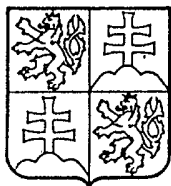


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 658

(21) PV 6959-86.X
(22) Přihlášeno 29 09 86

(40) Zveřejněno 13 12 89
(45) Vydáno 04 06 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 37/02

(75) Autor vynálezu

HIEPE FALK MUDr., BERLÍN,
SCHOESLER WERNER RNDr., SCHWANEBECK,
APOSTOLOFF EMIL prof.,
PRECHT KLAUS prof.,
HEYMANN STEPHAN RNDr., BERLÍN (DE),
ČOUPEK JIŘÍ ing., PRAHA (CS),
BECKER MANFRED RNDr., BERLÍN (DE)

(54)

Selektivní adsorbens pro vázání
imunokomplexů

(57) Řešení popisuje adsorbens pro selektivní odstranění cirkulujících imunokomplexů z tělních tekutin jejich biospecifickým vázáním na protein Clq, který je imobilizován spojovacím můstkem na kopolymery hydroxyethylmethakrylátu nebo na materiály obsahující celulózu nebo kysličník křemičitý jako pevné fáze, přičemž takto vázané imunokomplexy jsou odstraňovány oddělením pevné fáze a pevná fáze je regenerována působením nadenaturujících médií.

Vynález se týká adsorbentu pro selektivní vázání cirkulujících imunokomplexů obsažených v tělních tekutinách, prováděné pomocí opakovaného a reprodukovatelného použití povlečeného nosiče. Postup je použitelný ve farmaceutickém průmyslu i v lékařství.

Je prokázáno, že v tělních tekutinách, například v krvi, mají cirkulující imunokomplexy podstatný pathogenetický význam u řady onemocnění (mj. u antiimunitních onemocnění jako Lupus erythematoses visceralis a rheumatoidní artritida, u odvržení transplantátů, infekčních onemocnění, případně u neoplasií). Cirkulující imunokomplexy se mohou usazovat na stěnách cév a vyvolávat u orgánů, které jsou k tomu právě náchylné, závažné reakce (mj. vasculitis, arthritis, nephritis, serositis, carditis, cerebritis, anaemie, leukopenie, trombopenie) projevující se odpovídajícími symptomy. Zvláště při autoimunitních onemocněních koreluje koncentrace imunokomplexu v séru (plazmě nebo jiných tělních tekutinách) se stupněm onemocnění. Proto je vhodné ovlivnit pathomechanismus těchto onemocnění odstraněním cirkulujících imunokomplexů z tělních tekutin. Tím se dosáhne zbrzdění postupu shora jmenovaných nemocí, sníží se aktivita onemocnění a potlačí se nebo odstraní s nimi spojené symptomy. Úspěchy plasmapheresy spočívají mj. v odstranění, případně v omezení pathogeneticky významných imunokomplexů /viz. E. Apostoloff aj., Dt. Gesundheitsw. 34, 64 (1979); H. F. Parry aj., Ann. Rheum. Dis. 40, 224 až 228 (1981); T. Sharon aj., Plasma Ther. Transfus. Technol. 3, 163 až 169 (1982); M. Valbonesi aj., Int. J. Art. Organs. 4, 234 až 236 (1981); J. V. Jones aj., Arthritis Rheum. 24, 1113 až 1120 (1981)/.

Nevýhodou této metody je neselektivní odstranění všech složek plazmy, což vyvolává nutnost dodávání větších množství cizí plazmy nebo lidského albuminu. To může být z kapacitních nebo ekonomických důvodů limitujícím faktorem. Proto existuje již několik let snaha o vývoj adsorbentů, které umožňují selektivní odstranění cirkulujících imunokomplexů z tělních tekutin. Přitom bylo v podstatě postupováno těmito způsoby:

-Stafylokokový protein A fixovaný na nerozpustný nosič (fixované stafylokoky, protein A-Sepharose) [srovnej D. S. Torman aj., J. Immunol. 124, 798 (1980); New England J. Med. 305, 1195; E. Behm a H. Klinkmann v Plasma Separation and Plasma Fractionation, str. 254 až 265 (Karger, Basel 1983)/

