



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **273 164 A3**

4(51) C 07 K 15/16

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 07 K / 273 065 2	(22)	06.02.85	(45)	08.11.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VEB Sächsisches Serumwerk Dresden, Herbert-Bochow-Straße 40, Dresden, 8012, DD
(72)	Taubert, Hans, Dr. rer. nat., DD

(54)	Verfahren zur Anreicherung von Lipoproteinen
------	--

(57) Lipoproteine des Serums werden speziell im Rahmen labordiagnostischer Untersuchungen benötigt, vor allem in Form von Kontrollseren oder Vergleichsmaterialien. Die Anreicherung der Lipoproteine erfolgt nach dem dargelegten Verfahren in der Weise, daß man die Lipoproteine selbst in Lösung läßt und die Begleitsubstanzen durch Fällung mit Ammoniumsulfat in einer Finalkonzentration von 1,40 mol/l und anschließende Ultrafiltration entfernt. Dieses Verfahren erfaßt den größten Teil der Serumlipoproteine und ist in einfacher Weise in größerem Maßstab durchführbar. Die erhaltenen Konzentrate werden entweder direkt oder nach Zusatz zu Serum für Kalibrier- oder Kontrollzwecke in der Lipidanalytik verwendet.

Patentansprüche:

Verfahren zur Anreicherung von Lipoproteinen aus Plasma oder Serum, dadurch gekennzeichnet, daß Proteine und Immunkomplexe mit einem Molekulargewicht von über $1,5 \times 10^5$ mit Ammoniumsulfat in einer Finalkonzentration von $1,40 \pm 0,05 \text{ mol/l}$ ausgefällt werden und anschließend der Überstand durch Ultrafiltration mit Membranen vom Nominalmolekulargewicht 1×10^5 vom Fällungsmittel, niedermolekularen Stoffen des Serums und Eiweißen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 6×10^4 befreit wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

In den hochentwickelten Industriestaaten stellen zur Zeit Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache dar. Zu deren Hauptrisikofaktoren gehören Störungen im Lipidhaushalt, die unter anderem das Auftreten von Arteriosklerose und Herzinfarkt fördern. Bei der Prävention und Therapie dieser Störungen ist die Lipidanalytik in klinischen Labors von großer Bedeutung. Die vorliegende Erfindung bezieht sich vor allem auf eine Verfahrensweise zur Gewinnung von Lipoproteinen, die zur Herstellung von Kontroll- und Kalibriermaterialien für die Lipidanalytik geeignet sind. Dafür werden als Ausgangsmaterial Serumlipoproteine verwendet, die nach einem besonderen Verfahren weitgehend von anderen Komponenten befreit und konzentriert werden. Solche Präparationen können auch als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Apolipoproteinen dienen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Lipoproteine des Blutes sind eine Gruppe von Molekülen, die neben dem Proteinanteil einen relativ großen Lipidanteil besitzen aber qualitativ und quantitativ in der Protein- und Lipidzusammensetzung größere Unterschiede aufweisen können. Die Molekulargewichte reichen von etwa 2×10^5 bis über 2×10^7 . Der Proteinanteil hat verschiedene Funktionen, unter anderem ist er für die Löslichkeit der Moleküle mit den zum größten Teil wasserunlöslichen Lipidbestandteilen verantwortlich, und er bedingt auch die Fällbarkeit mit Proteinfällungsmitteln. Der Lipidanteil verleiht den Molekülen eine Dichte, die unter der von reinen Proteinen und Glykoproteinen liegt, er ist verantwortlich für die relativ leichte Aggregation der Moleküle, wie sie z. B. im Aufrahmen des Serums zum Ausdruck kommt, und er bedingt die Wechselwirkung mit Reagenzien, die mit Proteinen nicht oder nur wesentlich schwächer reagieren.

Alle diese Eigenschaften der Lipoproteine werden in der einen oder anderen Form von den Verfahren zu ihrer Gewinnung aus Plasma oder Serum genutzt. Die bisherigen Methoden beziehen sich vor allem auf ihre Reinsdargestellung im Labormaßstab, auf die Gewinnung der β -Lipoproteine und auf die Isolierung von Lipoproteinfraktionen im Rahmen einer umfassenderen Fraktionierung.

Die Verwendung der Ultrazentrifuge liefert zwar sehr reine Lipoproteine, sie gestattet aber nur kleinere Durchsätze und kommt daher für den technischen Maßstab kaum in Frage.

