



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 399 095 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 827/86

(51) Int.Cl.⁶ : A61K 37/02
A61K 35/16

(22) Anmeldetag: 27. 3.1986

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1989

(45) Ausgabetag: 27. 3.1995

(56) Entgegenhaltungen:

DE-OS3504385 AT-PS 336182 AT-PS 324549 DE-OS2323422
FIRMANANSCHRIFT DER PHARMACIA FINE CHEMICALS "ION
EXCHANGE CHROMATOGRAPHY", HERAUSGEgeben IM MÄRZ 1980,
ROHM& LUND, UPPSALA, SCHWEDEN, SEITEN 43 BIS 54.
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 255, NR. 4,
1980, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC.,
USA, SEITEN 1242 BIS 1247.
PREPARATIVE BIOCHEMISTRY, VOL. 13 (3), 1983, MARCEL
BEKKER JOURNALS, NEW YORK, SEITEN 191 BIS 214.

(73) Patentinhaber:

VUKOVICH THOMAS DR.
A-1080 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR AUFTRENNUNG VON PROTEINEN MITTELS GRADIENTENELUTION UND VORRICHTUNG ZUR
DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

(57) Verfahren zur Auftrennung von an Anionentauschergelen, insbesondere DEAE-Gelen, adsorbierten Proteinen, die aus Humanplasma, aus Beständen von Zellkulturen durch Gradientenelution erhalten wurden, wobei das Gel mit den daran adsorbierten Proteinen in einer Chromatographiersäule mit Pufferlösungen von graduell sich ändernder Ionenstärke und etwa konstantem pH-Wert oder von graduell sich änderndem pH-Wert und etwa konstanter Ionenstärke gradientenluiert und das Eluat in Fraktionen, insbesondere in die Fraktion Transferrin, Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Protein C und/oder Protein S, aufgetrennt wird.

B

AT 399 095

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Auf trennung von an Anionentauschergele, insbesondere DEAE-Gelen, adsorbierten Proteinen aus Humanplasma, aus Überständen der Humanplasma-Kryoproteine oder aus Überständen von Zellkulturen durch Gradientenelution mit Pufferlösungen von graduell sich ändernder Ionenstärke und etwa konstantem pH-Wert oder von graduell sich änderndem 5 pH-Wert und etwa konstanter Ionenstärke.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Literaturbekannt ist, daß bei Zugabe von Gelen, die an ihrer Oberfläche geladene Gruppen tragen, zu Blutplasma eine Vielzahl von Plasmaproteinen an das Gel adsorbiert werden. Welche Proteine an diese Gele gebunden werden, hängt ab 1. von der Art der funktionellen Gruppe am Gel, ob diese positiv oder 10 negativ geladen ist und daher Anionen oder Kationen anlagert, sowie von der Dissoziationskonstante der geladenen Gruppe und 2. von den Bedingungen, bei denen das jeweilige Gel mit dem Blutplasma gemischt wird, wobei vor allem die Ionenkonzentration, die Art der gelösten Ionen und die Temperatur bedeutsam sind.

Wenn dem Blutplasma Gele zugesetzt werden, die als funktionelle Gruppe eine anionenaustauschende 15 Wirkung haben wie z.B. Diäthylaminoäthyl-Gele (DEAE-Gel), werden bekannterweise Plasmaproteine an das Gel gebunden, die mit dem Sammelbegriff "Faktoren des Prothrombinkomplexes" bezeichnet werden. Das Protein-beladene Gel kann darauf einfach vom Restplasma abgeschleudert werden. Da die Bindungsfestigkeit der Plasmaproteine zu ionenaustauschenden Gelen mit steigender Ionenkonzentration in der umgebenden Lösung abnimmt, können mit Lösungen hoher Ionenstärke die Proteine von dem Gel desorbiert 20 werden. In den Patenten DE-PS 2 715 832, DDR-Patent 148 297, DDR-Patent 141 262, Europ. Patent 0041173 sind Verfahren beschrieben, mit denen die Faktoren des Prothrombinkomplexes aus dem Blutplasma an DEAE-Gele adsorbiert und gemeinsam, das heißt ohne Auf trennung in einzelnen Komponenten des Prothrombinkomplexes, durch Waschen der Gele mit Lösungen hoher Ionenstärke desorbiert werden.

Sowohl aus der angeführten Patentliteratur als auch aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, 25 daß in der Plasmafraktion "Prothrombinkomplex" verschiedene Proteine enthalten sind, wie z.B. die Blutgerinnungsfaktoren F II, F VII, F X. Weiters sind darin enthalten die Hemmkörper der Blutgerinnung Protein C und Protein S, sowie oft auch Transferrin. Die Komponenten des Prothrombinkomplexes haben unterschiedliche biologische Wirkungen; die Wirkung der Blutgerinnungsfaktoren ist sogar völlig gegensätzlich zur Wirkung der Hemmkörper der Blutgerinnung.

