



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤1 Int. Cl.³: C 07 G 7/00



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

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

633 809

②1 Gesuchsnummer: 11339/77

⑦3 Inhaber:
Monsanto Company, St. Louis/MO (US)

②2 Anmeldungsdatum: 16.09.1977

⑦2 Erfinder:
Charles Lewis, jun., Hazelwood/MO (US)
James Michael Schuck, Chesterfield/MO (US)

②4 Patent erteilt: 31.12.1982

⑦4 Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

⑤4 Verfahren zur Herstellung einer Serumalbuminfraktion.

⑤7 Aus einer Mischung mit anderen Blutproteinen wird in hoher Ausbeute eine reine Serumalbuminfraktion hergestellt, indem man diese Mischung während 1 - 4 Stunden bei pH 5,0 - 5,5 und 65 - 72°C mit einem durch Di-(C₁-C₄)alkylamino-(C₁-C₄)alkyl substituierten, vernetzten Dextranpolymer in Kontakt lässt, den pH dann auf 3,5 - 4,5 einstellt und das Albumin selektiv eluiert. Vorher können die gamma- bzw. die alpha- und beta-Globuline durch Einstellen des pH auf 5,5 - 7,5 bzw. auf ca. 4,7 und Abtrennen des nicht adsorbierten Materials isoliert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung einer Serumalbuminfraktion in hoher Ausbeute und Reinheit aus einer Mischung mit anderen Blutproteinkomponenten durch Kontaktieren mit einem harzartigen polymeren Material, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Material ein mit Dialkylaminoalkylgruppen substituiertes, vernetztes Dextranpolymer ist, wobei die Alkyle je 1 bis 4 Kohlenstoffatome aufweisen, und dass man das Kontaktieren während 1 bis 4 Stunden bei einem pH von 5,0 bis 5,5 und einer Temperatur von 65 bis 72°C vornimmt, dann die Mischung auf einen pH von 3,5 bis 4,5 einstellt und das gewünschte Albumin daraus selektiv eluiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der pH während der Wärmebehandlung bei 5,2 bis 5,3 und während des Eluierens bei etwa 4,0 liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das Dextranpolymer in einer Konzentration von 1 bis 5 Gewichtsprozent der Mischung verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Wärmebehandlung bei einer Temperatur von etwa 70°C durchführt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung Gesamtblutplasma oder eine AHF-entzogene Blutplasmafraktion ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dialkylaminoalkylgruppen Diäthylaminoäthylgruppen sind.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung ein Blutplasma ist, welches vorher zum Entfernen von gamma-Globulin fraktioniert worden ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das vorherige Entfernen von gamma-Globulin ein Kontaktieren der Mischung mit dem Dextranpolymer bei einem pH von 5,5 bis 7,5 und Abtrennen des nicht adsorbierten Materials als gamma-Globulin umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Anfangsfaktionierung bei einem pH von etwa 6,0 vornimmt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als zusätzlichen Schritt β- und α-Globuline aus der Ausgangsmischung entfernt, indem man die adsorbierte Mischung auf einen pH von etwa 4,7 einstellt und die desorbierte überstehende Flüssigkeit abtrennt.

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Serumalbuminfraktion in hoher Ausbeute und Reinheit aus einer Mischung mit anderen Blutproteinkomponenten.

Albumin stellt die grösste Blutplasmafraktion dar und findet weite Verwendung in der Medizin, wie z.B. in Fällen von Schock und als Plasmaersatz.

Die Blutfaktionierung mittels verschiedener Verfahren zur Gewinnung von Albumin und anderer abgetrennter Komponenten ist allgemein gebräuchlich. Eine wichtige handelsübliche Albuminfraktion, bekannt als normales Serumalbumin, ist eine osmotisch stabile Lösung einer stark gereinigten Plasmafraktion, die mindestens 96% Albumin enthält. Seine Gewinnung wurde weitgehend durch die Arbeit von Cohn und seiner Mitarbeiter an der Harvard Medical School möglich gemacht und seine Herstellung ist in den US-PSen 2 390 074 und 2 469 193, in J. Amer. Chem. Soc. 68, 469-475 (1946) und Kirk-Othmer, Encycl. of Chem. Tech. 3, 584-588 (2. Auflage 1964) beschrieben. In den USA wird für die Herstellung von normalem Serumalbumin z. Zt. vorzugsweise die so genannte Methode 6 nach Cohn angewandt.

