

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **241 791 A1**

4(51) G 01 N 33/564

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 281 795 6

(22) 16.10.85

(44) 24.12.86

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, 1080 Berlin, Unter den Linden 6, DD

(72) Hiepe, Falk, Dr. med., DD; Schößler, Werner, Dr. rer. nat., DD; Apostoloff, Emil, Prof. Dr. sc. med., BG; Precht, Klaus, Prof. Dr. sc. med., DD; Heymann, Stephan, Dr. rer. nat., DD

(54) Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen

(57) Die Erfindung offenbart ein Adsorbens zur selektiven und schonenden Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten durch biospezifische Bindung derselben an das Protein C1q, das an siliziumdioxidhaltige feste Phasen mittels Silanhaftmitteln und homo- oder heterobifunktionelle Reagentien immobilisiert ist, wobei die so gebundenen Immunkomplexe durch Abtrennung der festen Phase separiert werden und die feste Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien regeneriert wird.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten auf der Grundlage biospezifischer Wechselwirkungen an festen Phasen, **gekennzeichnet dadurch**, daß als feste Phase siliziumdioxidhaltige Materialien verwendet werden, die nach vorheriger, an sich bekannter chemischer Oberflächenmodifizierung mit Silanhaftmitteln und hetero- oder homobifunktionellen Reagenzien oder direkt mit dem Protein C1q beladen werden und daß nach Bindung der zirkulierenden Immunkomplexe an das C1q der festen Phase durch Perfusion von Körperflüssigkeiten (z. B. Blut, Plasma) und Abtrennung der festen Phase eine Regenerierung der festen Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien und Wiederverwendung der festen Phase erfolgt.
2. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die siliziumdioxidhaltigen Materialien Formkörper aus Glas oder glasähnlichen Materialien sind.
3. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Formkörper als Kugeln vorliegen.
4. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Formkörper als Fasern vorliegen.
5. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kugeln porös sind und eine Porenweite von 0,05 bis 100 μm aufweisen.
6. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kugeln eine Teilchengröße von 1–1000 μm aufweisen.
7. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 2–6, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Formkörper durch Packung, Sinterung oder durch Verwendung eines Bindemittels zu übergeordneten Strukturen mit definierter Durchlässigkeit geformt sind.
8. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 4 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die übergeordneten Strukturen eine vorwiegend flächenförmige Ausdehnung wie Filter, Fritten, Hohlzylinder aufweisen.
9. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 4 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Fasern als Vliese oder Gewebe vorliegen.
10. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß die übergeordneten Strukturen vorwiegend Kolonnenpackungen sind.
11. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Oberflächenmodifizierung des Glases durch Silanhaftmittel und homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien erfolgt.
12. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen nach Punkt 1 bis 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß die nicht denaturierenden Medien gepufferte Lösungen hoher Ionenstärke sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Adsorbens für die selektive Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten unter wiederholtem und reproduzierbarem Einsatz eines beschichteten Trägers. Das Verfahren ist anwendbar in der Pharmazeutischen Industrie sowie der Medizin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es gilt als gesichert, daß den in Körperflüssigkeiten, z. B. im Blut, zirkulierenden Antigen- Antikörper-Komplexen (Immunkomplexen) eine wesentliche pathogenetische Bedeutung bei einer Vielzahl von Erkrankungen (u. a. Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses visceralis und Rheumatoid-Arthritis, Transplantatabstoßung, Infektionen, möglicherweise auch bei Neoplasien) zukommt. Zirkulierende Immunkomplexe können sich an den Gefäßwänden ablagern und über verschiedene Wirkungsmechanismen entzündliche Reaktionen in den jeweils disponierten Organen mit den entsprechenden Symptomen (u. a. Vasculitis, Arthritis, Nephritis, Serositis, Karditis, Cerebritis, Anämie, Leukopenie, Thrombopenie) induzieren. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen korreliert die Immunkomplexkonzentration im Serum/Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten mit der Aktivität der Erkrankung. Deshalb erscheint es sinnvoll, den Pathomechanismus dieser Erkrankungen durch Entfernung zirkulierender Immunkomplexe aus den Körperflüssigkeiten zu beeinflussen, um dadurch das Fortschreiten der oben erwähnten Erkrankungen und unerwünschte Immunreaktionen zu verhindern, die Krankheitsaktivität zu mindern, die damit verbundenen Symptome zu lindern bzw. zu beseitigen. Die Erfolge der Plasmapheresebehandlung werden u. a. auf die Beseitigung bzw. Reduzierung der pathogenetisch bedeutsamen Immunkomplexe zurückgeführt [vgl. E. Apostoloff et al., Dt. Gesundheitsw. **34**, 64 (1979); H. F. Parry et al., Ann. Rheum. Dis. **40**, 224–228 (1981); T. Sharon et al., Plasma Ther. Transfus. Technol. **3**, 163–169 (1982); M. Valbonesi et al., Int. J. Art. Organs **4**, 234–236 (1981); J. V. Jones et al., Arthritis Rheum **24**, 1113–1120 (1981)].