Aus der medizinischen Fachliteratur ist bekannt, daß es Gen-Defekt-Krankheiten gibt, bei denen die 30 betroffenen Patienten eine Komponente des Prothrombinkomplexes nicht synthetisieren können und daher im Blutplasma dieser Patienten ein Mangel an dieser Komponente vorliegt. Besteht Mangel an einem Gerinnungsfaktor, so leiden die betroffenen Patienten an Bluterkrankheit; z.B. bedeutet Mangel an Faktor IX Haemophilie B; besteht Mangel an einem der beiden Hemmkörper der Gerinnung, so leiden die betroffenen 35 Patienten an Thromboembolien. Für die Therapie dieser, im klinischen Krankheitsbild völlig gegensätzlichen Leiden, nämlich Bluterkrankheit und Thrombosekrankheit, wird derzeit ein und das selbe Plasmaderivat, nämlich "Prothrombinkomplex", für die Substitution des Mangelzustandes verwendet. Dies erscheint nicht sinnvoll, da bei Bluterkranken die gleichzeitige Verabreichung von Hemmkörpern der Blutgerinnung (neben den dem Patienten fehlenden Gerinnungsfaktor) die Blutungsneigung noch verstärken kann, bei Thrombose- 40 kranken die gleichzeitige Verabreichung von Gerinnungsfaktoren (neben den dem Patienten fehlenden Hemmkörpern) das Thromboserisiko noch verstärken kann. Therapeutisch wesentlich sinnvoller wäre es, die im Prothrombinkomplex enthaltenen Komponenten zu trennen, sodaß Patienten mit Mangel an einem der genannten Gerinnungsfaktoren mit einem Präparat behandelt werden können, das nur den dem Patienten fehlenden Gerinnungsfaktor enthält und frei von Hemmkörpern ist, und Patienten mit Mangel an 45 einem der beiden Hemmkörper mit einem Präparat behandelt werden können, das nur den fehlenden Hemmkörper und keine Gerinnungsfaktoren enthält.

In der DE-OS 35 04 385 wird ein chromatographisches Verfahren zur Reinigung des Faktor VIII-Komplexes von anderen Plasmaproteinen beschrieben, wobei der Faktor VIII-Komplex an ein geladenes Gel adsorbiert und mittels Gradientenelution vom Gel eluiert wird. Zur Verwendung kommen sulfatgruppenhaltige 50 Harze. Das Ergebnis des Verfahrens ist die Gewinnung einer einzigen Fraktion aus dem Blutplasma.

Wünschenswert ist dagegen die Auf trennung des Plasmaproteins in möglichst viele Einzelfraktionen.

Auch gemäß der AT-PS 336 182 wird auf Ionenau stauscherharz adsorbiertes Humanplasma selektiv eluiert, doch auch hier wird nur eine einzige Fraktion präpariert, die alle Gerinnungsfaktoren des Prothrombinkomplexes gemeinsam enthält.

55 Dagegen ist aus der wissenschaftlichen Literatur ein Verfahren bekannt, mit dem die Komponenten des Prothrombinkomplexes weitgehend voneinander getrennt werden können (z.B. S.P. BAJAJ et al. Preparative Biochemistry, 13 (3), 191-214, 1983). Dieses Verfahren geht über eine Reihe von Verfahrensschriften: 1. Sättigung des Plasmas mit Ammonsulfat bis 33 %, 2. Abschleudern der gefällten Proteine, 3. Anreicherung