Eine weitere wichtige handelsübliche Albuminfraktion ist die sogenannte Plasmaproteinfraktion (PPF); sie ist eine Lö-

sung einer Plasmafraktion, die mindestens 83% Albumin zusammen mit einem Gemisch von höchstens 17% α- und β-Globulinen enthält. Die derzeit in den USA bevorzugte Methode zur Herstellung von PPF ist das in der US-PS 2 958 628 und in Vox Sang. 2, 174 (1957) beschriebene Verfahren nach Hink.

Bei diesen Verfahren zur Gewinnung des höher konzentrierten normalen Serumalbumins und des weniger konzentrierten PPF wird als Fällungsmittel in den Auf trennungsverfahren kaltes Äthanol verwendet. In verschiedenen anderen bekannten Verfahren für die Herstellung von Albuminfraktionen werden andere Fällungsmittel wie Äther, Methanol oder Ammoniumsulfatsalz verwendet, oder eine Adsorption an Gel oder Ionenaustauschchromatografie angewandt.

In letzter Zeit wurden für die Blutfaktionierung, einschließlich der Abtrennung von Albumin, verschiedene polymere Stoffe entwickelt, z.B. Polyäthylenglycol (PEG, Carbowax) gemäss US-PS 3 415 804; Mischpolymere aus Äthylenoxid und Polyoxypropylenpolymer (Pluronics) gemäss US-PS 3 850 903 und Deutsche Offenlegungsschrift 2 403 065; sowie bestimmte besondere Polyelektrolyte wie vernetzte Äthyl/Maleinsäureanhydrid-Mischpolymerederivate gemäss US-PSen 3 554 985 und 3 555 001. Ein Vorteil bei der Verwendung dieser Polymere besteht darin, dass sie bei normaler Zimmertemperatur verwendet werden können, und die für das Cohn'sche Äthanolfraktionierungsverfahren notwendigen niedrigen Temperaturen vermieden werden.

Ein weiteres Verfahren zur Gewinnung eines gereinigten Serumalbumins verwendet die selektive Denaturierung von Serumglobulinen ohne Denaturierung des Serumalbumins durch Erhitzen in Gegenwart von Caprylat oder anderen Fett säureanionenstabilisatoren, wie dies in den US-PSen 2 705 230 und 2 765 299, J. Biol. Chem. 162, 181-198 (1946) und Blut 30, 121-134 (1975) beschrieben ist. Dieses Verfahren ist zwar für die Herstellung von Albuminfraktionen des PPF-Typs brauchbar, es ist jedoch nicht allgemein für die Herstellung des stärker gereinigten Serumalbumins in hoher Ausbeute, und ohne dass die wertvollen Gammaglobuline zerstört werden, geeignet. Es wird im allgemeinen als Pasteurisationsstufe zur Erzeugung eines virusfreien Alubuminproduktes ausgeführt.

In dem erfindungsgemässen Verfahren wird eine Serumalbuminfraktion mit hoher Ausbeute und grossem Reinheitsgrad aus einer Mischung mit anderen Blutproteinkomponenten, z.B. aus Plasma und anderen albuminhaltigen Blutfaktionen, hergestellt, indem man diese mit einem bestimmten Polymerharz in Kontakt bringt, sie 1 bis 4 Stunden auf 65°C bis 72°C erhitzt und dabei einen pH von 5,0 bis 5,5 aufrechterhält und dann das Albumin selektiv bei einem pH von 3,5 bis 4,5 aus der Harz-Proteinmasse auswäscht. Die im Rahmen dieser Erfindung verwendeten Polymerharze sind mit Di-(C₁-C₄)alkylamino-(C₁-C₄)alkyl substituierte, vernetzte Dextranpolymere; solche Verbindungen besitzen eine hohe Albuminadsorptionskapazität. Kombiniert man bei diesen Dextranpolymeren die Wärmebehandlung und die Schritte der Adsorption und Auswaschung, dann erhält man ein Alubuminprodukt mit wesentlich höherer Reinheit und Ausbeute, als man sie getrennt bei Anwendung entweder der Wärmebehandlung oder der Adsorptions-Auswaschungsschritte erhält. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren kann Albumin mit mehr als 90% Ausbeute und 94% Reinheit gewonnen werden.

