



PATENTSCHRIFT 149 861

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

Int. Cl.²

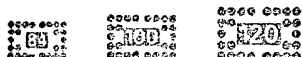
(11) 149 861 (45) 05.08.81 3(51) C 07 G 7/00
(21) WP C 07 g / 194 299 (22) 12.08.76

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
(72) Pommerening, Klaus, Dr. Dipl.-Chem., DD; Kühn, Manfred, Dr. Dipl.-Chem., DD; Zorn, Heinz, Dipl.-Chem., DD; Beneš, Milan, CS; Štamberg, Jiří, CS; Foukal, Zdenik, Dr., CS
(73) Pommerening, Klaus, Dr. Dipl.-Chem., DD; Kühn, Manfred, Dr. Dipl.-Chem., DD; Zorn, Heinz, Dipl.-Chem., DD; Beneš, Milan, CS; Štamberg, Jiří, CS; Foukal, Zdenik, Dr., CS; Mohr, Peter, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD; Ruckpaul, Klaus, Prof. Dr., DD; Jänig, Gerd-Rüdiger, Dr. Dipl.-Biochem., DD
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Patent- und Neuererwesen, 1115 Berlin, Lindenberger Weg 70

(54) Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Proteinen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Proteinen, vorzugsweise Hämoproteinen. Das Verfahren ist in der chemischen, pharmazeutischen und biochemischen Industrie sowie in der klinischen Chemie, der Analytik und der Diagnostik einsetzbar. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einfaches, präparativ und analytisch einsetzbares Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Proteinen zu finden. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren auf der Basis der Affinitätschromatographie zu entwickeln. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß eine proteinhaltige Lösung mit Imidazol oder einem Imidazolderivat, das an einen wasserunlöslichen makromolekularen Träger gebunden ist, in Kontakt gebracht wird und die in der Lösung oder am Träger befindlichen Proteine, gegebenenfalls nach Abtrennung des Trägers, isoliert werden. Träger und proteinhaltige Lösung werden bei pH 7 bis 11, gegebenenfalls in Gegenwart von Detergentien u/o Glycerin, bei Temperaturen von 0 bis 30° nach dem Batch-Verfahren oder nach dem Säulenverfahren in Kontakt gebracht. Es werden gute Trenn- und Reinigungseffekte erzielt; Beispiele sind die Trennung Hämoglobin/Myoglobin und Cytochrom P450/Cytochrom P420.

13 Seiten



"Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Hämoproteinen"Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Hämoproteinen. Das Verfahren ist in der chemischen, pharmazeutischen und biochemischen Industrie, z. B. zur Abtrennung von Hämoglobin aus biologischem Material sowie in der klinischen Chemie, der Analytik und der Diagnostik einsetzbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Für die Trennung bzw. Reinigung von Proteinen werden verschiedene Methoden eingesetzt, die die Unterschiede in den physikalischen und biochemischen Eigenschaften der zu trennenden Proteine ausnutzen, wie Löslichkeit, Stabilität, Molekülgröße, elektrische Ladung usw./N. REHFELD, D. REICHELT: Analytische und präparative Methoden der Klinischen Biochemie, Akad. Verlag Berlin 1972, S. SCHWIMMER und A. B. PARDEE: Adv. in Enzymology 14, 375./

Zum Beispiel kann die Entfernung von Hämoglobin aus Blutplasma durch Extraktion mit Chloroform (Tschech. Pat. 88563 / 1959/) oder durch Fällern mit Zn-Salzen (Vox sang. 23, 481 / 1972/) durchgeführt werden. Mehrmals wurde die Anwendung von Zelluloseionenaustauschern (z. B. DEAE-, CM-Zellulose in Vox Sang. 13, 59 /1967/) und Polysaccharidderivaten (z. B. DEAE-, CM-Sephadex in Vox Sang. 23, 18 /1972/) beschrieben.

Die Verfahren sind z. T. sehr zeit- und materialaufwendig, und eine ausreichende Reinheit ist häufig nur unter hohen Ausbeuteverlusten zu erzielen.

Für die Isolierung und Reinigung von Proteinen gewinnen in der letzten Zeit Verfahren der Affinitätschromatographie steigende Bedeutung, die auf der spezifischen bioaffinen Komplexbildung der Proteine beruhen.

So ist z. B. die Abtrennung von Hämoglobin (Hb) auf der Grundlage der Komplexbildung mit Haptoglobin /M. KLEIN und C. MIHAESCO: Biochem. biophys. Res. Commun. 52, 774 (1973)/ beschrieben worden. Bei diesem Verfahren kann jedoch nur das Hb entfernt werden, das nicht mehr vom Haptoglobin im Serum durch Komplexbildung gebunden worden ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Proteinen, vorzugsweise Hämoproteinen, zu finden. Es soll analytisch und präparativ einsetzbar sein und gute Ausbeuten erreichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die spezifische bioaffine Komplexbildung der Proteine zu Imidazol bzw. seinen Derivaten auszunutzen und ein geeignetes Trennverfahren auf der Basis der Affinitätschromatographie zu entwickeln.

Erfindungsgemäß werden Hämoproteine getrennt bzw. gereinigt, indem eine hämoproteinhaltige Lösung mit Imidazol oder einem Imidazolderivat, das an einen wasserunlöslichen makromolekularen Träger gebunden ist, in Kontakt gebracht wird, die danach in der Lösung verbleibenden oder am Träger befindlichen Hämoproteine isoliert werden und danach ggf. eine Regenerierung des Trägers erfolgt. Als wasserunlösliche makromolekulare Träger dienen Biopolymere, vorzugsweise Polysaccharide oder synthetische Makromoleküle, vorzugsweise Kopolymerisate auf der Basis der Methakrylsäureester.

Das Imidazol oder sein Derivat ist direkt oder unter Zwischenschaltung von Spacern an den Träger gebunden. Anknüpfungsstellen sind der Ringstickstoff in 1-Stellung oder der

Ringkohlenstoff in 2- oder 4 (5)-Stellung des Imidazolrings. Die Realisierbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insofern überraschend, da das Imidazol bzw. seine Derivate keine physiologische Komplexpartner für Hämoproteine sind. Die aus der Literatur bekannten Stabilitätskonstanten, z. B. des Hämoglobin-Imidazol-Komplexes, liegen an der internen Grenze, die für eine Affinitätschromatographie gefordert werden. Die Bildung und Stabilität dieser Komplexe hängt also weitgehend von der Natur der dem Eisen-protoporphyrin IX umgebenden Proteintasche ab.

Hierbei kam es darauf an, daß die Trägerfixierung des Imidazols bzw. seiner Derivate und die unspezifischen (hydrophoben) Wechselwirkungen des Trägermaterials mit dem Hämoprotein einen positiven Einfluß auf die Komplexbildung und Selektivität haben.

Die Herstellung dieser imidazolhaltigen Träger (IMD-Träger) erfolgt nach an sich bekannten Verfahren. Zur Realisierung der Erfindung sind die in WP 124 405 (M. Benes, M. Kühn, K. Pommerening) vorgeschlagenen IMD-Träger generell einsetzbar. Die hämoproteinhaltige Lösung wird bei pH 7 - 10, gegebenenfalls in Anwesenheit von Detergentien und/oder Glycerin, bei Temperaturen von 4 - 30°C mit dem Träger in Kontakt gebracht. Im Falle der Abtrennung von Hämoglobin kann die Kontaktnahme auch bei geringfügig höherer Temperatur (bis 40°C) erfolgen. Hierfür gibt es 2 Möglichkeiten:

- a) Der Träger wird in die hämoproteinhaltige Lösung eingetragen und nach der für die Adsorption notwendigen Zeit, etwa 1 bis 24 Stunden durch Filtration wieder abgetrennt (Eintopf- oder Batchverfahren).
- b) Der Träger befindet sich in einer Säule, auf die die proteinhaltige Lösung aufgebracht wird (Säulenverfahren).

Das Batchverfahren wird besonders vorteilhaft für Reinigungsoperationen eingesetzt, d. h. bei der Abtrennung von Verunreinigungen.

Das Säulenverfahren wird besonders vorteilhaft für Trennoperationen eingesetzt, wenn die Proteine unterschiedlich stark

aber nicht zu fest an den Träger gebunden werden. Die proteinhaltige Lösung wird bei einem pH von 7 bis 10, gegebenenfalls in Anwesenheit von Detergentien und/oder Glycerin, bei Temperaturen von 4 - 30°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur, auf die Säule aufgebracht. Anschließend wird eluiert, wobei die Hämoproteine auf Grund der unterschiedlich festen Bindung zum Träger nacheinander in der Elutionsflüssigkeit erscheinen. Die entsprechenden Fraktionen werden aufgefangen und die Isolierung des enthaltenen reinen Hämoproteins in an sich bekannter Weise durchgeführt.

Die IMD-Träger können nach ihrer Regenerierung wiederholt eingesetzt werden. Die Regenerierung erfolgt vorzugsweise durch Behandlung mit Harnstoff und einem Gemisch Pyridin/Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz von Dithionit oder durch pH-Änderung des Elutionspuffers. Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfach durchzuführen und hat den Vorteil allgemeiner Anwendbarkeit. Die zu trennenden bzw. zu reinigenden Hämoproteine werden mit guten Ausbeuten und in hoher Reinheit erhalten. So wurde z. B. aus einem Hämoglobin/Myoglobin-Gemisch mit dem Säulenverfahren das Myoglobin chromatographisch rein in über 90 %iger Ausbeute isoliert. Aus einem Zytochrom P-450/Zytochrom P-420-Gemisch wurde mit dem Batch-Verfahren Zytochrom P-420 bis 85 % des Ausgangswertes entfernt. Vorteilhaft läßt sich das Verfahren auch für die Abtrennung von Hämoglobin aus biologischen Materialien (z. B. hämolytischen Seren) anwenden. Je nach Verfahrensbedingungen werden dabei 40 - 100 % des vorhandenen Hämoglobins entfernt.

Die Erfindung soll an einigen Beispielen erläutert werden, die jedoch die Erfindung nicht einschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

1 g bzw. 2 g des makroporösen IMD-Trägers mit Struktureinheit der allgemeinen Formel I (siehe Anlage)

(n = 1,2), hergestellt nach WP 124 405, werden in Äthanol gequollen, mit Wasser und 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7, gewaschen und in eine Säule gefüllt.

1 ml einer 0,53 mVal/l MethHb(Mensch)-Lösung⁺, pH 7, wird auf die Säule gegeben und anschließend mit dem Phosphatpuffer eluiert. Die Konzentrationsbestimmung im Eluat ergibt eine Bindung des Hb an der Säule von 64 - 74 %.

⁺) (MethHb = Methämoglobin, das Fe liegt im 3-wertigen Valenzzustand vor. Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf das Fe (1 Mol = 4 Val/l).

Die Bestimmung der Hb-Konzentration erfolgt über den CN-Komplex mit $\epsilon_{540 \text{ nm}}^{\text{mM}} = 11$ (bezogen auf Fe). Die Bindung des Hb und der anderen Proteine an den Träger kann auch aus der Differenz der Absorption der Ausgangslösung und des Eluates bei 279 nm und/oder der Soretbande bestimmt werden. Innerhalb der Fehlergrenze ergeben die einzelnen Methoden übereinstimmende Werte. Beim Batch-Verfahren (5 ml 0,1 mVal/l MetHb-Lösung, 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur) werden bis zu 72% des angebotenen MetHb gebunden.

Beispiel 2

300 mg bzw. 750 mg I (n = 1,2) werden analog Beispiel 1 vorbehandelt und mit einem Puffer pH 9 (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) gewaschen. 5 ml einer 0,1 mVal/l MetHb(Mensch)-Lösung im gleichen Puffer werden bei Raumtemperatur 3,5 Stunden im Kreislauf über die Säule gepumpt. Hierbei werden 77-80% des Hb gebunden.

Beispiel 3

2 g NH₂-gruppenhaltige Agarose (AH-Sepharose) werden nach dem Quellen und Waschen mit einer 0,5 M NaCl-Lösung in 16 ml der NaCl-Lösung suspendiert und 3,2 ml einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Waschen mit der 0,5 M NaCl-Lösung und Umpuffern auf pH 9 (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) wird der Träger mit 16 ml einer 0,05 M Histamin-Lösung in dem Puffer pH 9 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach dem Waschen und Umpuffern auf pH 8 werden die überschüssigen Aldehydgruppen durch Umsetzung mit 16 ml einer 1 M Äthanolamin-Lösung, pH 8, blockiert.

5 ml einer 0,43 mVal/l MethHb^(Mensch)-Lösung im Puffer, pH 9, werden 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem IMD-Träger geschüttelt. Nach Abtrennen des Trägers sind 100% des angebotenen Hb adsorptiv am Träger gebunden.

Beispiel 4

Zu 1 g bzw. 2 g analog Beispiel 1 vorbehandeltem I (n = 2) werden 2,5 ml einer Lösung gegeben, die im Puffer pH 9 (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl) 0,04 mVal/l MethHb^(Mensch) und 0,01 mM Humanserumalbumin (HSA) enthält. Unter ständiger Durchmischung (Rühren, Schütteln, Rotieren) wird die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem IMD-Träger in Kontakt gebracht. Nach Abtrennen des Trägers sind 80-90% des MethHb und nur 9-11% des HSA gebunden.

Die Konzentrationsbestimmung des HSA erfolgte mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{279 \text{ nm}}^{1\%} = 7,15$, das Molekulargewicht wird mit 66500 angenommen. Die Bindung des HSA an den Träger wird aus der UV-Absorption bei 279 nm unter Berücksichtigung der Hb-Absorption ermittelt.

Beispiel 5

Der makroporöse IMD-Träger der allgemeinen Formel I (n = 1, 300 mg; n = 2, 450 mg; n = 3, 550 mg) wird in einer Säule mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3, der 0,3% Na-dodezylsulfat enthält, gewaschen. 1 ml eines Gemisches aus 1 Teil 0,53 mVal/l MethHb^(Mensch) und 1 Teil 0,12 mM HSA-Lösung wird auf die Säule gegeben und mit dem Na-dodezylsulfat enthaltenden Puffer eluiert. Über 90% des MethHb werden an den IMD-Träger gebunden.

Beispiel 6

Vollserum (Mensch) wird durch Zugabe von MetHb hämolytisch gemacht (0,4-2,9 mVal/l MetHb) und mit 0,1 M NaHCO_3 -Puffer, pH 9-9,5, der 0,5 M NaCl enthält, verdünnt (1:10 - 1:11). 2,5 ml dieses hämolytischen Serums werden mit 500 mg des analog Beispiel 1 vorbehandelten I (n = 1,2) entweder 24 Stunden bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung in Kontakt gebracht. Nach Abtrennen des IMD-Trägers sind 39-59% des MetHb gebunden. Das Serum wird sofort gegen 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7, dialysiert und durch Ultrafiltration konzentriert.

Beispiel 7

Vollserum (Mensch) wird durch Zugabe von MetHb hämolytisch gemacht (0,4-3 mVal/l MetHb) und mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3, der 0,3% Na-dodezylsulfat enthält, verdünnt (1:10-1:11). 2,5 ml dieses Serums werden mit 500 mg I (n = 1,2) 2 Stunden bei Raumtemperatur und ständiger Durchmischung in Kontakt gebracht. Nach Abtrennen des IMD-Trägers sind 90-100% des MetHb gebunden. Das Serum wird sofort analog Beispiel 6 dialysiert und konzentriert.

Beispiel 8

2 g makroporöses Poly-glykolmethakrylat (Spheron 1000) werden nach bekannten Verfahren mit 400 mg BrCN aktiviert. Der aktivierte Träger wird bei pH 9,5 mit 10^{-6} Mol Histamin umgesetzt. Die Desaktivierung der nicht umgesetzten Gruppen des Trägers erfolgt mit 5 ml einer 1 M Äthanolamin-Lösung, pH 8. Hämolytisches Vollserum (0,5 mVal/l MetHb) wird analog Beispiel 7 verdünnt. 5 ml des Serums werden analog Beispiel 7 mit dem IMD-Träger in Kontakt gebracht. 65-78% des MetHb werden an den Träger gebunden.

Beispiel 9

3,0 g IMD-Träger mit der Struktureinheit der allgemeinen Formel I ($n = 1,2$) werden in einer Säule bei Raumtemperatur mit 0,1 M Puffer pH 8 äquilibriert. 1 ml eines Gemisches aus Hämoglobin(Rind)/Myoglobin(Rind) (Hämoproteinkonzentration 0,4 - 0,5 m Val/l) wird auf die Säule gegeben und anschließend mit dem Puffer pH 8 über einen Fraktionssammler eluiert.

Die gelchromatographische Untersuchung der proteinhaltigen Fraktionen zeigt, daß beim Einsatz des IMD-Trägers ($n = 2$) reines Myoglobin eluiert wird und im Falle $n = 1$ das Myoglobin im Vergleich zum Hämoglobin stark angereichert ist.

Beispiel 10

10-11 ml gequollener IMD-Träger mit der Struktureinheit der allgemeinen Formel II (siehe Anlage) werden in einer Säule bei Raumtemperatur oder 4°C mit 0,1 M Puffer pH 8 äquilibriert. 1 ml eines Gemisches aus Hämoglobin/Myoglobin (Rind) (Konzentration je Hämoprotein) wird auf die Säule gegeben und 0,25 m Val/l anschließend mit dem pH 8 Puffer über einen Fraktionssammler eluiert.

