibt.

Die erfindungsgemässen Reaktionen unter Beteiligung von Haptoglobin, Fibrinogen, einer bifunktionellen Verbindung und Thrombin werden zweckmässig in einem wässrigen Medium durchgeführt. Die Reaktionsfolge der Reaktionsteilnehmer ist nicht kritisch, sofern eine Verbindung zwischen Fibrinogen oder Fibrin und Haptoglobin erreicht wird. Gemäss nachstehenden Reaktionsfolgen gelangt man zu ähnlichen Ergebnissen:

a) Umsetzen der bifunktionellen Verbindung mit einem Gemisch aus Fibrinogen und Haptoglobin und anschliessende Umsetzung des Reaktionsgemisches mit Thrombin, um den Fibrinogenrest in einen Fibrinrest umzuwandeln;

b) Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin unter Einwirkung von Thrombin und anschliessend Umsetzung eines Gemisches aus dem erhaltenen Fibrin und Haptoglobin mit der bifunktionellen Verbindung;

c) Umsetzung von Fibrin mit einem Gemisch aus Haptoglobin und der bifunktionellen Verbindung oder

d) Umsetzung von Haptoglobin mit einem Gemisch von Fibrin und der bifunktionellen Verbindung.

Vorzugsweise werden jedoch sämtliche vier Reaktionsteilnehmer, d.h. Fibrinogen, Haptoglobin, bifunktionelle Verbindung und Thrombin, gleichzeitig miteinander umgesetzt.

Die funktionellen Gruppen der bifunktionellen Verbindung vereinigen sich mit den funktionellen Gruppen der Aminosäuren im Fibrin und im Haptoglobin, beispielsweise mit Aminogruppen, Carboxylgruppen und Phenolgruppen. Dadurch wird ein unlösliches, gebundenes Fibrin-Haptoglobin-Produkt gebildet.

Im allgemeinen werden folgende Reaktionsbedingungen angewendet: Das Gewichtsverhältnis von Fibrinogen zu Haptoglobin beträgt 0,5 bis 3,0 : 1; die Menge an zugesetztem Thrombin zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin beträgt 30 bis 100 NIH-Einheiten pro 1 g Fibrinogen; die bifunktionelle Verbindung wird vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 50 Millimol pro 1 g Haptoglobin verwendet. Die Reaktionstemperatur kann 0 bis 40 °C für die Gesamtreaktion betragen, wobei für die Fixierung bzw. Vernetzung eine Temperatur von 0 bis 10 °C und insbesondere von 0 bis 5 °C und für die Umwandlung des Fibrins eine Temperatur von 20 bis 40 °C und insbesondere von 28 bis 32 °C bevorzugt ist; der pH-Bereich des Reaktionsgemisches liegt vorzugsweise in der Nähe des Neutralpunkts, d.h. bei pH-Werten von 6 bis 8; als Reaktionsmedium wird vorzugsweise eine physiologische Kochsalzlösung oder ein 0,1-m-Phosphatpuffer ver-

wendet; die Reaktionszeit beträgt etwa 30 Minuten bis etwa 3 Stunden. In den meisten Fällen genügt eine Reaktionszeit von 2 Stunden, um die Reaktion zu Ende zu führen.

Das einfache Einbetten von Haptoglobin in Fibrin, das eine weitere Ausführungsform zur Herstellung des erfindungsgemässen unlöslich gemachten Haptoglobins darstellt, kann durchgeführt werden, indem man Fibrinogen und Haptoglobin in einem wässrigen Medium vermischt und das erhaltene Gemisch mit Thrombin versetzt, um das Fibrinogen in Fibrin zu verwandeln. Die Menge der verwendeten Ausgangsmaterialien und die Reaktionsbedingungen entsprechen dabei etwa den vorgenannten Angaben.

Das auf diese Weise erhaltene unlöslich gemachte Haptoglobinpräparat, insbesondere das durch Vernetzung unlöslich gemachte Präparat, ist von grossem praktischem Wert im Hinblick auf die Menge des fixierten Hp, die Hb-Bindungskapazität, die physikalische bzw. mechanische Festigkeit und die Wiederverwendbarkeit, wie aus den Versuchsbeispielen 1 bis 3 hervorgeht. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Versuchsbeispiele untereinander lässt sich feststellen, dass die erfindungsgemäss hergestellten Haptoglobinpräparate im Vergleich zu herkömmlichen Präparaten etwa die 2- bis 10fache Menge an fixiertem Haptoglobin enthalten, eine etwa 2- bis 9fache grössere Hb-Bindungskapazität und eine 2- bis 6fache höhere physikalische Festigkeit aufweisen und etwa 3- bis 7mal so viel Hb binden, wenn sie wiederholt verwendet werden. Die Menge an fixiertem Hp beträgt etwa 100 bis 600 mg/g, bezogen auf das Trockengewicht, und die Hb-Bindungskapazität etwa 20 bis 115 mg Hb/g, bezogen auf das Trockengewicht.