Das erfindungsgemäss hergestellte Serumalbumin kann aus Vollblut, Blutplasma und Serum oder deren albuminhaltigen Fraktionen gewonnen werden. Da die hier angewandte Wärmebehandlung dazu tendiert, die in dem behandelten Material vorhandenen Globuline zu denaturieren, ist es häufig angezeigt, zunächst bestimmte erwünschte Globulinfraktionen, wie z.B. die Gammaglobuline, vor der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens zu isolieren. Auch andere

wertvolle Blutfaktionen, wie z.B. Gerinnungsfaktoren, AHF und Prothrombinkomplex, können von dem Plasmaausgangsmaterial abgetrennt werden, bevor das erfundungsgemäss Verfahren begonnen wird. Diese Fraktionen können mit den üblichen bekannten Verfahren abgetrennt werden.

Die in dieser Erfahrung verwendeten mit Di-(C₁-C₄)alkylamino-(C₁-C₄)alkyl substituierten, vernetzten Dextranspolymeren sind in der US-PS 3 227 025 beschrieben. Diese Stoffe werden hergestellt, indem man eine geeignete funktionelle Di-(C₁-C₄)alkylamino-(C₁-C₄)alkylgruppe, wie z.B. die funktionelle Diäthylaminoäthylgruppe (DEAE) in das vernetzte Dextran einführt.

Das vernetzte Dextran, im Handel als Sephadex erhältlich, ist ein hydrophiles Mischpolymerisationsprodukt mit hohem Molekulargewicht, das man durch Umsetzung von Dextranen mit bifunktionellen organischen Stoffen, die mit der Hydroxylgruppe der Dextrane reagieren können, erhält. Dies ist in der US-PS 3 042 667 beschrieben. Die Vernetzung der Dextrankette ergibt ein dreidimensionales Polysaccharidnetz, an das die DEAE-Gruppe oder eine andere funktionelle Gruppe durch Ätherbrücken an die Glukoseeinheiten der Dextrankette angehängt werden. Das vernetzte DEAE-Dextran ist im Handel als DEAE-Sephadex A-25 und A-50 erhältlich. A-25 ist stärker als A-50 vernetzt und hat deshalb eine geringere Porosität. Diese Stoffe wurden bisher bei der chromatographischen Abtrennung von Albumin aus mechanischem Blutserum [Experientia, 30 (6), 608-610 (1974)] und bei der Gewinnung anderer Blutproteine, wie z.B. der Immunglobuline verwendet, wie dies in Arch. Biochem. Biophys. 108, 514-522 (1964), 134, 279-284 (1969); Vox Sang. 23 (4), 279-290 (1972) und der US-PS 3 869 436 beschrieben ist, ferner bei der Gewinnung von Prothrombin gemäss Vox Sang. 25 (2), 113-123 (1973) und US-PS 3 920 625.

In einer neueren Belgischen Patentschrift 832 527 wird DEAE-Dextran als brauchbar bei der Herstellung einer sehr reinen Albuminfaktion beschrieben. In dem beschriebenen Verfahren wird das Blutplasma mit dem Harz in Kontakt gebracht, darauf folgt Auswaschen und Wärmebehandlung der ausgewaschenen Lösung in Gegenwart von Acetyltryptophan oder von Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Das Verfahren ist brauchbar, es hat jedoch nicht den Vorteil, dass die denaturierten Globuline von dem Albumin abgetrennt werden, was durch die Wärmebehandlung des Harz-Proteingemisches in dem erfundungsgemässen Verfahren erleichtert wird.