Im Eluat werden über 90% des Myoglobins in gelchromatographisch reiner Form zurückgewonnen. Das Hämoglobin wird entweder vollständig an dem Träger adsorbiert (Raumtemperatur) oder erst bei sehr hohen Volumina teilweise eluiert.

Beispiel 11

100 mg bzw. 1 ml gequollener IMD-Träger der allgemeinen Formel I und II werden mit 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,25, 20% Glycerin, 1(2) mM EDTA äquilibriert. 1 ml mikrosomales Zytochrom P-450 aus Kaninchenleber (Konz. 80-150 μ M) mit 13-36% Zytochrom P-420 in dem Puffer der Zusammensetzung:

0,1 M Phosphat, pH 7,25, 1 mM Dithioerythrit, maximal 6% Na-cholat, gegebenenfalls 20% Glycerin wird zugegeben und die Probe 18 Stunden bei 4°C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Eluat ist der Gehalt an Zytochrom P-420 bis zu 87% des Ausgangswertes erniedrigt.

Beispiel 12

11 ml (2 g) gequollener IMD-Träger der Formel I (n = 1) werden in einer Säule bei Raumtemperatur mit pH 9 Puffer (0,1 M Borat, 0,5 M NaCl) äquilibriert. 1 ml eines Gemisches aus Katalase (Rind)/Methämoglobin(Rind) mit einer Konzentration von 34 μ M bzw. 50 μ Val/l wird auf die Säule gegeben und anschließend mit dem Puffer über einen Fraktionssammler eluiert.

Nach Konzentrierung der proteinhaltigen Fraktionen konnten über 70% gelchromatographisch reiner Katalase wiedergewonnen werden.

Regenerierung der IMD-Träger

Beispiel 13

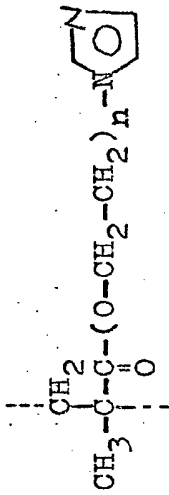
Die Regenerierung der hämoglobinbeladenen IMD-Träger erfolgt durch mehrstündige Inkubation mit 6 M Harnstoff, Waschen mit Wasser und einem Gemisch aus Pyridin und 0,1 M NaOH (1:4), gegebenenfalls unter Zugabe von Dithionit. Nach mehr als 10-facher Regenerierung ist kein sichtbarer Verlust der Hb-Bindungsfähigkeit zu beobachten. Auf dem gleichen Wege kann eine generelle Regenerierung der proteinbeladenen Träger erfolgen.

Bei Waschen der beladenen IMD-Träger mit einem Puffer, pH < 7, wird Hb ebenfalls vom IMD-Träger teilweise eluiert.

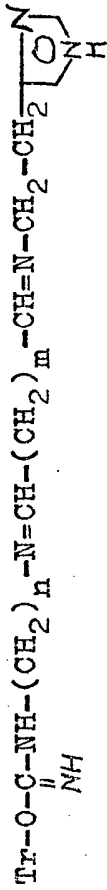
Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Trennung bzw. Reinigung von Hämoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß eine hämoproteinhaltige Lösung mit dem trägerfixierten Imidazol bzw. Imidazolderivat der Formeln I oder II bei einem pH von 7 - 10 bei Temperaturen von 4 - 30°C im Säulen- oder Eintopfverfahren (Batch-Verfahren) in Kontakt gebracht wird, anschließend die in der Lösung verbleibenden oder am Träger befindlichen Hämoproteine isoliert werden und danach ggf. eine Regenerierung des Trägers erfolgt.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Gegenwart von Detergentien gearbeitet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution bei einem pH von 7 - 10 in Anwesenheit von Detergentien und gegebenenfalls Glycerin bei Temperaturen von 4 - 30°C erfolgt.
4. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Regenerierung der Imidazolgruppen enthaltenden Träger durch Abspaltung des Hämoproteins durch Behandlung mit Harnstoff und einem Gemisch Pyridin/Natronlauge, gegebenenfalls unter Zusatz von Dithionit oder durch pH-Änderung des Elutionspuffers erfolgt.

Hierzu 1 Seite Formeln



Formel I $n = 1-3$



Formel II: Tr = Polyglykolmethakrylat (Spheron),
Polysaccarid (Agarose)

$n = 2 - 10$

$m = 3$