Wenn die erfindungsgemässen Haptoglobinpräparate einem extrakorporalen Kreislaufsystem als Filterbett in Form eines Granulats einverleibt werden, wodurch vermieden werden soll, dass das Präparat durch das strömende Blut wegtransportiert wird, hat man ein wertvolles Hilfsmittel zur Prophylaxe und Therapie von hämolytischen Nierenstörungen, die durch kontinuierliche Verwendung des extrakorporalen Kreislaufsystems verursacht werden, zur Verfügung. Die Mindestkorngrösse beträgt in diesem Fall etwa 40 Mikron, vorzugsweise 50 bis 150 Mikron. Bei geringeren Korngrössen wird Hämoglobin wirksamer gebunden.

Das erfindungsgemässe Präparat lässt sich in seiner physikalischen Festigkeit und der Hb-Bindungskapazität weiter verbessern, wenn man die Oberfläche des Fibrinogens dadurch vergrössert, dass man es in die Form einer auf einen Hilfsträger aufgetragenen Membran bringt. Als entsprechende Hilfsträger kommen wärmebeständige Fasern in Form von Fäden, Folien oder Netzen in Frage. Als wärmebeständige Fasern können natürliche oder synthetische Fasern je nach dem beabsichtigten Verwendungszweck des Haptoglobinpräparats verwendet werden. Beispiele für entsprechende Fasern sind Fasern aus Polyolefinen, Acrylnitril-Polymerisaten, Polyester, Polyacetaten und Vinylalkohol-Polymerisaten.

Die auf einen Hilfsträger aufgetragenen unlöslich gemachten Haptoglobinpräparate werden zweckmässig so hergestellt, dass man entweder Fibrinogen, das in Form einer Membran auf einen Hilfsträger aufgebracht ist, mit Thrombin unlöslich macht und anschliessend die unlöslich gemachte Fibrinmembran, Haptoglobin, die bifunktionelle Verbindung und den Hilfsträger gleichzeitig miteinander umsetzt oder dass man direkt ein Gemisch aus Fibrinogen, Haptoglobin, Thrombin und der bifunktionellen Verbindung in Gegenwart eines Hilfsträgers gleichzeitig miteinander umsetzt. Die bifunktionelle Verbindung reagiert auch mit den aktiven Gruppen des Hilfsträgers, so dass sich aktives, unlöslich gemachtes Haptoglobin mit hoher physikalischer Festigkeit ergibt.

Da das erfindungsgemässe Haptoglobinpräparat sich mit in wässrigem Medium freigesetztem Hämoglobin verbindet, ist es nicht nur zur Entfernung von Hämoglobin aus einem extrakorporalen Zirkulationssystem, sondern auch für die allgemeine Blutanalyse wertvoll. Ferner eignet es sich auch aufgrund seiner Kombinationsselektivität zur Durchführung von Plasmafraktionierungen und zur Wiedergewinnung von Hämoglobin.

In den nachstehenden Beispielen werden die Mengen an unlöslich gemachtem Haptoglobin aus den Mengen an nicht fixiertem Haptoglobin, das aus den Waschflüssigkeiten nach der Fixierung des Haptoglobins an Fibrin wiedergewonnen wird, mit Hilfe der radialen Immundiffusion [vgl. G. Mancini, A.O. Carbonara und T.F. Heremans, *Immunochem.*, Bd. 2 (1965), S. 235] berechnet. Sofern nichts anderes angegeben ist, werden die Hb-Bindungskapazitäten erhalten, indem man eine Säule mit dem unlöslich gemachten Haptoglobin füllt, einen Überschuss an Hämoglobinlösung auf die Säule gibt, um das Hämoglobin mit dem Haptoglobin zu verbinden, sodann die Menge an restlichem Hämoglobin in der Lösung nach dem Cyanmethämoglobin-Verfahren [vgl. E.J. Kampen, *Clin. Chim. Acta.*, Bd. 6 (1961), S. 538] bestimmt und die Menge an gebundenem Hämoglobin berechnet.