Nachteile dieser Methode sind das nicht selektive Entfernen aller Plasmabestandteile und die dadurch erforderliche Zuführung größerer Mengen Fremdplasma oder Humanalbumin, die auch aus Kapazitäts- und ökonomischen Gründen limitierend sein können. Aus den genannten Gründen existieren seit einigen Jahren Bemühungen um die Entwicklung von Adsorbentien, die eine selektive Entfernung zirkulierender Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten erlauben. Hierbei wurden im wesentlichen folgende Wege beschritten:

- Staphylokokken-Protein A, an einen unlöslichen Träger fixiert (fixierte Staphylokokken, Protein A-Sepharose) [vgl. D. S. Terman et al., J. Immunol. **124**, 795 (1980); New England J. Med. **305** 1195 (1981); E. Behm u. H. Klinkmann, in Plasma Separation and Plasma Fractionation, S. 254–265 (Karger, Basel 1983)]
- Poröses Harz vom Acrylsäureester-Typ [z. B. XAD-7, geliefert von Rohm und Hass Co., USA; vgl. T. Agishi, Zinko Zoki, **9**, 264 (1980)]
- Kationenaustauschglied wie Carboxymethylcellulose [vgl. L. D. Johnson et al., Can. J. Biochem. **42**, (1964)]
- Adsorbens, enthaltend eine Oberfläche und mit der Oberfläche verbunden wenigstens ein hydrophobes Glied mit 6–700 Kohlenstoff-Atomen und wenigstens eine negative Ladung erzeugendes Glied [T. Kuroda et al., japanisches Patent J. P. P58-59199, P58-59197]

Diese Adsorbentien haben jedoch verschiedene Nachteile, Protein A ist in der Lage, Immunkomplexe zu binden; jedoch nicht ausreichend selektiv, denn es bindet ebenfalls nicht immunkomplexgebundenes IgG. Außerdem ist Protein A ein Fremdprotein mit den ihm anhaftenden Nachteilen beim Einsatz des Adsorbens, wenn es in Berührung mit den Körperflüssigkeiten gehalten wird. Die Herstellungskosten für Protein A sind sehr hoch. Die Verwendung inaktivierter Staphylokokken als „natürlichen“ Träger des Protein A ermöglicht den Einsatz des Protein A ohne seine weitere Reinigung, bringt aber zusätzlich Probleme bei Berührung der Körperflüssigkeit mit den inaktivierten Bakterien (z. B. Freisetzen von Pyrogenen) mit sich. Weiterhin sollen Protein A-Träger das Komplementsystem aktivieren.

Das poröse Harz vom Acrylsäureester-Typ und Carboxymethylcellulose besitzen nur ungenügendes Adsorptionsvermögen und unzureichende Adsorptionsspezifität (u. a. wird Albumin aus Körperflüssigkeit absorbiert). Das aus einem hydrophoben und einem eine negative Ladung enthaltenden Glied bestehende Adsorbens ist ebenfalls für die Adsorption von Immunkomplexen nicht ausreichend spezifisch.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, zirkulierende Immunkomplexe selektiv, einfach und schonend aus Körperflüssigkeiten unter Verwendung eines an einer festen Phase (Träger) gebundenen humanen C1q zu entfernen. Die Träger sollen sich einfach, schnell und reproduzierbar zwecks Wiederverwendung regenerieren und sterilisieren lassen.

