



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149135 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 5598/76

(51) Int.Cl.4: C 07 K 3/24

(22) Indleveringsdag: 14 dec 1976

(41) Alm. tilgængelig: 18 jun 1977

(44) Fremlagt: 10 feb 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 dec 1975 DE 2556733

(71) Ansøger: *ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY; Scottsdale, US.

(72) Opfinder: Waldemar *Schneider; DE, Dietrich *Wolter; DE, Christian *Froehlich; DE.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Giersing & Stelling ApS

(54) Fremgangsmåde til fraskillelse af udfældede proteiner fra albuminholdige suspensioner

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fraskillelse af udfældede proteiner fra albuminholdige, ved udvinding af albumin fra blodplasma fremkomne suspensioner.

Ved udvinding af albumin fra blod, blodprodukter, albuminholdige legemsvæsker og lignende fremkommer en albuminholdig suspension, som foruden det opløste albumin indeholder udfældede proteiner, navnlig globuliner. I DE-offentliggørelsesskrift 2.415.079 er i denne henseende beskrevet en fremgangsmåde til isolering af albumin fra menneskeligt blod o.l., hvilken fremgangsmåde omfatter følgende trin:

- 2 -

- (a) Fraskillelse af plasmaen fra de faste og størkningsfremmende opløselige bestanddele af blodet og, om ønskes, udvinding af de opløste ikke-albuminholdige bestanddele,
- (b) Udfældning af globulinerne ved opvarmning af restvæsken i nærværelse af 7 til 12 vol-% alkoholer med sammensætningen $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, hvor $n = 0, 1$ eller 2 , og albuminstabilisatorer, som fx. natriumcaprylat, til temperaturer mellem 60°C og 75°C og fraskillelse af væsken fra globulinerne,
- (c) koncentration af albuminet fra den albuminholdige opløsning.

Fraskillelsen af de udfældede globuliner og af eventuelle andre udfældede proteiner ved hjælp af en varmfældning sker ved den i det nævnte skrift beskrevne fremgangsmåde ved en pH-værdi på 4,4 ved centrifugering i kontinuerlig strøm. De fraskilte proteiner samler sig i rotorerne, og albuminet forbliver i den derover stående væske.

Ved den kendte fraskillellesmetode anses det som en ulempe, at forholdsvis meget albumin forbliver i det fraskilte koncentrat, så at der behøves endnu flere vaske- og centrifugeringsoperationer til udvinding af det værdifulde restalbumin. Desuden er centrifugeringen meget tids- og arbejdskrævende og udvikler stærk larm. Til trods for disse ulemper har man ikke tænkt på nogen anden arbejdsmåde, da det ved den i mange år praktiserede Cohn-metode er almindeligt og nødvendigt at adskille suspensionerne bestående af udfældede globuliner og opløst albumin ved centrifugering. Forsøg har vist, at suspensionerne ved Cohn-metoden ved normale krav praktisk taget ikke kan filtreres.

Man har prøvet forskellige filtreringsmetoder for derved at fjerne de ved den kolde ethanol-fraktionering udvundne udfældede proteiner. Ifølge den indvundne erfaring kan disse bundfældninger ikke med økonomisk fordel udvindes ved filtrering. Dette beror åbenbart på stoffernes særlige konsistens. Trods denne erfaring blev der anvendt forskellige filtreringsmetoder, da man havde konstateret, at globuliner, som udvindes ved varm ethanol-fældning, adskiller sig væsentligt fra de globuliner, som udvindes ved koldfældning.

Imod erfaring og forventning kan man på overraskende måde løse den opgave at skille de varmfældede proteiner fra suspensionen med væsentlig mindre bekostning ved, at fraskillelsen ifølge opfindelsen sker ved en nærmere angivet rotationsrensefiltrering ("Schwemmfiltrierung") af suspensionen, og fremgangsmå-

- 3 -

den ifølge opfindelsen er derfor ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Rotationsrensefiltrering er i og for sig kendt. Rotationsrensefiltreringen sker almindeligvis i centrifugalrensefiltre, som hovedsagelig består af en lukket trykbeholder, i hvilken der på en centralt rorerende, hul aksel er anbragt runde filterskiver, som enten ligger vandret eller lodret parallelt med hinanden. Filterskiverne er almindeligvis forsynet med et metaltrådsvæv.

Til den til filtrering bestemte substans tilsættes filterhjælpemidler, almindeligvis kieselgur, som alt efter resternes uklarhedsart og karakter tilsættes doseret.

Slammet, som samler sig på filterskiverne, bortskylles ved filterskivernes rotation og ved modskylning. Resterne bortledes som såkaldt slam.