- des Präzipitatüberstandes mit Ammonsulfat bis 66 oder 70 % Sättigung, 4. Abschleudern der gefällten Proteine, 5. Wiederauflösung dieser Proteine in saliner Lösung, 6. Zugabe von Bariumsalz (BaCl oder BaSO₄), 7. Abschleudern der gefällten Proteine, 8. Wiederauflösung dieser Proteine in saliner Lösung, 9. Adsorption der Proteine an eine DEAE-Gelsäule, 10. fraktionierte Desorption der Proteine mit Gradientenelution (Gradient ansteigender Ionenstärke im Elutionspuffer), da nach dieser Gelchromatographie die einzelnen Komponenten des Prothrombinkomplexes noch immer nicht vollständig getrennt erhalten werden, wird schließlich 11. eine präparative Acrylamid-Elektrophorese durchgeführt (die Reihenfolge der Schritte 1-8 kann so geändert werden, daß die Barium-Fällung vor der Differentialfällung mit Ammoniumsulfat durchgeführt wird).
- 10 Das oben beschriebene Fraktionierungsverfahren ist ausschließlich geeignet, die Faktoren des Prothrombinkomplexes im Labormaßstab für biochemische in vitro Versuche oder für Immunisierungsversuche an Tieren zu präparieren. Verfahrensschritt Nr. 11 kann nach dem Stand der Technik nur mit geringen Mengen Eiweiß (unter 5.000 Plasmainheiten von z.B. Faktor IX) durchgeführt werden. Die Schritte 1-10 sind dermaßen zeitaufwendig, daß sie nur unter dem Schutz von Proteaseinhibitoren (z.B. Benzamidin) durchgeführt werden können, um den enzymatischen Abbau der Proteine während des langwierigen Verfahrens zu mindern. Diese Proteaseinhibitoren sind aber bekanntermaßen von so hoher Toxizität, daß die Anwendung von Eiweißpräparationen am Menschen, die unter z.B. Benzamidin-Schutz hergestellt wurden, nicht zu vertreten ist.
- 15 Daher besteht ein großer Bedarf nach einem Verfahren, mit dem die Komponenten des Prothrombin-20 komplexes und auch Transferrin im großtechnischen Maßstab ohne Verwendung von Proteaseinhibitoren soweit gereinigt werden können, daß der Reinigungsgrad der Komponenten mindestens gleich hoch ist, wie nach den beschriebenen kleintechnischen Verfahrensschritten 1-10. Die nach diesem Verfahren hergestellten Produkte sollen für die Anwendung am Menschen entsprechend der Europäischen Pharmakopoe geeignet sein.
- 25 Ziel der Erfindung ist aber nicht nur die Trennung bzw. Reinigung der Komponenten des Prothrombin-20 komplexes, sondern allgemein die Trennung von Proteinen, die an Ionen-tauschergelen adsorbierbar sind. Wie aus dem Humanplasma können auch aus Überständen von Zellkulturen wichtige Proteine mit Ionen-tauschergelen entnommen werden, die erfindungsgemäß aufgetrennt werden sollen.
- 30 Das neue Verfahren zur Auftrennung von an Anionentauschergelen, insbesondere DEAE-Gelen, adsorbierten Proteinen aus Humanplasma, aus Überständen der Humanplasma-Kryoproteine oder aus Überständen von Zellkulturen durch Gradientenelution mit Pufferlösungen von graduell sich erhöhender Ionenstärke und etwa konstantem pH-Wert, wobei die Ionenstärke der Pufferlösung im Bereich zwischen 100 bis 400 mVal und 400 bis 4000 mVal kontinuierlich verändert und der pH-Wert der Lösung auf einem Wert im Bereich von 5,0 und 8,0 etwa konstant gehalten wird oder von graduell sich verringerndem pH-Wert und 35 etwa konstanter Ionenstärke ist dadurch gekennzeichnet, daß bei einem Verfahren von graduell sich änderndem pH-Wert und etwa konstanter Ionenstärke der pH-Wert der Pufferlösung im Bereich zwischen 9,0 und 3,0 kontinuierlich verändert und die Ionenstärke auf einem Wert im Bereich von 100 bis 4000 mVal, vorzugsweise zwischen 100 und 400 mVal, etwa konstant gehalten wird, daß die durch Gradientenelution eluierte Lösung in mindestens einer direkt an die Gelsäule angeschlossenen zweiten, unbeladenes äquiliertes Gel enthaltenden Gel-Säule oder in einer unterhalb des mit Protein beladenen Gels in der Chromatographiersäule angeordneten Schicht aus unbeladenem, äquilibriertem Gel weiter gereinigt wird und daß das Eluat in Fraktionen, insbesondere in die Fraktion Transferrin, Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Protein C und/oder Protein S, aufgetrennt wird.
- 40 Vorteilhaft ist es, wenn das Anionentauschergel mit den daran adsorbierten Proteinen vor der Gradientenelution mit einer Pufferlösung geringster Ionenstärke oder höchsten pH-Wertes äquilibriert wird.
- 45 Das Ende der Äquilibrierung bzw. die Einteilung in Fraktionen erfolgt dabei am besten durch Kontrolle der UV-Extinktion des Eluats.
- 50 Zur Einstellung des Elutionsgradienten im Eluiermittel wird vorzugsweise entweder eine Pufferlösung der Ionenstärke 100 - 400 mVal zunehmend mit einer Pufferlösung der Ionenstärke 400 - 4000 mVal oder eine Pufferlösung des pH-Wertes 6 bis 8 mit einer Pufferlösung des pH-Wertes 5 bis 7 versetzt.
- 55 In der Regel werden die Fraktionen durch immunologische Methoden unter Verwendung von für die nachzuweisenden Proteine spezifischen Antisera oder durch für die nachzuweisenden Proteine spezifische funktionelle Methoden identifiziert und voneinander abgegrenzt.
- Vorzugsweise wird die Fraktion Protein C nach dem folgenden Testverfahren von gerinnungsfördernden Komponenten abgegrenzt:
- Inkubation einer Probe des Eluates mit insolublem Thrombin, Entfernung des Thrombins durch Zentrifugation, Mischen des Überstands im Verhältnis 1 + 1 mit Normalplasma, Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit des Gemisches im Vergleich mit einem Kontrollansatz bestehend aus Normalplasma

und Puffer, wobei Verlängerung der aktivierte partiellen Thromboplastinzeit gegenüber der Pufferkontrolle Anwesenheit von Protein C in der Testprobe, Verkürzung Anwesenheit von Gerinnungsfaktoren in der Probe anzeigen.