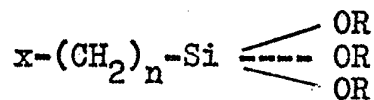
Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, zirkulierende Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten an eine feste Phase (Träger) biospezifisch zu binden, wobei die feste Phase wiederverwendbar und sterilisierbar sein soll. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß das Protein C1q — eine Untereinheit der ersten Komplementkomponente — an siliziumdioxidhaltige Träger, vorzugsweise poröses Glas, Glasfasern oder flächenförmige Glasfaserfilter über Silanhaftmittel kovalent gebunden wird und dieses trägergebundene C1q zur Bindung und Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten eingesetzt wird, wobei die an das C1q gebundenen Immunkomplexe aus den Körperflüssigkeiten durch Abtrennung der festen Phase separiert werden und die feste Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien funktionell regeneriert wird. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das im menschlichen und tierischen Blut vorkommende und für die Bindung von Immunkomplexen und deren physiologische Eliminierung verantwortliche Protein C1q an siliziumdioxidhaltige Träger mit hinreichend großer Oberfläche und Porösität auf an sich bekannte vorherige chemische Oberflächenmodifizierung des Trägers mit Silanhaftmitteln und hetero- oder homobifunktionellen Reagenzien gebunden wird und dieses trägergebundene C1q für die in vivo- und in vitro-Entfernung der zirkulierenden Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten eingesetzt wird und danach die so gebundenen Immunkomplexe durch nicht denaturierende Medien wieder abgespalten werden, so daß die mit C1q beladene Matrix nach Sterilisation erneut eingesetzt werden kann. Der Träger hat eine unterschiedliche geometrische Form, wobei kugelförmige oder faserförmige Träger mit oder ohne Zusätze, die auch durch Packung, Sinterung oder Verwendung eines Bindemittels zu übergeordneten Strukturen (wie Filtern, Fritten und dergleichen) mit definierter Durchlässigkeit angeordnet sein können, besonders geeignet sind. Die siliziumdioxidhaltigen Materialien sind im wesentlichen poröse Gläser (s. hierzu F. Janowski, W. Heyer: Poröse Gläser, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1982), die bekanntlich problemlos sterilisiert und steril gehalten werden können, wobei deren Partikelgröße, Struktur und Porösität genau festgelegt wird. Besonders vorteilhaft sind ideal sphärische Partikel (DD-WP C03B 259 5548, DD-WP B01 J 269 4382, DD-WP B01 J 269 4390) mit Partikelgrößen zwischen 1 bis 1000 µm und Porenweiten von 0,05 bis 100 µm, wobei sich die Porenweiten und die zur Verfügung stehende Fläche, die die Kapazität des Trägers entscheidend beeinflusst, reziprok proportional verhalten. Die ideal sphärische Form der Matrix hat einen entscheidenden Einfluß auf die schonenden Bedingungen des Verfahrens, da die auf die Proteine einwirkenden Scherkräfte drastisch reduziert sind. Des weiteren zeichnen sich die ideal sphärischen und abriebfesten Glaspartikel durch ihre Erosionsbeständigkeit, ihre günstigen hydrodynamischen Eigenschaften, ihre Variationsbreite der Textur und somit auch der Durchflüsseigenschaften sowie durch die Abwesenheit toxischer Bestandteile aus. Insbesondere unter dem Aspekt technologischer Verfahren sind flächenförmige Träger oder Patronen mit Kornmaterial oder Membranen aus porösem Glas mit übergeordneten Strukturen bzw. flächenförmige Träger, die als Filter in geeigneten Filtrationssystemen eingesetzt werden, hervorzuheben. Hier zeichnen sich besonders Glasfasern enthaltende Filtermaterialien aufgrund ihrer mechanischen Festigkeit aus.