Die Figuren erläutern eine Vorrichtung, die erfindungsgemäss eingesetzt wird, sowie die Ergebnisse von Vergleichsversuchen, die mit erfindungsgemäss unlöslich gemachtem Haptoglobin, herkömmlichem unlöslich gemachtem Haptoglobin und Haptoglobin, das nach dem bekannten Enzym-Immobilisierungsverfahren unlöslich gemacht worden ist, durchgeführt worden sind. Fig. 1 ist eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur Kreislaufführung von Flüssigkeit, die zur Messung der physikalischen Stärke des unlöslich gemachten Haptoglobins verwendet wird. In Fig. 2 sind die Ergebnisse dieser Messungen wiedergegeben. Entsprechende Erklärungen bezüglich der Vorrichtung und der Untersuchungsergebnisse sind im Versuchsbeispiel 2 enthalten. Fig. 3 zeigt die Ergebnisse von Regenerationsversuchen mit unlöslich gemachtem Haptoglobin. Dieser Versuch ist im Versuchsbeispiel 3 erläutert.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

1 Liter einer 2,0%igen (Gewicht/Volumen) Lösung (pH-Wert 7,0, 1 m Phosphatpuffer) von gereinigtem Fibrinogen aus menschlichem Plasma wird mit 20 g gereinigtem Haptoglobin aus menschlichem Plasma und anschliessend mit 200 ml Thrombin mit 10 NIH-Einheiten/ml versetzt. Das Gemisch wird 2 Stunden bei 30 °C stehengelassen, um für eine ausreichende Koagulation des Fibrins zu sorgen. Nach dem Waschen wird die Fibrinmasse lyophilisiert. Man gewinnt ein Granulat mit gleichmässigen Teilchen (50 bis 150 µ). Das Granulat wird 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Man erhält 38 g eines fixierten Haptoglobinpräparats. Beim ersten Waschen beträgt der Gehalt an fixiertem Haptoglobin 390 mg/g, bezogen auf das Trockengewicht. Beim zweiten Waschen beträgt dieser Wert 100 mg/g, bezogen auf das Trockengewicht, und der Wert für die Hb-Bindungskapazität liegt bei etwa 20 mg Hb/g, bezogen auf das Trockengewicht.

Beispiel 2

2 Liter einer 2,0%igen (Gewicht/Volumen) Lösung (pH-Wert 7,0, 1 m Phosphatpuffer) von gereinigtem menschlichem Fibrinogen werden mit 20 g gereinigtem menschlichem Haptoglobin und anschliessend unter Rühren mit Glutaraldehyd bis zu einer Endkonzentration dieser Verbindung von 10 millimolar versetzt. Das Gemisch wird 20 Minuten bei 0

bis 5 °C gerührt. Nach Zugabe von 200 ml Thrombin mit 10 NIH-Einheiten/ml wird das Gemisch 2 Stunden bei 30 °C stehengelassen. Die erhaltene Fibrinmasse wird gewaschen und lyophilisiert. Die erhaltenen Teilchen werden auf eine einheitliche Korngrösse (50 bis 150 µ) ausgesiebt. Nach dem Waschen und Trocknen erhält man 52 g eines fixierten Haptoglobinpräparats. Der Gehalt an fixiertem Haptoglobin beträgt etwa 384 mg/g, bezogen auf das Trockengewicht, und die Hb-Bindungskapazität etwa 115 mg Hb/g, bezogen auf das Trockengewicht. Es tritt kein merklicher Unterschied im Gehalt an fixiertem Haptoglobin nach dem ersten und zweiten Waschen ein.

Beispiel 3

Ein Stück einfache Nylongaze mit einer lichten Maschenweite von etwa 149 µ (100 mesh ASTM) der Abmessungen 165 × 200 mm wird an beiden Enden mit einem Draht aus korrosionsbeständigem Stahl verschweisst und zu einer Spirale eingerollt. Die spiralenförmige Nylongaze wird in eine Glassäule mit einem Fassungsvermögen von 90 ml (28 mm Innendurchmesser und 145 mm Höhe) gebracht und mit einer ausreichenden Menge einer Thrombinlösung mit 20 NIH-Einheiten/ml benetzt. Nach dem Entfernen der überschüssigen Thrombinlösung wird ein Gemisch aus 20 ml einer 2%igen (Gewicht/Volumen) Lösung von gereinigtem menschlichem Fibrinogen (gelöst in physiologischer Kochsalzlösung), 200 mg gereinigtem menschlichem Haptoglobin und 5 mMol Glutardialdehyd rasch auf die Säule gegeben.