Im Folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren nun doch detaillierter am Beispiel der DEAE-Chromatographie eines Prothrombinkomplexes beschrieben.

1. Adsorption von Plasmaproteinen an Ionenaustauschende Gele.

Zu Blutplasma oder einer Blutplasmafraktion (z.B. Blutplasma nach Entfernung der Kryoproteine), wird 10 trockenes oder in wässriger Lösung aufgequollenes Ionenaustausch-Gel zugegeben. Das Gel wird mit der Eiweißlösung solange gerührt, bis die gewünschten Eiweißkörper weitgehend an das Gel adsorbiert sind. Beispielsweise können auf diese Art Transferrin und Faktoren des Prothrombinkomplexes (F II, F VII, F IX, F X, Protein C, Protein S) gemeinsam an DEAE-Gel adsorbiert werden.

Dem Blutplasma, aus dem die Kryoproteine abzentrifugiert wurden, wird zu diesem Zweck bei einer 15 Temperatur von 0-20 °C (vorzugsweise 0 °C) DEAE-Gel (vorzugsweise DEAE-Sephadex A50) in einer Menge von 0.2-10 Gramm pro Liter Plasma (vorzugsweise 0.5 Gramm pro Liter Plasma) zugegeben. Das Gel wird in der Plasmalösung durch Rühren während 1/4-10 Stunden (vorzugsweise 4 Stunden) in Suspension gehalten. Anschließend wird das Gel vom verbleibenden Restplasma getrennt; dies kann durch 20 Sedimentation des Gels im Schwerfeld der Erde oder durch Zentrifugieren und nachfolgendes Abheben des überstehenden Restplasmas erfolgen.

2. Gelchromatographische Trennung der an das Gel adsorbierten Proteine.

Zur Durchführung dieses Verfahrens dient eine Vorrichtung, die eine erste Chromatographiersäule 25 (GS1), gegebenenfalls mit mindestens einer direkt daran in Serie angeschlossenen zweiten Chromatographiersäule (GS2), ein erstes Pufferlösungsreservoir (PR1) in unabhängiger Verbindung mit der bzw. jeder der Säulen, ein zweites Pufferlösungsreservoir (PR2) mit einer Mischeinrichtung (PR3,M) in Verbindung mit der ersten Chromatographiersäule (GS1), UV-Kontrollgeräte (UV) am Ausgang der Säule(n), gesteuerte Ventil-(V)-und Pump-(P)-Einrichtungen sowie Fraktionssammelbehälter (FR) enthält. In der anliegenden 30 Fig.1 ist diese Vorrichtung näher beschrieben.

Die dargestellte Einrichtung erlaubt die vorzugsweise durch Computer gesteuerte Fraktionierung der an das Gel adsorbierten Proteine.

In Säule GS1 wird das proteinbeladene Gel eingefüllt und die Säule verschlossen; in Säule GS2 wird 35 unbeladenes Gel eingefüllt und die Säule ebenfalls verschlossen. Über die Ventile V1 bzw. V3 wird Säule GS1 bzw. Säule GS2 mit Pufferlösung aus dem Pufferlösungsreservoir PR1 eluiert. Puffer 1 soll eine Lösung sein, die hinsichtlich Salzkonzentration und pH-Wert so eingestellt ist, daß die zu fraktionierenden Proteine am Gel adsorbiert bleiben, ungewünschte Proteine, welche geringe Affinität zum Gel besitzen, vom Gel in Säule GS1 abgewaschen werden. Säule GS2 wird mit Puffer 1 äquilibriert. Für die Waschung bzw. 40 Äquilibrierung von Säule GS1 bzw. GS2 kann ein Puffervolumen, das dem 3-fachen Volumen der Säulen entspricht, veranschlagt werden. Der Waschvorgang von Säule GS1 kann über die UV-Messanlage UV1 kontrolliert werden, sobald alle Proteine die unter den Milieubedingungen von Puffer P1 keine Affinität zum Gel besitzen, von der Säule GS1 abgewaschen sind, fällt die UV-Extinktion des Eluates ab, wodurch über die Kontrolleinrichtung der Waschvorgang in beiden Säulen beendet werden kann. Die Kontrolleinrichtung 45 stellt sofort die Ventile V1, V2, V3 so, daß die Säule GS1 Zufluß von Pufferreservoir PR2 bekommt, der Abfluß in Säule GS2 geleitet wird, zugleich der Rührer in Pufferreservoir PR2 und die Pumpe, welche Puffer von Reservoir PR3 in Reservoir PR2 leitet, eingeschaltet und Pumpe P2 ausgeschaltet werden. In Pufferreservoir PR2 befindet sich Puffer 1, in Pufferreservoir PR3 befindet sich Puffer 2, welcher hinsichtlich 50 der Salz- und H⁺-Ionen-Konzentration so beschaffen sein soll, daß alle gewünschten Plasmaproteine vom Gel desorbiert werden. Mittels der verbundenen Reservoir PR2 und PR3 wird ein Gradient gebildet (z.B. von geringer zu hoher Ionenstärke), welcher in die Säulen GS1 und GS2 eingeleitet wird. Durch diesen Gradienten werden die verschiedenen Eiweißarten, die am Gel in Säule GS1 haften, entsprechend den Unterschieden ihrer Affinität zum Gel, getrennt eluiert. In Säule GS2 werden die Proteine nochmals kurzfristig an das Gel, dessen funktionelle Gruppen weitgehend unbesetzt sind, angelagert und erst mit weiterem Anstieg des Gradienten desorbiert. Dies führt zu einer wesentlichen Erhöhung der Trennschärfe 55 der Chromatographie. Im Unterschied zu dieser Verfahrensführung kann auch so vorgegangen werden, daß das mit Protein beladene Gel in der Chromatographiersäule mit einer Schicht aus unbeladenem äquilibriertem Gel unterschichtet ist.