Die nicht denaturierenden Medien für die Abspaltung der gebundenen Immunkomplexe setzen sich aus gepufferten Lösungen hoher Ionenstärke zusammen, wobei insbesondere 0,5 bis 3M NaCl-Lösungen geeignet sind.

Auf Haltbarkeit, Handhabung und Wiederverwendung des C1q-beladenen Trägers wirkt sich besonders vorteilhaft aus, daß

Die Oberflächenmodifizierung der siliziumdioxidhaltigen Träger zum Zwecke der Schaffung von Bindungen für das Eingehen kovalenter Bindungen mit dem Protein C1q erfolgt durch sogenannte Silanhaftmittel wie



wobei R Alkylreste und x Amino-, Epoxy-, Diazo-, Sulfhydryl- oder Nitroso-Gruppen sind und durch Umsetzen der verbleibenden funktionellen Gruppe auf an sich bekannte Art und Weise mit homo- oder heterofunktionellen Reagentien oder direkte Umsetzung mit den reaktiven Gruppen des Proteins. Die so mit dem Protein C1q beladene Matrix wird dann zur Bindung und Entfernung der zirkulierenden Immunkomplexe eingesetzt, wobei die Matrix insbesondere im Durchflußverfahren in üblicher Weise (Hämoperfusion, Plasmaperfusion) aber auch im Batch-Verfahren (bei der Isolierung von Immunkomplexen für in vitro-Untersuchungen) genutzt werden kann. Nach Ablauf der Reaktion werden die gebundenen Immunkomplexe durch geeignete nicht denaturierende Medien wie 2 M NaCl-Lösung abgespalten, so daß das kovalent gebundene C1q zu einem erneuten Einsatz zur Verfügung steht. Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt die physiologische Funktion des Proteins C1q für die selektive und schonende Bindung und damit Entfernung von zirkulierenden Immunkomplexen aus Körperflüssigkeiten.

Im folgenden wird die Entfernung an einem Beispiel erläutert.

Beispiel: Poröse Glaskugeln mit einer Porenweite von 1 350 Å werden nach Kochen mit 30%iger Salpetersäure und neutral Waschen mit einer 2%igen Lösung des Silanhaftmittels NB 114 (Aminopropyltriäthoxysilan, VEB Chemiewerk Nünchritz) in Äthanol/Wasser (1:1), pH 3,5 für 4ⁿ bei 60°C und 6ⁿ bei 120°C aktiviert.

Nach Waschen mit Äthanol/Wasser sowie mehrmaligem Waschen mit PBS-Puffer, pH 7,4, wird das so funktionalisierte Glas mit 2%igem Glutardialdehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer wird das aktivierte Glas mit C1q (500 µg/ml) in PBS-Puffer, pH 7,4, der 10 mM EDTA enthält, versetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach weiteren Waschvorgängen werden die noch freien Aldehydgruppen mit 1 M Äthanolaminlösung blockiert. Nach wiederholtem Waschen mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, der 0,05 M NaCl enthält, wird diese mit C1q-beladene Matrix zur Bindung der zirkulierenden Immunkomplexe eingesetzt. Hierzu werden die mit C1q beladenen Glaskugeln mit einem Patientenserum, das erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden Immunkomplexen enthält (Patient mit einem Lupus erythematodes visceralis), im Batch-Verfahren versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Trägers durch Dekantieren oder Zentrifugieren wird dieser im folgenden mit 0,01 M Phosphat-Puffer, pH 7,4, 0,05 M NaCl gewaschen und anschließend mit 2 M NaCl in PBS-Puffer, pH 7,4, regeneriert. Die Bestimmung der Immunkomplexe erfolgte mit einem C1q-Festphasen-Enzymimmunoassay. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindungen an den Träger wurde die Eiweißkonzentration im spezifischen Eluat nach Lowry bestimmt sowie eine Immunelektrophorese durchgeführt. Tabelle 1 zeigt ein charakteristisches Ergebnis einer derartigen Behandlung.

Tabelle 1

	zirkulierende Immunkomplexe (µg/ml Äquivalente aggregiertes IgG)	(%)
Patientenserum		
— vor Behandlung	90	100
— nach Behandlung	68	73