-porézní pryskyřice na bázi esterů kyseliny akrylové [např. XAS-7, dodává firma Rohm a Hass Co., USA; srovnej T. Agishi, Zinko Zoki, 9, 264 (1980)/

-iontoměniče jako karboxymetyl celulóza [srovnej L. D. Johnson aj., Can. J. Biochem. 42, 795 (1964)/

-adsorbens, obsahující povrch, na nějž je vázán při nejmenším jeden hydrofobní člen s 6 až 700 uhlíkovými atomy a člen, který vytváří přinejmenším jeden negativní náboj [T. Kuroda aj., japonský patent J. P. P 58-59199, P 58-59197/.

Tyto adsorbenty mají však různé nevýhody: Protein A je schopen vázat imunokomplexy, avšak nikoliv dostatečně selektivně, protože váže rovněž IgG, který není vázán na imunokomplex. Mimoto je protein A cizí protein s tomu odpovídajícími nevýhodami v případech, kdy je používán ve styku s tělními tekutinami. Výrobní náklady proteinu A jsou velmi vysoké. Použití inaktivovaných stafylokoků jako přirozených nosičů proteinu A umožňuje použití proteinu A bez jeho dalšího čištění, přináší však dodatečné problémy při styku tělní tekutiny s inaktivovanými bakteriemi (např. uvolňování pyrogenů). Údajně dochází rovněž k aktivizaci komplementárního systému nosiči proteinu A. Porézní pryskyřice na bázi esterů kyseliny akrylové a karboxymethylcelulózy se vyznačují jen omezenou adsorpční kapacitou z tělní tekutiny. Adsorbens, který se skládá z hydrofobního členu a z členu, který obsahuje negativní náboj, není rovněž dostatečně specifický.

Předložený vynález odstraňuje tyto nedostatky. Vynález řeší úlohu odstranění cirkulujících imunokomplexů selektivně a šetrně z tělních tekutin za použití sterilizovateli-

ných nosičů. Nosiče je možno jednoduše, rychle a reprodukovatelně odstranit za účelem dalšího použití. Řešení tohoto úkolu, které je podstatou vynálezu, spočívá v tom, že protein Cl_q - podjednotka první komponenty komplementárního systému - je vázán spojovacími můstky na povlečené nosiče, například na makroporézní sférické kopolymery 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem nebo na kopolymery stejné chemické struktury v planární formě nebo na materiály obsahující celulózu, například perlovou celulózu nebo na celulóзовé nosiče v planární formě, nebo je vázán pomocí silanového spojovacího činidla kovalentně na nosiče obsahující oxid křemíku, například na porézní sklo, skleněná vlákna nebo planární filtry ze skleněných vláken, nebo je vázán na jiné nosiče, a takto na nosič vázaný protein Cl_q je používán k vázání a odstraňování cirkulujících imunokomplexů přičemž imunokomplexy vázané na protein Cl_q jsou odstraňovány z tělních tekutin oddělením pevné fáze a pevná fáze je regenerována působením nedenaturujících médií. Podstata vynálezu spočívá dále v tom, že protein Cl_q, který se vyskytuje v lidské i zvířecí krvi a který je zodpovědný za vázání imunokomplexů a jejich fyziologické vylučování, je vázán na shora jmenované nosiče, které mají dostatečně velký povrch a porozitu, a jejichž povrch je podrobován chemické modifikaci známým způsobem epichlorhydrinem, estery kyseliny chlormravenčí, CNBr, kyanurchloridem, karbodiimidem (přehled: M. D. Lilly: *Methoda in Enzymology* 44, 1976, 46) nebo silanovými adhezními činidly, nebo případně hetero- nebo homobifunkčními reagenty, a takto na nosič vázaný protein Cl_q je použit pro in vivo a pro in vitro prováděné odstranění cirkulujících imunokomplexů z krevních tekutin, načež takto vázané imunokomplexy jsou odštěpovány nedenaturujícími médii, takže použitý nosič - jehož povrch je obsazen proteinem Cl_q - může být znovu použit.