Sobald im Eluat der Säule GS2 die UV-Extinktion ansteigt, wird das Eluat über Ventil V4 dem Fraktionssammler zugeleitet. Der Fraktionssammler kann die Fraktionen nach konstantem Volumen sammeln oder auch "Peak-gesteuert" (nach Extinktionsgipfeln) Fraktionen bilden.

5 2.1 Fraktionierung von Transferrin und Faktoren des Prothrombinkomplexes mittels Chromatographie an DEAE-Gel.

Säule GS1 wird mit dem proteinbeladenen DEAE-Gel gefüllt. Säule GS2 wird mit dem gleichen Gelvolumen wie Säule GS1 mit DEAE-Gel (vorzugsweise DEAE-Sephadex A50) gefüllt. Dieses Gel soll in 10 Puffer P1 aufgequollen sein (vorzugsweise besteht Puffer P1 aus 0.02 M Phosphat, 0.01 M Zitrat, 0.15 M NaCl in H₂O, pH 6.0 bei 20 °C mit NaOH eingestellt). Die Säulen werden getrennt mit Puffer P1 gewaschen (vorzugsweise 3 Liter Puffer pro Liter Säulenvolumen). Anschließend werden die Säulen in Serie geschaltet und die Gradienten-Elution wird begonnen, wobei Pufferreservoir PR2 mit Puffer P2 gefüllt wird (vorzugsweise mit einem Volumen von 3 l Puffer pro 1 Gel in Säule GS1), Pufferreservoir PR3 mit Puffer P2 15 (vorzugsweise gleiches Volumen, wie in Reservoir PR2) (vorzugsweise besteht Puffer P2 aus 0.02 M Phosphat, 0.01 M Zitrat, 0.5 M NaCl in H₂O, pH 6.0 bei 20 °C mit NaOH eingestellt). Sobald in der Säule GS2 nachgeschalteten UV-Messanlage ein Anstieg der UV-Extinktion gemessen wird, werden 20 Fraktionen gesammelt (vorzugsweise wird ein Eluat-Volumen von 1/2 Liter pro Fraktion gesammelt, wenn das gesamte Volumen in Reservoir PR2 und PR3 20 Liter beträgt = 40 Fraktionen). Von jeder Fraktion wird eine Referenzprobe für die Analyse gezogen. Diese Referenzproben werden auf den Eiweißgehalt, den Gehalt an Faktoren II, VII, IX, X, sowie den Gehalt von Protein C und Protein S untersucht (vorzugsweise nach den später angeführten Methoden).

Fig. 2 zeigt ein charakteristisches Chromatogramm, aus dem das Elutionsverhalten von Transferrin, sowie der Komponenten des Prothrombinkomplexes ersichtlich ist. Wenn eine Eiweißkomponente in 25 mehreren benachbarten Fraktionen eluiert wurde, wurden diese Fraktionen gepoolt und nach bekannten Verfahren für die Anwendung am Menschen "endverarbeitet" (Dialyse, Hitzebehandlung zur Virusinaktivierung, "Bulklyophilisation", Lösen in Wasser und Einstellen des Salzgehaltes und des pH-Wertes, Sterilfiltration und Abfüllung in Flaschen, Lyophilisation des Endproduktes).

Die Reihenfolge der Elution kann bei verschiedenen Bedingungen von Ausgangsstoffen und Verfahrensparametern gelegentlich variieren. Besonders günstig ist das Verfahren zur Isolierung von Protein C.

Im Folgenden werden die Methoden für die Bestimmung von Transferrin, Faktor II, VII, IX und X, Protein S und Protein C angegeben.

Transferrin:

35 Elektroimmundiffusions-Methode nach Laurell unter Verwendung eines Antiserums spezifisch für humanes Transferrin.

Faktor II:

40 Elektroimmundiffusionsmethode nach Laurell unter Verwendung eines Antiserums spezifisch für humanen Faktor II. Funktionelle Bestimmung mittels der Thromboplastin-Zeit unter Verwendung eines Faktor II-Mangelplasmas.