Die Einschrittfällungsmethoden erfassen im wesentlichen nur die β -Lipoproteine aber nicht den High-Density-Lipoprotein-Anteil (HDL-Fraktion). - Wenn die Fällung unspezifisch erfolgt, z. B. mit Alkohol oder anderen organischen Lösungsmitteln, erhält man meist relativ hohe Anteile an unerwünschten Serumproteinen, die sich bei der Herstellung hoher Lipidkonzentrationen in Kontrollmaterialien störend bemerkbar machen. Wenn andererseits spezifischere Fällungsmittel verwendet werden, z. B. Dextransulfat oder Heparin, sind zum Zentrifugieren hohe Beschleunigungen erforderlich, die im technischen Maßstab schwer zu realisieren sind.

Bei der labormäßigen Gewinnung von Lipoproteinen gibt es Verfahren, bei denen die Lipoproteine zunächst ausgefällt werden und anschließend nach Zusatz bestimmter Substanzen das Fällungsmittel aus dem Niederschlag durch einfache Dialyse in Schläuchen entfernt wird, wodurch eine weitgehende Klärung eintritt.

Solche Verfahren sind aber nicht auf die für größere Chargen erforderliche Ultrafiltration mit tangentialer Überströmung der Membranen umzusetzen, weil hierfür nur von vornherein klare Lösungen eingesetzt werden können.

Die Anpassung eines anderen Verfahrens an die Ultrafiltration, nämlich die Ausfällung der Lipoproteine mit Rivanol, Lösung des Niederschlages und Entfernung des Fällungsmittels durch Dialyse, war nicht möglich, weil sich die Lipoproteine schon nach kurzer Zeit zu Tröpfchen zusammenballten und damit für den vorgesehenen Zweck nicht mehr verwendbar waren.

Die klassische Plasmafraktionierung ist relativ aufwendig und wäre dann besonders sinnvoll einzusetzen, wenn die Hauptplasmabestandteile wie Albumin, Immunglobuline oder andere Fraktionen gewonnen werden sollen und die Lipoproteine mit relativ geringem Aufwand aus einer der anfallenden Fraktionen isoliert werden könnten. Ihr alleiniger Einsatz zur Gewinnung der Lipoproteine in größerem Maßstab ist zu aufwendig.

Ziel der Erfindung

Aufgabe der Erfindung war daher die Entwicklung eines einfachen und robusten Verfahrens zur Anwendung im technischen Maßstab, mit dem der größte Teil der Serumlipoproteine einschließlich der HDL-Fraktion mit relativ geringen Beimengungen anderer Serumbestandteile gewonnen werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Wenn man von der Ultrafiltration absieht, dann wird bei den bisherigen Verfahren das Prinzip verwendet, die Lipoproteine durch Fällung von den sie begleitenden Substanzen des Serums abzutrennen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß das umgekehrte Prinzip, nämlich das Auflösenlassen der Lipoproteine und das Abtrennen der unerwünschten Begleitsubstanzen, ein für technische Zwecke gut geeignetes Verfahren ergibt, wenn ganz bestimmte Bedingungen eingehalten werden. Dazu werden in der ersten Stufe die meisten Nichtlipoproteine mit Molekulargewichten oberhalb $1,5 \times 10^5$ ausgefällt, und in der zweiten Stufe werden das Fällungsmittel und andere niedermolekulare Substanzen sowie Proteine bis zu einem Molekulargewicht von etwa 6×10^4 , vor allem Albumin, durch Ultrafiltration abgetrennt. Bei der Fällung in der ersten Stufe muß unbedingt eine finale Ammoniumsulfatkonzentration von $1,40 \pm 0,05$ mol/l eingehalten werden. Bei höheren Konzentrationen werden die Lipoproteine schon geschädigt bzw. in eine aggregierte Form gebracht, die zwar für das bloße Auge nicht sichtbar ist, die aber die Ultrafiltration sehr stark behindern kann, offenbar durch Verstopfen der Poren. Bei geringeren Konzentrationen an Ammoniumsulfat werden dagegen zu wenige der unerwünschten Begleitproteine abgetrennt. Der sehr enge Konzentrationsbereich für das Ammoniumsulfat ist vor allem dadurch erforderlich, daß sich die Molekulargewichte von abzutrennenden Begleitproteinen – etwa $1,5 \times 10^5$ bis über 2×10^6 bei Immunglobulinen bzw. Immunkomplexen – und niedermolekularen Lipoproteinen – etwa ab 2×10^5 – deutlich überlappen. Der Fällung kommt der Umstand entgegen, daß bei 1,4 mol/l an Ammoniumsulfat ein Teil der Immunglobuline zusammen mit den anderen Proteinen ausfällt, während sie in reiner Form höhere Fällungsmittelkonzentrationen benötigen.

Die zur Ultrafiltration benötigten Membranen müssen einerseits Albumin gut durchlassen, andererseits dürfen die niedermolekularen Lipoproteine, nämlich die mungenmäßig sowieso am wenigsten vorhandenen HDL, nicht durchgelassen werden. Daher ist eine Porengröße mit dem Nominalmolekulargewicht von 10^5 am günstigsten.

Da die Ultrafiltration der Eiweiße im Verhältnis zum Wasser sehr langsam vor sich geht, muß im Verlauf der Prozedur eine größere Menge wässriger Lösung zu dem zu reinigenden Konzentrat gegeben werden. Diese Waschlösungen können beliebig zusammengesetzt sein, sie dürfen lediglich keine ungünstige Wirkung auf die Lipoproteine bzw. die Begleitproteine haben. Zweckmäßigerweise verwendet man daher verdünnte Salzlösungen, z. B. 1%ige Kochsalzlösung. Zum Schluß kann man bei Bedarf auch mit einer Lösung von der Zusammensetzung waschen, die man endgültig in dem Lipoproteinkonzentrat haben möchte, z. B. eine dem Serum an niedermolekularen Substanzen äquivalente Lösung.

Der Grad der Konzentrierung der Lipoproteine und des Auswaschens der Begleitproteine richtet sich nach den Erfordernissen. Die Konzentrierung kann nicht beliebig gesteigert werden, da die gleichzeitig steigende Viskosität der Lösung technische Probleme bringt. Eine Konzentration auf 10 g Cholesterol/l, das entspricht einer Konzentrierung der Lipoproteine auf mehr als das Fünffache, ist etwa die Grenze, bei der man noch unter normalen Bedingungen arbeiten kann. Eine stärkere Konzentrierung erfordert einen wesentlich höheren Aufwand.

Sollen die Lipoproteine für analytische Zwecke in Kontroll- oder Vergleichsmaterialien eingesetzt werden, genügt es im allgemeinen, wenn man etwa 70 bis 75% der Ausgangsproteine entfernt.

Der besondere Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht darin, daß nicht nur frisches Serum oder Plasma, sondern auch gefrorenes Serum direkt für die Aufarbeitung verwendet werden kann, obwohl hier die Lipoproteine eine gewisse Schädigung ihrer Struktur erleiden. Dadurch kann auch das tiefgefrorene Sammelserum aus Serumabfällen aufgearbeitet werden. Trotzdem waren die Lösungen vor und nach der Ultrafiltration klar filtrierbar, ohne daß Lipoproteinverluste auftraten, und während der Ultrafiltration kam es zu keiner Tröpfchenbildung oder einer anderen merklichen Aggregation.

Ausführungsbeispiel

20-l-Humanserum werden bei Raumtemperatur und unter Rühren mit 20 l 2,8 mol/l Ammoniumsulfatlösung versetzt, wobei die ersten 15 l in 20 Minuten und die letzten 5 l in 2 Stunden zugegeben werden. Die Lösung wird noch 1 Stunde gerührt, über Nacht stehengelassen und zentrifugiert. Der Überstand wird durch anschließende Ultrafiltration mit Membranen der Ausschlußgrenze 100 000 Dalton zunächst auf 15 l eingeeengt, mit 4 l gewaschen (als Waschlösung wird während des gesamten Vorganges 0,9%ige Kochsalzlösung verwendet), dann auf 12 l, 10 l, 8 l, 6,7 l und 5,5 l eingeeengt, wobei bei jeder Stufe mit 4 l gewaschen wird. Danach wird auf 4,8 l eingeeengt und mit insgesamt 20 l gewaschen, wobei das Retentat-Volumen zwischen 4,8 und 5,2 l gehalten wird. Schließlich wird auf 3,5 l eingeeengt.

Das Konzentrat enthält je nach Ausgangswerten etwa 10 g Cholesterol und etwa 8 g Eiweiß pro l. Die Ultrafiltration ist in 5 Stunden beendet (abhängig von Art und Größe der Membran sowie von der Pumpe und den verwendeten Druckverhältnissen).

Von diesem Konzentrat werden 2 Teile zu 10 Teilen Humansammelserum gegeben, das einen Cholesterolgehalt von 1,8 g/l aufweist. Der Cholesterolgehalt des Gemisches beträgt etwas mehr als 3 g/l. Das aufgestockte Serum wird sterilfiltriert, in Portionen abgefüllt und lyophilisiert.