Bei der Durchführung des erfundungsgemässen Verfahrens werden die oben beschriebenen Harz-Dextranspolymeren insbesondere mit Blutplasma oder Serum oder albuminhaltigen Blutfaktionen vermischt, und zwar vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 1% bis 5% Polymer. Durch Einstellen des pH des Harz-Proteingemisches auf verschiedene Werte können ausgewählte Proteine zuerst entfernt werden. Bei einem pH von 5,5 bis 7,5 werden Albumin, α - und β -Globuline und Fibrinogen von dem Harz adsorbiert, während ein grösserer Teil der Gammaglobuline nicht adsorbiert wird und aus dem Überstand für therapeutische Zwecke gewonnen werden kann. Diese anfängliche Abtrennung von Gammaglobulin wird vorzugsweise bei einem pH von etwa 6 durchgeführt. Ein Teil der adsorbierten α - und β -Globuline und des Fibrinogens kann dann durch Einstellen des pH des Harz-Proteingemisches auf etwa 4,7 und Sammeln des adsorbierten Überstandes gewonnen werden.

Das Harz-Proteingemisch wird dann auf einen pH von 5,0 bis 5,5 eingestellt und eine bis vier Stunden auf 65°C bis 72°C erhitzt. Vorzugsweise wird der pH auf etwa 5,2 bis 5,3 eingestellt und das Harz-Proteingemisch etwa 1 Stunde auf etwa 70°C erhitzt.

Während der Wärmebehandlung werden die restlichen Globuline, und zwar hauptsächlich die α - und β -Globuline,

denaturiert, während das Albumin nicht denaturiert wird und leicht gewonnen werden kann.

Anschliessend an die Wärmebehandlung wird der pH auf 3,5 bis 4,5 eingestellt, so dass man das gewünschte Albumin aus dem Harz-Proteingemisch auswaschen kann. Vorzugsweise wird das Harz-Proteingemisch vor der pH-Einstellung gekühlt und der pH wird dann auf etwa 4 eingestellt.

Die Albumingewinnung kann mit einer Reihe von Trennverfahren erfolgen, so z.B. durch Sedimentierung, Filtrierung oder Zentrifugierung, vorzugsweise jedoch durch Filtrieren des pH-eingestellten Harz-Proteingemisches, Waschen des Filterkuchens und Sammeln des Filtrats in Form der stark gereinigten Albuminfaktion.

Die Einstellung des pH auf den gewünschten Wert während des beschriebenen Verfahrens kann durch Behandlung mit sauren oder alkalischen Puffern, die klinisch verträglich sind, erfolgen, z.B. mit Natriumacetat-Essigsäurepuffer oder Zitronensäure zur Ansäuerung, oder mit Natriumcarbonat oder Natriumhydroxid zur Erhöhung der Alkalinität.

Vorzugsweise werden auch bekannte Albuminstabilisatoren wie Natriumacetyltryptophan und Natriumcaprylat während der Wärmebehandlung in das Harz-Proteingemisch aufgenommen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