45 Faktor VII:

Funktionelle Bestimmungsmethode mittels der Thromboplastinzeit unter Verwendung eines Faktor VII-Mangelplasmas.

50 Faktor IX:

Elektroimmundiffusionsmethode nach Laurell unter Verwendung eines Antiserums spezifisch für humanen Faktor IX. Funktionelle Bestimmung mittels der aktivierte partielle Thromboplastinzeit unter Verwendung eines Faktor IX-Mangelplasmas.

Faktor X:

Funktionelle Bestimmung mittels der Thromboplastinzeit unter Verwendung eines Faktor X-Mangelplasmas.

5

Protein C:

Enzymimmunologischer Nachweis mittels Testkit der Firma Boehringer Mannheim GmbH "ELISA Protein C".

10 Funktionelle Bestimmung: A) Methode nach Th.Vukovich, Wiener Klinische Wochenschrift 97,9,1985,445.

B) Testkit der Behring Diagnostika. Diese Methode erwies sich für die Qualitätskontrolle des Produkts als außerordentlich günstig.

15 Protein S:

Funktionelle Bestimmung mittels Bestimmung der Potenzierung der Hemmwirkung von Thrombin-Sepharose-aktiviertem Protein C auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit.

20 Indikation der mit dem Verfahren trennbaren Proteinfraktionen

1. Fraktion Transferrin

Anwendung bei angeborenem oder erworbenem Mangel an Transferrin; bei Eisenmangel-Anämie; bei bakteriellen Infektionskrankheiten; bei malignen Neoplasien.

25 2. Fraktion Faktor II

Anwendung bei angeborenem oder erworbenem Mangel an Faktor II; Anwendung gemeinsamt mit Fibrinogen als "Fibrinkleber" in der Wundbehandlung.

3. Fraktion Faktor VII

Anwendung bei angeborenem oder erworbenen Mangel an Faktor VII; Anwendung bei Hämophilie A; Anwendung bei Hämophilie B.

30 4. Fraktion Faktor IX

Anwendung bei angeborenem oder erworbenen Mangel an Faktor IX; Anwendung bei Hämophilie A.

5. Fraktion Faktor X

Anwendung bei angeborenem oder erworbenem Mangel an Faktor X; bei Hämophilie A; bei Hämophilie B.

35 6. Fraktion Protein C

Anwendung bei angeborenen oder erworbenem Mangel an Protein C; bei arteriellen Verschlußkrankheiten, bei venösen Verschlußkrankheiten; bei Thromboembolie; bei Intravasaler Disseminierter Gerinnung (Verbrauchskoagulopathie); zur Thromboseprophylaxe; zur Prophylaxe und Therapie der Markoumar-Nekrose; bei Atemnot-Syndrom (respiratory distress syndrome); bei Protein S-Mangel; bei Cytostatik-Therapie.

7. Fraktion Protein S

Anwendung bei angeborenen oder erworbenem Mangel an Protein S; bei Mangel an Protein C; bei allen weiteren unter 6. angeführten Anwendungsgebieten.

45 8. Kombinierte Fraktion Protein C und Protein S

Anwendung wie unter 6. angeführt.

Charakteristische Zusammensetzung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren getrennten Eiweißfraktionen (Reinheitskriterien)

1. Fraktion Transferrin

50 Mehr als 90% des enthaltenen Eiweiß ist Transferrin; keine Isoagglutinine Anti-A, Anti-B nachweisbar. Weniger als 10 Plasmaeinheiten Faktor II, VII, IX, X, Protein C, und Protein S pro Gramm Transferrin.

2. Fraktion Faktor VII

Keine Isoagglutinine Anti-A, Anti-B nachweisbar. Weniger als 0.2 Plasmaeinheiten Faktor II, IX, X, Protein C, und Protein S pro Plasmaeinheit Faktor VII.

55 3. Fraktion Protein S

In einer Konzentration von 50 Plasmaeinheiten Protein S pro ml Lösung: keine Agglutination mit Erythrozyten der Blutgruppe A oder B sichtbar nachzuweisen; weniger als 10 Plasmaeinheiten Faktor VII, II, IX, X enthalten, mittels nicht aktiverter partieller Thromboplastinzeit keine aktivierte Gerinnungsfaktoren.

ren nachweisbar; nach Inkubation mit Thrombin-Sepharose (40 NIH-Einheiten pro ml für 2 Stunden bei 37°C) und Entfernung der Thrombinsepharose in einer Mischung mit Normalplasma (1 + 1 Teile) keine Verkürzung der aktivierte partielle Thromboplastinzeit feststellbar; weniger als 10 mg Eiweiß enthalten.