Rotationsrensefiltreringen frembyder i det foreliggende tilfælde overraskende fordele, da andre filterarter og filtreringsmetoder kræver så lange filtreringstider, at disse ikke medfører nogen som helst fordele i sammenligning med den tidsspildende centrifugeringsmetode. Følgende filtreringsmetoder blev afprøvet: klaringsfiltrering med kul- og asbestskivefilter, filterlag på cellulosebasis, glasfiberfiltre, sintret glas. De anvendte filtreringsmetoder førte enten til alt for lange filtreringstider, tilstopninger af filterindsatserne eller til uklare filtrerede væsker. Kun anvendelsen af et rotationsrensefilter gør det muligt at opnå klare filtrater, som ikke nødvendiggør en yderligere klaringsfiltrering, og som dermed muliggør en optimal arbejdsmåde ved albuminudvindingen.

Navnlig arbejdes der ved de foreliggende væsker med en maskevidde på 70 - 90 μm . Ved denne maskevidde opnås et optimum mellem opnåelig produktionsmængde og fuldstændig udfiltrering, hvorhos der hver gang kun skal udføres én filtreringsoperation.

Til tilstrækkelig forbedring af filterfladen til den efterfølgende filtrering er det i mange tilfælde fordelagtigt først at foretage en primær påskylning med en neutral væske, ved hvilken filterskiven belægges med en lagtykkelse på ca. 0,5 cm af filterhjælpemidlet. Som filterhjælpemiddel egner sig almindeligvis de i handelen værende kieselgur med mærkebetegnelserne Hyflo-Super-Cel^R, Celite 545^R eller Perlit^R. Derudover egner sig også cellulosefilterhjælpemidler af kendt art, dog med mindre gode filtertydelser. Med dem kan man ligeledes udvinde et i mange tilfælde tilstrækkeligt produkt. Det er fordelagtigt at opkvæl-

- 4 -

de filterhjælpemidlet i forvejen.

Gunstige filtreringseffekter opnås med en vandret anbragt metaltråds-væskive med en maskevidde på 80 μm .

En gunstig receptur består af en suspension af 4 - 6% plasmaprotein og en tilsætning til denne suspension på 20 - 70 g kieselgur-filterhjælpemiddel pr. liter. Denne suspension filtreres derefter. Lavere proteinkoncentrationer betinger i givet fald også lavere filterhjælpemiddelmængder.

For at man også skal kunne udvinde det i slammet (Slurryen) værende albumin foreslås, at det i filterkagen værende, endnu proteinholdige væskevolumen ledes ud gennem en yderligere filterindretning, efter at der er sket enten en rensning ved rotation og modskylning eller en ved cirkulation stedfunden klarering af filterapparatvolumenet. Til forøgelse af udbyttet kan der arbejdes ved et filtreringsovertryk på $4,0 \pm 2,5$ bar.

Opfindelsen er nærmere forklaret i de følgende eksempler. De to eksempler går ud fra to forskellige suspensioner. I eksempel 1 går ud fra en suspension, som er udvundet ved hjælp af fremgangsmåden ifølge DE-offentliggørelses-skrift 2.415.079.

Eksempel 1

Fra menneskeligt blod fraskilles de faste bestanddele (blodceller og blodplader), og størkningsfaktorerne fjernes. Udgangsopløsningen indeholder 5 - 6 % plasmaprotein. Ifølge den i DE-offentliggørelsesskrift 2.415.079 beskrevne fremgangsmåde fjernes størkningsfaktoren VIII og fibrinogenet ved kryo-ethanol-sedimentering. Prothrombin-komplekset fjernes ved absorption. Den oprindelige plasma er HBAG-negativ, har normale transaminase-værdier og indeholder intet synligt hæmoglobin. Til den oprindelige plasma tilsættes natriumcaprylat, indtil der opnås en koncentration på 0,004 mol. Blandingen, som indeholder ca. 9% ethanol, opvarmes ved en pH-værdi på 6,5. pH-værdien opnås ved hjælp af 0,5 n HCl. Temperaturen bringes i løbet af ca. 3 timer ved ensartet varmetilførsel op på 68°C. Derefter afkøles væsken til 10°C. Suspensionen forarbejdes videre i et med yderkappe afkøleligt rotationsrensefilter ved 10°C. Den til videreförarbejdning bestemte opløsning indeholder 2 - 2,5% albumin.