Nosič sloužící jako pevná fáze má rozličné geometrické tvary, přičemž kulovitý, vláknitý nebo planární zesítlý nosiče jsou zvláště vhodné. Myslitelné jsou však i filmy, látky a jiné tenké vrstvy jmenovaných kopolymerů na jiných inertních biologicky snášitelných materiálech.

Materiál obsahující poly(hydroxyethylmethakrylát) má v podstatě sférickou strukturu, přičemž jeho velikost částic, složení a porozita mohou být různé. Zvláště vhodné jsou velikosti částic mezi 100 až 400 μm a průměry pórů větší než 50 nm. Maximální průměr pórů je cca 100 μm , přičemž při zvětšujícím se průměru pórů se plocha, která je k dispozici, a tím i kapacita, stále zmenšuje. Materiál obsahující celulózu je v podstatě perlová celulóza, přičemž její velikost částic, složení, struktura a porozita mohou být rozdílné. Zvláště výhodné jsou velikosti částic mezi 100 až 400 μm a průměr pórů větší než 50 nm. Maximální průměr pórů je cca 100 μm , přičemž se stoupajícím průměrem pórů se plocha, která je k dispozici, a tím i kapacita nosiče, analogickým způsobem zmenšuje.

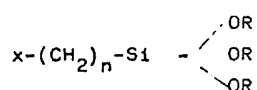
Protein Cl_q je vázán na povrchy nosičů obsahujících celulózu, jež byly modifikovány známým chemickým způsobem, například pomocí esterů kyseliny chlormravenčí, CNBr, kyanurchloridem, karbodiimidem nebo silanovými adhezními činidly.

Nosič obsahující oxid křemíku má rovněž rozličné geometrické formy, přičemž kulovité nebo vláknité nosiče s aditivou nebo bez ní, které mohou být pomocí obsahu, sintrování, nebo použitím adheziva uspořádány do nadřazených struktur (filtrů, frit apod.) s definovanou propustností, jsou zvláště výhodné. Materiály obsahující oxid křemíku jsou v podstatě porézní skla (viz F. Janowski, W. Hayer: *Poröse Gläser*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1982), které jak známo je možno bez problému sterilizovat a udržovat sterilní a jejichž velikost částic, struktura a porozita jsou přesně definovány. Zvláště vhodné jsou dokonale sférické částice (OD-WP C03B 259 5548, OD-WP B01 J 269 4382, OD-WP B01 J 26 94390) s velikostmi částic mezi 1 a 1000 μm a s průměry pórů 0,05 až 100 μm , přičemž jsou průměry pórů a plocha, která je k dispozici a která rozhodujícím způsobem ovlivňuje kapacitu nosiče, navzájem nepřímo úměrné. Ideálně sférická forma matrice má rozhodující význam pro šetrné podmínky procesu, protože podstatně redu-

kuje stříhové síly, které působí na proteiny. Navíc se vyznačují ideálně sférické skleněné částičky odolností proti otěru, výhodnými hydrodynamickými vlastnostmi, širokým rozmezím textur, a tím i průtokových vlastností, jakož i nepřítomností toxických příměsí. Zvláště z hlediska technologických procesů jsou výhodné nosiče v planární formě nebo patrony se zrnitým materiálem, nebo membrány z porézního skla s nadřazenou strukturou, které jsou používány jako filtry v odpovídajících filtračních systémech. Zde se osvědčují zvláště dobře filtrační materiály obsahující skleněná vlákna vzhledem k jejich mechanické pevnosti.

Nedenaturující média pro odštěpení vázaných imunokomplexů jsou pufované roztoky o vysoké iontové síle, přičemž jsou zvláště výhodné 0,5 až 3 M roztoky chloridu sodného, avšak rovněž chaotropické reagentie, kyseliny a louhy. Modifikace povrchů poly(hydroxyethylmethakrylátů) za účelem vytvoření podmínek pro tvorbu kovalentní vazby s proteinem Clq probíhá známým způsobem, s výhodou působením epichlorhydrinu, může být však prováděna i jinými modifikačními postupy, jako působením CNBr, karbodiimidů a jiných hetero- nebo homobifunkčních reagentů. Modifikace povrchu celulózy probíhá rovněž známým způsobem, výhodně působením esterů kyseliny chloromravenčí, může však probíhat i jinými modifikačními postupy, jako působením CNBr, kyanurchloridu, karbodiimidu nebo glutaraldehydu.