4. Fraktion Protein C

5 In einer Konzentration von 50 Plasmaeinheiten Protein C pro ml Lösung keine Agglutination mit Erythrozyten der Blutgruppe A oder B sichtbar nachzuweisen; weniger als 10 Plasmaeinheiten Faktor II, VII, IX, X nachweisbar; nach Inkubation mit Thrombin-Sepharose (40 NIH-Einheiten pro ml Gemisch, 2 Stunden bei 37°C) und Entfernung der Thrombinsepharose in einer Mischung mit Normalplasma (1 + 1 Teile) keine Verkürzung der aktivierte partielle Thromboplastinzeit, sondern Verlängerung dieser Zeit feststellbar; mittels nicht aktiverter partielle Thromboplastinzeit keine aktivierte Gerinnungsfaktoren nachweisbar; weniger als 10 mg Eiweiß enthalten.

10 5. Fraktion Faktor IX

15 In einer Konzentration von 50 Plasmaeinheiten pro ml Lösung FIX keine Agglutination mit Erythrozyten der Blutgruppe A oder B sichtbar nachzuweisen; weniger als 10 Plasmaeinheiten Protein C und Protein S enthalten; mittels nicht aktiverter partielle Thromboplastinzeit keine aktivierte Faktoren nachweisbar (ohne Zugabe von Heparin und/oder Antithrombin III); weniger als 20 mg Eiweiß enthalten.

20 6. Fraktion Faktor II

25 In einer Konzentration von 50 Plasmaeinheiten F II pro ml Lösung keine Agglutination mit Erythrozyten der Blutgruppe A oder B sichtbar nachzuweisen; weniger als 10 Plasmaeinheiten Protein C und Protein S enthalten.

7. Fraktion Faktor X

30 In einer Konzentration von 50 Plasmaeinheiten F X pro ml Lösung keine Agglutination mit Erythrozyten der Blutgruppe A oder B; weniger als 10 Plasmaeinheiten Protein C und Protein S nachweisbar mittels nicht aktiverter partielle Thromboplastinzeit keine aktivierte Gerinnungsfaktoren nachweisbar (ohne Zugabe von Heparin und/oder Antithrombin III); weniger als 20 mg Eiweiß enthalten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auftrennung von an Anionentauschergelen, insbesondere DEAE-Gelen, adsorbierten Proteinen aus Humanplasma, aus Überständen der Humanplasma-Kryoproteine oder aus Überständen von Zellkulturen durch Gradientenelution mit Pufferlösungen von graduell sich erhöhender Ionenstärke und etwa konstantem pH-Wert, wobei die Ionenstärke der Pufferlösung im Bereich zwischen 100 bis 400 mVal und 400 bis 4000 mVal kontinuierlich verändert und der pH-Wert der Lösung auf einem Wert im Bereich von 5,0 und 8,0 etwa konstant gehalten wird oder von graduell sich verringerndem pH-Wert und etwa konstanter Ionenstärke, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei einem Verfahren von graduell sich änderndem pH-Wert und etwa konstanter Ionenstärke der pH-Wert der Pufferlösung im Bereich zwischen 9,0 und 3,0 kontinuierlich verändert und die Ionenstärke auf einem Wert im Bereich von 100 bis 4000 mVal, vorzugsweise zwischen 100 und 400 mVal, etwa konstant gehalten wird, daß die durch Gradientenelution eluierte Lösung in mindestens einer direkt an die erste Gelsäule angeschlossenen zweiten, unbeladenes äquilibriertes Gel enthaltenden Gel-Säule oder in einer unterhalb des mit Protein beladenen Gels in der Chromatographiersäule angeordneten Schicht aus unbeladenem, äquilibriertem Gel weiter gereinigt wird und daß das Eluat in Fraktionen, insbesondere in die Fraktion Transferrin, Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Protein C und/oder Protein S, aufgetrennt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Anionentauschergel mit den daran adsorbierten Proteinen vor der Gradientenelution mit einer Pufferlösung geringster Ionenstärke oder höchsten pH-Wertes äquilibriert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Einstellung des Elutionsgradienten im Eluiermittel eine Pufferlösung des pH-Wertes 6 bis 8 mit einer Pufferlösung des pH-Wertes 5 bis 7 versetzt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Ende der Äquilibrierung bzw. die Einteilung in Fraktionen durch Kontrolle der UV-Extinktion des Eluats erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fraktionen durch immunologische Methoden unter Verwendung von für die nachzuweisenden Proteine spezifischen Antisera oder durch für die nachzuweisenden Proteine spezifische funktionelle Methoden identifiziert

und voneinander abgegrenzt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fraktion Protein C nach dem folgenden Testverfahren von gerinnungsfördernden Komponenten abgegrenzt wird: Inkubation einer Probe des Eluates mit insolublem Thrombin, Entfernung des Thrombins durch Zentrifugation, Mischen des Überstandes im Verhältnis 1:1 mit Normalplasma, Bestimmung der aktivierte partiellen Thromboplastinzeit des Gemisches im Vergleich mit einem Kontrollansatz bestehend aus Normalplasma und Puffer, wobei Verlängerung der aktivierte partiellen Thromboplastinzeit gegenüber der Pufferkontrolle Anwesenheit von Protein C in der Testprobe, Verkürzung Anwesenheit von Gerinnungsfaktoren in der Probe anzeigt.
7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine erste Chromatographiersäule (GS1) mit mindestens einer direkt daran in Serie angeschlossenen zweiten Chromatographiersäule (GS2), ein erstes Pufferlösungsreservoir (PR1) in beliebiger Verbindung mit der bzw. jeder der Säulen, ein zweites Pufferlösungsreservoir (PR2) mit einer Mischeinrichtung (PR3, M) in Verbindung mit der ersten Chromatographiersäule (GS1), UV-Kontrollgeräte (UV) am Ausgang der Säulen, gesteuerte Ventil(V)- und Pump-(P)-Einrichtungen sowie Fraktionssammelbehälter (FR) enthält.

20

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

Ausgegeben

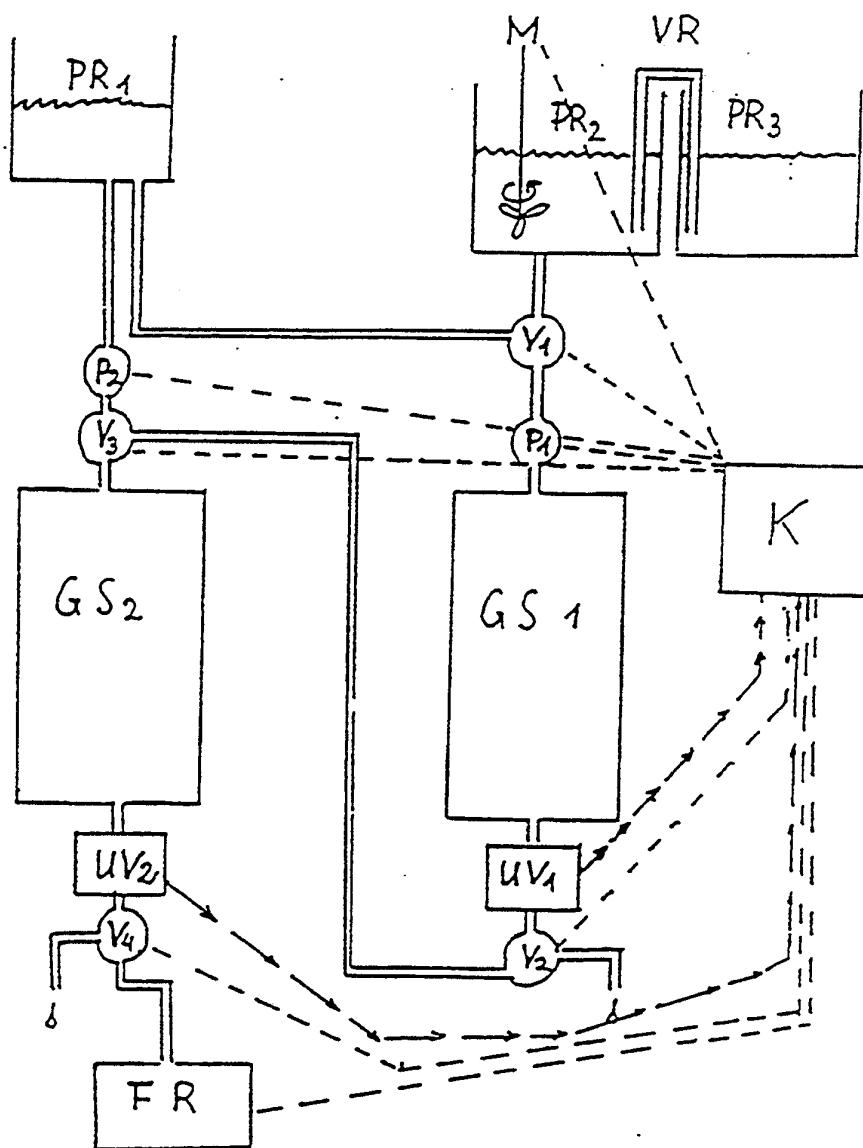
27. 3.1995

Int. Cl.⁶ : A61K 37/02

A61K 35/16

Blatt 1

Fig. 1



PR = Pufferreservoir V = Ventil (3-Weg)

VR = Verbindungsrohr mit P = Pumpe
Entlüftung

Mischung

UV = Ultraviolett-
Licht Messeinheit

P = Pumpe

14

K = Kontrolleinrichtung für Steuerung

GS = Gelsäule

Ergonomics

FR - Fraktionsammler

==== Rohr

→ → → Input zu Kontrolleinrichtung

— — — Output von Kontrolleinrichtung

Ausgegeben

27. 3.1995

Int. Cl.⁶ : A61K 37/02

Blatt 2

A61K 35/16

- UV-Extinction
bei 280nm
- NaCl-Konzentration
fraktion
- 1 = Transferrin
2 = Faktor VII
3 = Protein S
4 = Protein C
5 = Faktor IX
6 = Faktor II und X
- Protein-Fraktionen

Fig. 2