På tegningen er i en principskitse vist, hvorledes udgangsopløsningen forarbejdes. Den centrale indretning i hele anlægget er en filterbeholder 20 med dobbeltvæg, så at man ved hjælp deraf kan foretage såvel opvarmning som afkø-

- 5 -

ling. Beholderen har en kapacitet på ca 220 liter og en filteroverflade på ca. 3m^2 . De runde filterskiver 22 er forbundet med en central drejelig hul aksel 21 på en sådan måde, at filtratet, efter at det er trådt gennem filteroverfladen og det filtermedium, som dækker hver filterskive, strømmer ind i midtersøjlen og derefter bortsuges gennem en ledning 23 og en klarløbsventil 8 til en klarings-tank. Filterskiverne er overspændt med et metaltrådsvæv. Filterskiverne udgør i princippet en hul kasse, som står i forbindelse med en hul aksel 21. Filterhjelpe-midlet og de udfældede globuliner fjernes mellem filtreringoperationerne ved centrifugal udslyngning fra filterskiverne, som eftervaskes med 1% NaCl-opløsning, så at filteret derefter atter er forberedt til den næste operation.

Den ufiltrerede udgangsløsning holdes under stadig omrøring (røreværk 3) i suspension i en beholder 24. Ved hjælp af en pumpe 2 indføres udgangssubstansen gennem en tilløbsventil 10 og to indløbsventiler 11, 12 i filterbeholderen 20. Beholderen kan ved hjælp af en trykluftventil 5 forsynes med trykluft.

Først belægges filterelementerne med i destilleret vand suspenderet filterhjelpe-middel i en suspension på et kg Celite 545^R (varemærke for kieseler-hjelpe-middel) i 500 l vand med en primærpåskylning på ca. 0,2 cm tykkelse ved atmosfæretryk. Derefter tilsættes 25 kg Celite 545^R til 500 l albuminholdig suspension og omrøres. Blandingen føres fra beholderen 24 til filterbeholderen 20 og trykkes ved et overtryk på 2 bar gennem elementerne 22's filterflader. Inden den egentlige bortledning af den filtrerede væske til klaringstanken sendes substansen i kredsløb (kredsløbsventil 6, pumpe 2) gentagne gange gennem filterelementerne, indtil filtratet fremtræder tilstrækkeligt klart i et skueglas 25. Derefter bortledes filtratet gennem ventilen 8 til klaringstanken.

Så snart den rensede, albuminholdige opløsning forlader filtret, pumpes samtidig en 1% vandig kogsaltopløsning gennem filtret. Mængden af denne opløsning er omtrent lig med det halve volumen af den anvendte albuminholdige suspension, dvs. i udførelseseksemplet ca. 250 liter.

Gennemstrømningsmængden er ca. 150 liter/time. Proteinkoncentrationen i filtratet ved begyndelsen af processen andrager ca. 2,5%, medens slutkoncentrationen andrager ca. 0,05%. Den fremkomne opløsning er klar med en proteinkoncentration på ca. 1,5% (albumin) og en osmolalitet på ca. 1000 mosm.

Det klare filtrat diafiltreres derefter under anvendelse af et milipore pellicon kassette-system (filteroverflade ca. $0,9\text{m}^2$, producent: Millipore GmbH, Neu-Isenburg, Tyskland) indtil der er opnået en 25% proteinopløsning med en os-

- 6 -

molalitet mellem 100 og 200 mosm. Gennemstrømningsmængden ved begyndelsen af processen er ca 5 - 6 liter filtrat/minut. Diafiltrering er en filtrering gennem en dialysemembran.

Filterrensningen sker ved rotation af filterelementerne ved hjælp af en drivmotor 1 og bortledning af slammet gennem en udløbsventil 9. Gennem ventilen 4 kan den bortledte substans endnu engang påslynges og filtreres.

Væsken udviser allerede efter gennemgang af det første filter ingen Tyndall-effekt og er vandklar. Væsken er praktisk taget fri for ledsagesubstanser, såsom lipider eller fremmede proteiner. Den kan også direkte tilføres til albuminberigelsen og den i det følgende beskrevne filtreringsproces.

Albuminberigelsen er i og for sig kendt og beskrevet i det nævnte DE-offentliggørelsesskrift 2.415.079.

I princippet udføres ialt følgende operationer:

Plasma, 600 kilo, som indeholder:

33,6 kg protein, deraf 18,48 kg albumin (=55%)

1. + 9% ethanol
+ 0,004 M natrium-caprylat
+ HCl (til pH 6,5)
2. Varmfældning: 30 minutter, 68° C
3. + HCl pH 4,4
4. rotationsrensefiltrering

Filtrat

5. diafiltrering (koncentrering og dialyse)
6. + NaOH pH 7,0
7. klarfiltrering.