In diesem Beispiel wurde als Polymerharz DEAE-Sephadex A-50 verwendet, das ein im Handel erhältliches, mit Diäthylaminoäthyl substituiertes vernetztes Dextranspolymer ist. Zunächst wurde das Polymerharz in 0,04 mol/l NaCl gewaschen. Plasma aus konserviertem menschlichen Blut wurde mit 3 Teilen Wasser auf 1 Teil Plasma verdünnt und dann mit 2 Gew.-% des gewaschenen Harzes (2 g/100 ml) vermischt. Das Harz-Plasmagemisch wurde auf den pH 6 eingestellt, 30 Minuten gemischt, gefiltert und dann mit 0,002 mol/l NaCl gewaschen. Das Filtrat, das vorwiegend aus Gammaglobulinen, β -Globulinen, Fibrinogen und assoziierten Blutfaktoren bestand, wurde von dem verbleibenden Harz-Proteinfilterkuchen abgetrennt. Dieser Harz-Proteinfilterkuchen, der das adsorbierte Albumin enthielt, wurde auf den pH 5,2 ansäuert. Dem vom Harz adsorbierten Protein wurde soviel Natriumcaprylatstabilisator zugemischt, dass eine 0,012 mol/l Konzentration entstand, ferner wurde NaCl bis zu einer 0,002 mol/l Konzentration zugegeben. Das vom Harz adsorbierte Protein wurde dann 1 Stunde auf 70°C erhitzt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, anschliessend wurde das Material filtriert und das Filtrat beseitigt. Das Albumin wurde aus dem verbliebenen Harz-Proteinfilterkuchen durch Ansäueren mit Zitronensäure auf pH 4,0 in 0,002 mol/l NaCl, anschliessendes halbstündiges Mischen und Abfiltrieren ausgewaschen. Das Filtrat bestand aus der gewünschten Albuminfaktion, die Ausbeute betrug 91,5% (bezogen auf die Albuminkonzentration im Originalplasma), die Reinheit lag bei 95,2%. Die Reinheit des Albumins des aus dem Harz ausgewaschenen Produkts wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese in einem Veronal-Puffer bei pH 8,6 mit einem Corning ACI Elektrophoresapparat bestimmt. Bei dieser Bestimmung wurde ein Coomassie Brilliant Blue R 250 (C.I. 42660) Färbeverfahren praktisch in Übereinstimmung mit dem von Fazekas de St. Groth et al. in Biochem. Biophys. Acta 71, 377-391 (1963) beschriebenen Verfahren angewandt, und für die Ablesungen wurde ein Gelman ACD-15 Densitometer bei 600 nm verwendet. Coomassie Brilliant Blue R 250 ist ein Proteinfarbstoff mit grosser Sensitivität, das sich bis zu 20 µg/cm Cuvettenbreite nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz verhält und bis 0,5 µg/cm Cuvettenbreite empfindlich ist. Aufgrund dieser Empfindlichkeit kann man mit Coomas-

sie Brilliant Blue R 250 Proteinverunreinigungen in dem Albuminprodukt in einem hohen Mass feststellen und die durchgeführte Messung bestätigt die Herstellung eines Albuminproduktes von grosser Reinheit.

Beispiel 2

Das Verfahren von Beispiel 1 wurde wiederholt, jedoch wurde als Ausgangsplasma ein von AHF befreites Plasma verwendet. Ausbeute und Reinheit des Albuminproduktes waren praktisch die gleichen wie in Beispiel 1.

Beispiel 3

Das Verfahren von Beispiel 1 wurde wiederholt, jedoch wurde nach dem ersten Filtrieren und vor der Wärmebehandlung eine Zwischenstufe zur Entfernung von weiteren Globulinen und von Fibrinogen aus dem Plasma eingefügt. In dieser Zwischenstufe wurde der Harz-Proteinfilterkuchen aus der ersten Filtrierung mit Zitronensäure auf einen pH von 4,7 in 0,002 mol/l NaCl eingestellt und 30 Minuten gemischt. Das

Gemisch wurde filtriert, gewaschen und anschliessend der Wärmebehandlung und den nachfolgenden Schritten von Beispiel 1 unterzogen. Das Filtrat aus der Behandlung bei pH 4,7 enthielt α - und β -Globuline sowie Fibrinogen, die für verschiedene bekannte therapeutische oder diagnostische Zwecke zurückbehalten werden können. Ausbeute und Reinheit des endgültigen Albuminproduktes waren praktisch die gleichen wie in Beispiel 1.

Anschliessend an die erfundungsgemäße Gewinnung des gereinigten Albuminproduktes kann das Albumin bis zu einem gewünschten Grad konzentriert und das konzentrierte Produkt kann auf einen physiologisch verträglichen pH und Elektrolytgehalt eingestellt werden; ferner kann es zur Viruszerstörung erhitzt und durch Filtrieren oder ähnliche Verfahren geklärt werden, so dass es klinisch brauchbar ist. Beispiele für brauchbare Konzentrationsverfahren, die verwendet werden können, sind 1. Lyophilisierung, mit nachfolgender Wiederauflösung bis zu dem gewünschten Grad, wie 5% oder 25%, und 2. Ultrafiltration.