Modifikace povrchu nosičů obsahujících oxid křemíku probíhá působením tzv. silanových adhezních činidel jako



kde R jsou alkyly a x jsou např. amino-, epoxy-, diazo-, sulfhydryl- nebo nitroskupiny a reakcí zbylých funkčních skupin známým způsobem s homo- nebo heterofunkčními reagenty nebo přímou reakcí s reaktivními skupinami proteinů.

Clq-nosiče, které jsou předmětem vynálezu, jsou chemicky stábilní, značně odolné působení mikroorganismů, sterilizovatelné a biokompatibilní. Tím je umožněna jejich regenerace. Nosič se zakotveným proteinem se potom používá k vázání a odstraňování cirkulujících imunokomplexů, přičemž je možno jej použít obvyklým způsobem v průtokovém systému (hemoperfuze, plazmaperfuze), jakož i ve vsádkovém procesu (při izolaci imunokomplexů pro výzkumy in vitro). Po proběhnutí reakce a oddělení nosiče od tělních tekutin, se kterými byl ve styku, se imunokomplexy odštěpí působením nedenaturujících činidel, např. 2M roztokem NaCl, takže kovalentně vázaný protein Clq je k dispozici k novému použití. Postup, který je předmětem vynálezu, používá fyziologickou funkci proteinu Clq pro selektivní a šetrné vázání imunokomplexů a jejich následovné odstranění z tělních tekutin.

Níže uvedené příklady slouží k bližšímu osvětlení vynálezu:

Příklad 1

5 g makroporézního sférického kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem a vylučovací mezí 2×10^6 D a povrchem cca $70 \text{ m}^2/\text{g}$ a reaktivními expozkpinami ($1,020 \text{ m mol/g}$ nosiče) (Separon Hema 1000 E^R) se smísí s proteinem Clq (1 mg/ml) v PBS-pufu obsahujícím 10 mM EDTA o pH 7,4 a po dobu 48 hodin inkubuje při 4°C za mírného třepání. Určení vázaného proteinu Clq probíhá diferenční analýzou roztoku po provedení reakce, resp. stanovením zbylého proteinu při 280 nm ($E_1^{280} = 0,6$) nebo pomocí jednoduché radiální imunodifúze za užití specifického antisera. Potom se smísí nosič s 1 M roztokem etanolaminu v PBS-pufu o pH 7,4, aby byly ještě případně volné reakční skupiny zablokovány. Dále se nosič vymyje $0,01 \text{ M}$ fosfátovým pufrem o pH 7,4, kte-

rý obsahuje 0,05 M NaCl. Protein Clq zakotvený na nosiči se nyní použije k navázání imunokomplexů. K tomu se nosič na bázi Separonu se zakotveným proteinem Clq smísí s heparinizovanou plazmou, která obsahuje zvýšenou koncentraci cirkulujících imunokomplexů (pacient s lupus erythematoses visceralis) a inkubuje se 2 h při normální teplotě. Po odstranění nosiče dekantací nebo centrifugací se nosič promyje nejdříve 0,01 M fosfátovým pufrem pH 7,4, obsahujícím 0,05 M NaCl, a potom regeneruje 2 M NaCl v PBS-pufre pH 7,4. Stanovení imunokomplexů se provede pomocí imunoseje s použitím proteinu Clq na pevné fázi. K určení nespecifické vazby na nosič byla stanovena koncentrace bílkovin ve specifickém eluátu podle Lowryho při 280 nm, byla též provedena imunoelktroforéza, dvojité radiální imunodifúze se specifickými antiséry a elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. V eluátu bylo možno specificky stanovit cirkulující imunokomplexy. Kontaminující průvodní proteiny nebyly přítomny. Aktivace komplementárního systému nebyla prokázána.