Die Temperatur der Fixierungsvorrichtung und der Reaktionsflüssigkeit wird während des vorstehend beschriebenen Verfahrens auf 5 °C eingestellt. Nachdem sich die gemischte Lösung genügend über die Nylongaze verteilt hat, wird die überschüssige Lösung entfernt. Sodann rotiert man die Säule 2 Stunden bei 30 °C, um das gebildete Fibrin auf der Nylongaze abzuscheiden. Anschliessend lässt man das Fibrin genügend schrumpfen, indem man es etwa 15 Stunden bei 4 °C stehenlässt. Anschliessend wird es gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Das auf diese Weise erhaltene fixierte Haptoglobin weist einen Gehalt an fixiertem Haptoglobin von 180 mg/fixierte Säule und eine Hb-Bindungskapazität von 65 mg/fixierte Säule auf.

Beispiel 4

Man verfährt wie in Beispiel 3, mit der Abänderung, dass man anstelle von Glutardialdehyd 10 mMol Carbodiimid verwendet. Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht merklich von den Ergebnissen von Beispiel 3. Der Gehalt an fixiertem Haptoglobin beträgt 175 mg/fixierte Säule und die Hb-Bindungskapazität 62 mg Hb/fixierte Säule.

Versuchsbeispiel 1

Die gemäss den Beispielen 1 und 2 erhaltenen fixierten Haptoglobinpräparate sowie herkömmliche Präparate, die an mit aktivem Ester copolymerisiertem Polyacrylamid gel fixiertes Haptoglobin (PAE-Hp) und an Sepharose (Agarose der Firma Pharmacia Co., Ltd., Schweden) fixiertes Haptoglobin (S-Hp) enthalten, werden in bezug auf ihren Gehalt an fixiertem Hp und ihre Hb-Bindungskapazität miteinander verglichen. Das PAE-Hp wird hergestellt, indem man gereinigtes menschliches Haptoglobin mit einem aktiven Ester copolymerisierten Polyacrylamidgel umsetzt [vgl. Schnaar und Lee, Biochem., Bd. 14 (1975), S. 1535]. Das S-Hp wird gemäss dem Verfahren von Klein und Mihaesco,

a.a.O., hergestellt. Als Haptoglobin wird ein gereinigtes humanes Haptoglobinpräparat in einer Menge von 20 g verwendet.

	Gehalt an fixiertem Hp (mg/g, bezogen auf das Trockengewicht)	Hb-Bindungskapazität (mg Hb/g, bezogen auf das Trockengewicht)
unlöslich gemachtes Hp von Beispiel 1 (in Fibrin eingebettet)	100	20
unlöslich gemachtes Hp von Beispiel 2 (Fibrin-Glutaraldehyd-Vernetzung)	384	115
S-Hp	76	14
PAE-Hp	60	13

Versuchsbeispiel 2

Mit Ausnahme des Präparats von Beispiel 1 werden die in Versuchsbeispiel 1 eingesetzten, unlöslich gemachten Haptoglobinpräparate in bezug auf ihre physikalische Beständigkeit gegen einen durch den Flüssigkeitsstrom verursachten Zerfall untersucht.

Der Versuch wird jeweils an 30 ml eines unlöslich gemachten Haptoglobinpräparats, das in einen Barrier-Filter (Johnson & Johnson Co.) von 50 ml Fassungsvermögen gefüllt ist, durchgeführt. Der Filter befindet sich in der in Fig. 1 abgebildeten Kreislaufvorrichtung. Diese Kreislaufvorrichtung besteht aus einer Kammer C, die den Barrier-Filter F für extrakorporales Blut enthält, einer mit der Kammer C verbundenen endlosen Leitung L und der in der Leitung L angeordneten Pumpe P. 1 Liter physiologische Kochsalzlösung wird mittels der Pumpe P in der Leitung L mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 500 ml/0,50 cm³/min im Kreislauf geführt. Proben der zirkulierenden Kochsalzlösung werden in stündlichen Abständen während 5 Stunden entnommen. Die Anzahl der Teilchen des unlöslich gemachten Haptoglobinpräparats, die aufgrund von Zerfall in der Probe auftreten, werden mit Hilfe eines Hämatometers mit einer Vergrößerung von 50 bestimmt. Der Porendurchmesser des Barrier-Filters für extrakorporales Blut beträgt 20 bis 40 µ, während das unlöslich gemachte Haptoglobinpräparat auf eine Korngrösse von 50 bis 150 µ ausgesiebt ist. Der zeitliche Verlauf der Anzahl der Haptoglobinteilchen ergibt sich aus Fig. 2, wobei die Ordinate die Anzahl der Hp-Teilchen, die in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung auftreten, und die Abszisse die Zeit der Kreislaufführung angibt. Aus Fig. 2 ergibt sich, dass die physikalische Festigkeit des gemäss Beispiel 2 erhaltenen unlöslich gemachten Haptoglobinpräparats die Festigkeit herkömmlicher Präparate um den Faktor etwa 2 bis 7 übertrifft.