Albumin-opløsning med 17,2 kg albumin (virkningsgrad 93%)

Eksempel 2:

Fra et placenta-ekstrakt fjernes først det tilstedeværende hæmoglobin ved hjælp af opløsningsmidler som fx. trichloreddikesyre, chloroform, eller diethylether. Derefter opvarmes den proteinholdige væske ved pH 6,5 til 68°C. Efter afkøling og indstilling af pH-værdien på 4,4 ved tilsætning af 0,5 n-HCl tilsættes under omrøring til den opnåede væske 3 kg filterhjælpemiddel (filter-

- 7 -

hjælpemiddel: Hyflo-Super-Cel^R, varemærke for et kieselgur-filterhjælpemiddel).

Ved en temperatur på 18°C og et tryk på 4 bar trykkes væsken gennem det allerede beskrevne påskylningsfilter med en maskevidde på 70 µ. Der arbejdes følgelig uden primær påskylning. Væsken føres i kredsløb, indtil den i skueglas-set fremtræder vandklar og fri for Tyndall-effekt. Derefter bringer man ved den kendte fremgangsmåde det i væsken værende albumin til den ønskede koncentration.

Efter gennemstrømning af den samlede væske eftervaskes den i påskylningsfiltret værende filtreringsrest med destilleret vand eller en 0,9% NaCl-opløsning. Også den herved fremkomne væske er vandklar og indeholder endnu 0,5 - 20% albumin. Den kan ligeledes tilføres direkte til albumin-koncentreringen, således som det fx. er beskrevet i DE-offentliggørelsesskrift 2.415.079.

Det skal bemærkes, at filtreringen på rotationsrensefilteret kan foretages både med og uden primærpåskylning. Rensningen af filterskiverne sker ved rotation og modskylning, idet filterskiverne sættes i rotation, og resterne bortledes som slam.

Ved anvendelse af tilstrækkelig vaskevæske (dest. vand eller NaCl-opløsning) kan opnås en udbytteforøgelse til ca. 96% af den tilførte albuminmængde. De ved andre separationsmetoder som fx. centrifugeringsteknikken, navnlig ved elueringen af de først fraskilte proteiner fremkomne spildstofmængder - forårsaget ved ændring af tæthedsforholdet opløsningsmiddel:faststof og fineste mekaniske fordeling - undgås ved en restvolumenfiltrering, efter at enten en rensning ved rotation og modskylning eller en klaring af filterapparatvoluminet ved cirkulation har fundet sted. En filtrering inden den videre forarbejdning af den fortyndede albuminopløsning kan på grund af den store renhed undlades.

Fraskillelsen af de faste stoffer er uafhængig af temperaturen. Filtreringshastigheden ændrer sig kun lidt med tiltagende eller aftagende temperatur og kan lades ude af betragtning. Almindeligvis bringes den til pH 4,4 syrnede, varmebehandlede plasma til udskillelse ved stuetemperatur i et med yderkappe afkøleligt rotationsrensefilter. Filtreringsprocessen kan også finde sted ved andre temperaturer. Erfaringen har vist, at et temperaturområde på 4° til 40°C er muligt som arbejdsområde. Filtreringstrykket kan efter den næsten trykløst stedfindende primærpåskylning forøges til $4,0 \pm 2,5$ bar. Den derved fremkommende filtreringseffekt andrager ca. 150 liter filtrat/m²/time. Som filterhjælpemiddel har, som allerede nævnt, kieselgur vist sig særlig egnede.

De i eksemplerne nævnte mængder er variable, alt efter filterkapacite-

- 8 -

ten. Der blev foretaget forsøg både i små volumina (ca. 10 liter) og i større beholdere (ca. 500 liter) med samme gode resultater.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fraskillelse af ved varme udfældede proteiner fra albuminholdige, ved udvindingen af albumin fra blodplasma fremkomne suspensioner, k e n d e t e g n e t ved, at proteinerne frafiltreres på et rotationsrensefilter i en lukket trykbeholder på filterskiver, som er belagt med en filterdug med en maskevidde på 20 - 200 μ , og at filtreringen sker under anvendelse af et filterhjælpemiddel.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at maskevidden er 70 - 90 μ .
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 og 2, k e n d e t e g n e t ved, at filtreringen sker ved vandret anbragte filterskiver udspændt på metaltrådsvæv med en maskevidde på 80 μ .
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at der til en suspension med 4 - 6% plasmaprotein sættes 30 - 70 g kieselgur-filterhjælpemiddel pr. liter.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et cellulose-filterhjælpemiddel i forkvældet tilstand.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 og 5, k e n d e t e g n e t ved, at det i filterkagen værende, endnu proteinholdige væskevolumen ledes ud gennem en yderligere filterindretning, efter at der er sket enten en rensning ved rotation og modskylning eller en ved cirkulation stedfunden klaring af filterapparatvolumenet.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 og 5, k e n d e t e g n e t ved, at der arbejdes ved et filtreringsovertryk på 4,0 \pm 2,5 bar.

Fremdragne publikationer:

