



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **266 504 A1**4(51) **A 61 K 37/50**
A 61 K 35/18

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 310 448 4	(22)	15.12.87	(44)	05.04.89
(71)	Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Klement-Gottwald-Allee 317/321, Berlin, 1120, DD				
(72)	Schößler, Werner, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Eifler, Rudolf, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bünsche, Sonja, Dr. rer. nat. Dipl.-Pharm.; Dittrich, Christa; Meineke, Lutz, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD				
(54)	Verfahren zur Separation und Isolierung von Cu_2Zn_2-Superoxiddismutase aus Erythrozyten von Vertebraten				

(55) Superoxiddismutase, Isolierung, Erythrozyten, Träger, Farbstoffe, Cibacron Blue, Biotechnologie, pharmazeutische Industrie, Medizin

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Separation und Isolierung von Cu_2Zn_2 -Superoxiddismutase aus Erythrozyten von Vertebraten. Die Erfindung findet ihre Anwendung in der Biotechnologie, der pharmazeutischen Industrie und in der Medizin. Erfindungsgemäß wird aufbereitetes Erythrozytenkonzentrat mit einem farbstoffligandierten Träger in Säulen- oder Batch-Verfahren in Kontakt gebracht und anschließend die Superoxiddismutase gewonnen. Als Träger verwendet man sphärische oder faserförmige Materialien; als Farbstoffe werden Cibacron Blue F 3 GA, Procion Blue 11 X-B, Procion Rad HE-38, Procion Yellow 11 X-R verwendet.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Separation und Isolierung von Cu_2Zn_2 Superoxiddismutase aus Erythrozyten von Vertebraten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man aufbereitetes Erythrozyten-Konzentrat mit einem farbstoffligandierten Träger einmal oder in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, wobei der Farbstoff identisch oder verschieden ist, im Säulen- oder Batch-Verfahren in Kontakt bringt und anschließend die Superoxiddismutase gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Bindung der Farbstoffe sphärische oder faserförmige Träger mit einer hinreichend großen Oberfläche einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man sphärische Träger mit einer Partikelgröße von 1 bis $1000\text{ }\mu\text{m}$ und Porengrößen $< 10\text{ nm}$ einsetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1–3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zellulosehaltige Materialien, vorzugsweise Perlzellulose, einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1–3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man agarosehaltige Materialien einsetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Farbstoff Cibacron Blue F3 GA einsetzt.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Farbstoff Procion Blue 11 X-B einsetzt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Farbstoff Procion Red HE-3B einsetzt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Farbstoff Procion Yellow 11 X-R einsetzt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Separation und Isolierung von Cu_2Zn_2 -Superoxiddismutase aus Erythrozyten von Vertebraten unter vorzugsweiser Verwendung humaner Erythrozyten zum medizinischen Einsatz. Das Verfahren findet Anwendung in der Biotechnologie, der pharmazeutischen Industrie und in der Medizin.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Superoxiddismutase (SOD) sind Enzyme, die die Disproportionierung von Superoxidanion-Radikalen entsprechend Gleichung (I) katalysieren.



Gegenwärtig sind verschiedene Superoxiddismutasen mit unterschiedlichen Metallatomen im aktiven Zentrum bekannt, die jedoch die gleiche enzymatische Funktion ausüben. Im Zytoplasma von Eukaryoten ist ausschließlich die Cu_2Zn_2 -Superoxiddismutase nachweisbar. Im folgenden wird das Synonym Superoxiddismutase für diese verwandt. Cu_2Zn_2 -Superoxiddismutase aus humanen Erythrozyten hat eine Molekularmasse von 32000 D und setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten mit je einem Kupfer- und Zinkatom zusammen. Die Aminosäuresequenz sowie die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms sind bekannt (s. z. B.: A. Gärtner, U. Weser: Biomimetic and Bioorganic Chemistry 12 [1986] 1). Superoxidanion-Radikale spielen eine zentrale Rolle im Entzündungsprozeß zugesprochen. Insbesondere bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, aber auch bei Strahlenerkrankungen verdichteten sich in den letzten Jahren die Hinweise, daß Superoxidanion-Radikale eine kausale Rolle bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen zukommt (s. z. B.: W. Puhl, H. Sies/ Hrsg./ Superoxid-Dismutase — Biochemie und therapeutischer Einsatz, Perimed-Fachbuchverlagsgesellschaft mbH Erlangen 1982). Auf Grund dessen wird der Einsatz antiinflammatorisch wirksamer SOD-Präparate zunehmend diskutiert. Gegenwärtig befindet sich ein für den Arzneimittelverkehr zugelassenes SOD-Präparat vom Rind mit dem Handelsnamen „Peroxynorm“ (Grünenthal GmbH, BRD) auf dem Weltmarkt. Allerdings kann es auf Grund der tierischen Herkunft dieses Präparates bei Langzeitanwendung am Menschen zu Unverträglichkeiten kommen (S. Carson, E. E. Vegin, W. Huber, T. J. Schulte: Toxikol. Appl. Pharm. 26 [1973] 184). Deshalb ist ein SOD-Präparat humanen Ursprungs erstrebenswert. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Verfahren zur Separation und Isolierung von Cu_2Zn_2 -Superoxiddismutase aus Erythrozyten beschrieben, die jedoch mit zahlreichen Nachteilen, wie unbefriedigender Reinheitsgrad und damit eingeschränkter Wirksamkeit und/oder niedrigen Ausbeuten, verknüpft sind. Im Jahr 1969 beschrieben J. M. McCord und I. Fridovich (J. Biol. Chem. 244 [1969] 6049) eine Methode zur Isolierung von SOD, die auf der bemerkenswerten Stabilität dieses Enzyms in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln basiert. Dieses Verfahren ergibt zwar eine reine SOD, ist jedoch relativ aufwendig und nicht zuletzt auf Grund der niedrigen Ausbeute von 25% recht teuer. Hinzu kommt, daß die Verwendung von chlorierten Lösungsmitteln (Chloroform) nicht unbedenklich ist und erhebliche technologische Probleme mit sich bringt. M. J. Stansell und H. F. Deutsch (J. Biol. Chem. 240 [1965] 4299) entwickelten eine wäßrige Isolierungsmethode, die auf der

Bindung des Enzyms an Anionenaustauscher basiert und später durch Modifizierungen bis auf Ausbeuten von 50% gesteigert wurde (A. Gärtner, U. Weser: FEBS Letters 155 [1983] 15).

Allerdings sind diese Verfahren relativ zeitaufwendig und mit einem nicht unerheblichen Aufwand verbunden.

Eine Kombination der Lösungsmittelfällung mit der chromatographischen Isolierung an Anionenaustauschern beschrieben J. Bannister, W. Bannister, E. Wood (Europ. J. Biochem. 18 [1971] 178), die jedoch die Nachteile beider Verfahren in sich vereinigt. Aus der JA-OS 53-31206 sowie der FR 2485203 ist eine Methode zur Isolierung von SOD bekannt, die auf der beachtlichen Thermostabilität des Enzyms beruht. Hierbei werden vor allem das Hämoglobin durch Hitzebehandlung hämolysierter Blutzellen in Gegenwart von Salzen zweiwertiger Metalle oder aber auch ohne Metallionenzusatz (DE 3410159) präzipitiert. Obwohl diese Methode durch ihren geringen technologischen Aufwand besticht, liefert sie jedoch nur ein unreines Präparat mit einer niedrigen spezifischen Aktivität.

Dieser Nachteil war Ausgangspunkt der DE-PS 3124228, in der ein Verfahren der Isolierung von SOD aus hämolysierten Erythrozyten durch zweimalige Hitzefällung in Anwesenheit von Neutralsalzen und nachfolgender Ionenaustauschchromatographie beschrieben ist. Allerdings ist dieses Verfahren — bedingt durch die zweimalige Hitzefällung und die von der Ionenaustauschchromatographie erforderliche Dialyse — relativ aufwendig und dürfte somit für industrielle Prozesse kaum Anwendung finden.

Unstrittig stellt das Verfahren der Hitzefällung unter Ausnutzung der Thermostabilität des Enzyms einen eleganten, kostengünstigen und effizienten Schritt zur Isolierung der SOD dar. Da, wie bereits ausgeführt, dieses Verfahren nur zu einem relativ unreinen Präparat mit einer geringen spezifischen Aktivität führt, erweist es sich als notwendig, dieses Verfahren mit weiteren Reinigungsschritten zu kombinieren. So hat es nicht an Versuchen gefehlt, affinitätschromatographische Methoden zur Separation und Isolierung der Superoxiddismutase einzusetzen.

So ist in der Patentschrift EP 112299 der Einsatz der Immunaффinitätschromatographie zur Reinigung von SOD aus Erythrozyten beschrieben. Aus technischer und technologischer Sicht dürfte jedoch der Einsatz trägergebundener Antikörper prinzipielle Probleme der Stabilität der chemischen Bindung zwischen dem Träger und dem Protein und vor allem des Erhalts der funktionellen Aktivität des Antikörpers bei wiederholtem Einsatz unter sterilen und pyrogenfreien Bedingungen mit sich bringen.

Ein anderer Weg ist in der JP 589686 sowie in der DD-PS 207928 beschrieben. Diese Autoren setzen die Hydrophobizitäts-Chromatographie bzw. die ladungskontrollierte Hydrophobizitäts-Chromatographie zur Isolierung und Reinigung der SOD ein. Beide Verfahren sind jedoch nicht zuletzt auf Grund des Einsatzes von Ammoniumsulfat nur schwer in größere Maßstäbe übertragbar.

Als Alternative bietet die Wakomoto Pharmaceutical Co. Ltd. (JP 58/183031) die Nutzung der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie zur Isolierung von SOD an. Dieses Verfahren ist jedoch mit einem erheblichen Kostenaufwand verbunden.

Von großer Bedeutung für großtechnische Verfahren zur Isolierung von SOD mit dem Ziel des medizinischen Einsatzes sind neben den Kosten des Verfahrens, die im wesentlichen durch die Ausbeute und den technologischen Aufwand bestimmt werden, die Reinheit des Präparates, die Sterilität und Pyrogenfreiheit des Präparates und nicht zuletzt die Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit des Verfahrens. Allen diesen Anforderungen werden die bisher bekannten Methoden und Verfahren zur Separation und Isolierung von Superoxiddismutase aus Erythrozyten nicht oder nur unzureichend gerecht.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches, kostengünstiges und effizientes Verfahren zur Separation und Isolierung von Superoxiddismutase aus Erythrozyten von Vertebraten zu entwickeln, das eine großtechnische Herstellung dieses Enzyms unter sterilen und pyrogenfreien Bedingungen in hoher Ausbeute gestattet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Separation und Isolierung von Superoxiddismutase aus Erythrozyten auf der Basis eines affinitätschromatographischen Schrittes zu entwickeln, das es gestattet, das Enzym einfach, schnell und kostengünstig großtechnisch in hoher Ausbeute und Reinheit unter sterilen und pyrogenfreien Bedingungen herzustellen.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch Einsatz von trägergebundenen Farbstoffen zur Entfernung von kontaminierenden Proteinen, so vor allem Hämoglobin, aber auch Plasmaproteinen, oder aber zur spezifischen Bindung und nachfolgenden Elution der Superoxiddismutase. Erfindungsgemäß werden (humane) Erythrozyten durch Reduzierung der Ionenstärke hämolysiert und anschließend auf bekannte Art und Weise einer Hitzefällung unterzogen. Nach Entfernung der Zellmembranbestandteile sowie der gefällten Proteine, so vor allem Hämoglobin, wird das Hämolysat mit farbstoffligandierten Trägern in Kontakt gebracht. Nach Bindung der kontaminierenden und unerwünschten Proteine an die farbstoffligandierten Träger wird die SOD-enhaltende Lösung mittels Ultrafiltration konzentriert und gegebenenfalls erneut mit farbstoffligandierten Trägern in Kontakt gebracht, wobei der Farbstoff identisch oder verschieden ist. Nach abschließender Sterilfiltration und Portionierung steht das Präparat für medizinische Anwendungen zur Verfügung. Die farbstoffligandierten Träger lassen sich auf einfache Art und Weise regenerieren und sind somit reproduzierbar über lange Zeiträume ohne Verlust der Bindungskapazität einsetzbar. Alternativ kann unter bestimmten Bedingungen eine nahezu spezifische Bindung des Enzyms Superoxiddismutase an farbstoffligandierten Träger erzielt werden, so daß nach Entfernung der nicht gebundenen kontaminierenden Proteine die SOD durch geeignete nicht denaturierende Dissoziationsreagenzien von den farbstoffligandierten Trägern abgespalten und gewonnen werden kann.

Als Farbstoffe für die erfindungsgemäße Farbstoffligand-Affinitätschromatographie bieten sich vor allem Cibacron Blue F 3 GA (reactive blue, CI 61211), Procion Blue 11 X-R (reactive blue 4, CI 61205), Procion Red HE-3B (reactive red 120), Procion Yellow 11 X-R (reactive yellow 4, CI 13190) u. a. an. Besonders vorteilhaft und kostengünstig gestaltet sich der Einsatz von

Trägern, die mit Cibacron Blue umgesetzt sind, wobei die Bindung des Farbstoffs direkt über den Triazinring des Reaktivfarbstoffs oder aber unter Verwendung von chemisch aktivierten Trägern mit oder ohne Brückenverbindungen, wie homo- oder heterobifunktionelle Reagenzien, erfolgt.

Prinzipiell sind alle sphärischen und faserförmigen Träger geeignet, vorausgesetzt, sie verfügen über funktionelle Gruppen, vorzugsweise Hydroxyl-Gruppen, die eine Umsetzung mit den genannten Farbstoffen gestatten. Des weiteren sollten sich die Träger durch eine hinreichend große Oberfläche, die für optimale Bindungskapazitäten erforderlich ist, sowie durch eine Porosität, die ein ungehindertes Eindringen von Proteinen ermöglicht, auszeichnen. Bei sphärischen Trägern erweisen sich hierbei Partikelgrößen von 1 bis 1000 µm und Porengrößen < 10 nm als besonders geeignet. Von großer Bedeutung für den erfindungsgemäßen Einsatz sind die mechanische Stabilität und Belastbarkeit der Träger, die möglichst geringen unspezifischen Bindungen an diese sowie die Möglichkeit des einfachen Regenerierens und Sterilisierens dieser Träger. Unter Berücksichtigung dessen erweisen sich einige als besonders vorteilhaft. Hierzu zählen Perzellulose und Agarose-Derivate, jedoch sind auch andere einsetzbar.

Die Inkubation des Hämolsates mit den farbstoffligandierten Trägern erfolgt im Säulenverfahren oder aber besonders vorteilhaft im batch-Verfahren, da hierbei bei hinreichend hoher Bindungskapazität des farbstoffligandierten Trägers nur geringe Mengen desselben im Verhältnis zu dem eingesetzten Hämolsat erforderlich sind, so daß nur geringe Verluste auftreten können. Hinzu kommt, daß die Bindung der kontaminierenden Proteine oder aber der SOD sehr schnell erfolgt, so daß nur kurze Inkubationszeiten erforderlich sind. Dies erweist sich vor allem unter dem Aspekt eines sterilen und pyrogenfreien Regimes der Herstellung dieses Präparates für medizinische Anwendungen als entscheidender Vorteil. Vorteilhaft ist auch, daß sich bei Anwendung im batch-Verfahren die Träger einfach und schnell von dem überstehenden Hämolsat entfernen lassen. Die Bindung des Hämoglobins und anderer unerwünschter Proteine an die farbstoffligandierten Träger ist bei hohen Konzentrationen bevorzugt. Deshalb kann es gegebenenfalls empfehlenswert sein, das Hämolsat nach der ersten Inkubation mit den farbstoffligandierten Trägern und Konzentrierung erneut mit farbstoffligandierten Trägern in Kontakt zu bringen, wobei diese die gleichen Farbstoffe oder aber andere enthalten können. Auf diese Art und Weise erhält man ein nahezu reines Produkt mit einer hohen spezifischen Aktivität.

Von großer Bedeutung für die medizinische Anwendung des Präparates ist die Sterilität und Pyrogenfreiheit des Endproduktes. Deshalb muß das gesamte Verfahren der Separation und Isolierung der SOD unter sterilen und pyrogenfreien Kautelen durchgeführt werden. Dies setzt voraus, daß die farbstoffligandierten Träger einfach und reproduzierbar regenerierbar und sterilisierbar sind. Unter Umständen erfolgt nach der Isolierung und Herstellung der SOD eine Entpyrogenisierung des Präparates mit geeigneten Mitteln.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu einer erheblichen Reduzierung des Aufwandes und der Kosten zur Separation und Isolierung von SOD aus Erythrozyten und liefert ein Präparat hoher Reinheit. Als besondere Vorteile erweisen sich die hohen Ausbeuten sowie der geringe Zeitbedarf des Verfahrens, die niedrigen Kosten der farbstoffligandierten Träger sowie ihre chemische und mechanische Stabilität, die eine leichte Regenerierung und Sterilisierung der farbstoffligandierten Träger ermöglicht. Diese Vorteile kommen vor allem bei großtechnischen Anwendungen zum Tragen.

Ausführungsbeispiele

Im folgenden wird die Erfindung an einigen Beispielen erläutert, wobei diese keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Beispiel 1:

10g Perzellulose (Charge 040387, VEB Leipziger Arzneimittelwerk, DDR) werden mit Aqua dest. gewaschen und in 150 ml Aqua dest. suspendiert. 1g Cibacron Blue F 3 G-A (Ciba Geigy, Schweiz) wird in 60 ml Wasser gelöst, beide Lösungen vereinigt und anschließend auf 60°C erhitzt.

Nach 30 min werden 25g NaCl unter Rühren zugegeben und weiterhin unter ständigem Rühren bei 60°C belassen. Nunmehr werden 2g Na₂CO₃ zugegeben (der pH-Wert sollte zwischen 10,5 und 11 liegen) und auf 80°C erhitzt und zwei Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen und Waschen mit der Aqua dest. und 0,02 m Phosphat-Puffer, pH 7,0 ist die Cibacron Blue-Perzellulose einsetzbar.

Beispiel 2:

1 Volumenteil (VT) humanes Erythrozyten-Konzentrat wird mit 2 VT Aqua dest. versetzt und Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Anschließend wird das Hämolsat auf 73°C erhitzt und 10 min bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen mit 1/2 VT Eis wird das Präzipitat durch Abnutschen entfernt. Der pH-Wert des Hämolsates sollte bei 6,5 liegen. Die Hämoglobin-Konzentration beträgt nach dieser Hitzefällung in der Regel etwa 3 mg/ml. Nunmehr wird das Hämolsat mit der nach Beispiel 1 hergestellten Cibacron Blue-Perzellulose in einem Verhältnis von 20:1 (V/V) gemischt und im batch-Verfahren etwa 30 min gerührt. Die Hämoglobin-Konzentration liegt nunmehr in der Regel bei 50 µg/ml. Nach Entfernung des Trägers durch Absaugen über eine Fritte wird das Hämolsat durch Ultrafiltration konzentriert und erneut mit Cibacron Blue-Perzellulose in einem Verhältnis 10:1 (V/V) gemischt und 30 min gerührt. Die so erhaltene Superoxiddismutase, die sich im Überstand befindet, ist nahezu frei von kontaminierenden Proteinen und besitzt eine spezifische Aktivität von 5 100 U/mg. Die Ausbeute des Verfahrens beträgt 75%.

Beispiel 3:

Die nach Beispiel 1 hergestellte und nach Beispiel 2 eingesetzte Cibacron Blue-Perzellulose wird mit 6 m Harnstoff in 0,1 n NaOH regeneriert. Nach Entfernung des Harnstoffs ist die farbstoffligandierende Perzellulose ohne Verlust der Bindungsfähigkeit reproduzierbar einsetzbar.

Beispiel 4:

Die nach Beispiel 1 hergestellte Cibacron Blue-Perlzellulose wird mehrfach und unterschiedliche Zeiten bei 120°C entsprechend dem 2. AB der DDR (Akademie-Verlag, Berlin 1985) autoklaviert und anschließend auf ihre Bindungskapazität gegenüber Hämoglobin (Hb) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Autoklavierung	mg Hb/ml Träger
—	60
2 × 30 min	60
3 × 30 min	60
4 × 30 min	60
2 × 30 min + 1 × 60 min	80

Beispiel 5:

Die nach Beispiel 2 hergestellte humane SOD wird anschließend sterilfiltriert, mit physiologischer Kochsalzlösung eingestellt und mittels Detoxi-Gel (Pierce, USA) entpyrogenisiert. Dieses Präparat ist steril und pyrogenfrei und somit für medizinische Anwendungen geeignet.

Beispiel 6:

10 ml Hämolyzat werden aus humanen Erythrozyten entsprechend Beispiel 2 hergestellt und mit 0,2 n NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und nachfolgend mit 1 ml entsprechend Beispiel 1 hergestellter Cibacron Blue-Perlzellulose versetzt und 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Unter diesen Bedingungen wird das Hämoglobin vollständig gebunden. Der die SOD enthaltende Überstand wird nach Separation desselben mit 0,01 m Citronensäure auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt und erneut mit 1 ml Cibacron Blue-Perlzellulose, entsprechend Beispiel 1, versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird die SOD quantitativ gebunden (s. Tab. 2).

Tabelle 2

Verfahrensschritt	SOD (µg/ml)
Hämolyzat	34
nach Blue-Perlzellulose pH 8,0	34
Überstand pH 4,0	34
nach Blue-Perlzellulose pH 4,0	—

Die Abspaltung und Elution des Enzyms erfolgt mit 1 m Kaliumthiocyanat, pH 8,0, 20 mM EDTA enthaltend.