Versuchsbeispiel 3

Die Wiederverwendbarkeit der in Versuchsbeispiel 1 verwendeten Haptoglobinpräparate wird untersucht. Dieser Versuch wird auf folgende Weise durchgeführt:

5 ml des unlöslich gemachten Haptoglobins werden mit einer ausreichenden Menge Hämoglobin vereinigt. Das mit Hämoglobin beladene Präparat wird mit 30 ml einer wässrigen 5-m-MgCl₂-Lösung (pH-Wert etwa 4,3) vermischt, um die Hp-Hb-Bindung vollständig zu spalten. Die Menge des in der Lösung freigesetzten Hb wird bestimmt. Daraus wird

die Hb-Bindungskapazität des unlöslich gemachten Haptoglobins berechnet. Das beim Freisetzen von Hämoglobin regenerierte Haptoglobin wird wieder mit einer ausreichenden Menge Hämoglobin vereinigt und anschliessend auf die vorstehende Weise behandelt, das Hämoglobin freizusetzen. Die vorstehend geschilderte Behandlung wird wiederholt. Die Änderung der Hb-Bindungskapazität bei diesen wiederholten Behandlungen wird untersucht.

Die Ergebnisse sind in Fig. 3 wiedergegeben. Die Ordinate gibt die restliche Hb-Bindungskapazität (mg Hb/g, bezogen auf das Trockengewicht) und die Ordinate die Anzahl der Regenerationen an. Aus Fig. 3 ergibt sich, dass das gemäss Beispiel 2 erhaltene Haptoglobinpräparat nach einer 4maligen Regeneration eine etwa 4- bis 8fach grössere Hb-Bindungskapazität als herkömmliche Präparate aufweist.

FIG. 1

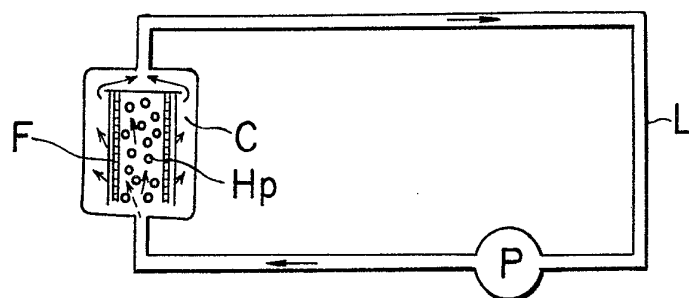


FIG. 2

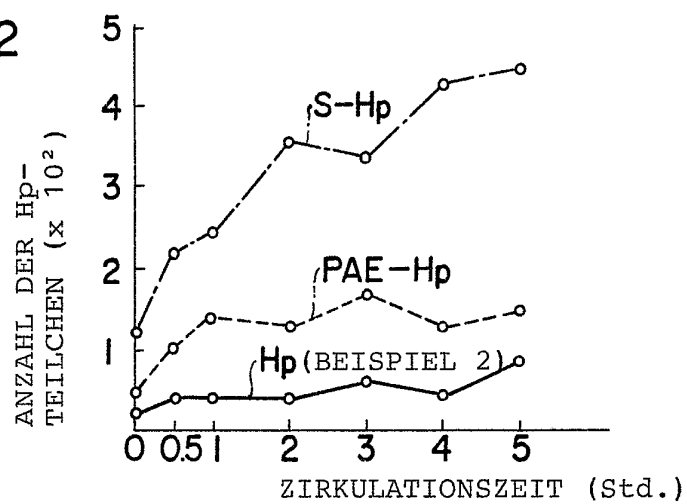


FIG. 3