Příklad 2

Na aktivovaný Separon Hema E^R se naváže lidský protein Clq, jak je popsáno v příkladu 1. Tato matrice se naplní do chromatografického sloupce (Ø 4 mm) a promyje se 0,01 M fosfátovým pufrem, pH = 7,4, 0,05 M NaCl. Nato se dávkuje 2 ml heparinizované plazmy pacienta se zvýšenou hladinou imunokomplexů a eluuje shora uvedeným pufrem (průtok 10 ml/h). Odštěpení specificky vázaných imunokomplexů a s tím spojená regenerace matrice se provádí jak je popsáno v příkladu 1, tj. působením 2M roztoku NaCl v PBS pufre, pH 7,4. Koncentrace bílkovin byla stanovována kontinuálně pomocí průtokového UV-spektrofotometru. Výsledky odpovídají údajům uvedeným v příkladu 1.

Příklad 3

Perlová celulóza aktivovaná estery kyseliny chloromravenčí (aktivační stupeň 63 $\mu\text{mol/ml}$) se nejdříve převede postupně do vodného prostředí, protože je smísená s dioxanem. To se provádí vypíráním nosiče za míchání dostatečně velkým přebytkem (50 ml vypíracího roztoku/ml nosiče) směsí dioxan-voda o tomto složení: 90/10; 70/30; 10/90; 0/100. Celková doba vypíracího procesu nemá být delší než 10 až 15 minut, aby se zabránilo ztrátám aktivních skupin v důsledku hydrolýzy. Nato se nosič smísí s proteinem Clq (1 mg/ml) v PBS-pufre, pH 7,4, který obsahuje 10 mM EDTA a inkubuje se 4 h při pokojové teplotě za mírného třepání. Stanovení vázaného proteinu se provádí diferenčním měřením získaného roztoku, případně zbytku, po předchozí dialýze při 280 nm ($E_{1\%}^{280} = 6,8$) nebo pomocí jednoduché radiální imunodifúze. Dále se nosič smísí s 1 M roztokem ethanolaminu v PBS-pufre, pH 7,0, aby se zablokovaly ještě případně volné reaktivní skupiny. Nato se nosič vypírá 0,01 M fosfátovým pufrem, pH 7,4, který obsahuje 0,05 M NaCl. Tento na nosiči zakotvený protein Clq se nyní použije pro vázání imunokomplexů. To se provede tak, že perlová celulóza se zakotveným proteinem Clq se smísí se sérem pacienta, které obsahuje zvýšenou koncentraci imunokomplexů (pacient s lupus erythematoses visceralis) a inkubuje po dobu 2 h při normální teplotě. Nosič se oddělí dekantací nebo centrifugací a vymývá 0,01 M fosfátovým pufrem, pH 7,4, 0,05 M NaCl a nato se regeneruje 2M NaCl v PBS-pufre, pH 7,4. Stanovení imunokomplexů se provede jako v příkladu 1 a 2 pomocí imunoseje s proteinem Clq zakotveným na pevné fázi. Pro určení nespecifického navázání na nosič se stanovuje koncentrace bílkovin ve specifickém eluátu podle Lowryho a provádí se imunoelktroforéza. Případná aktivizace komplementárního systému se sleduje kvantitativním určením komplementárních komponent proteinů Clq a C3.

Tabulka 1 ukazuje charakteristický výsledek takové procedury.

Tabulka 1

	cirkulující imunokomplexy ($\mu\text{g/ml}$ ekvivalenty agreg. IgG)	%
Serum pacienta		
před procedurou	90	100
po proceduře	62	69

Aktivizace komplementárního systému nebyla prokázána.

Příklad 4

Na aktivovanou perlovou celulózu se jako v příkladu 3 naváže protein Clq. Tato matrice se naplní do chromatografické kolony a vymývá se 0,01 M fosfátovým pufrem, pH 7,4, 0,05 M NaCl. Nato se nanese na kolonu 1 ml sera pacienta se zvýšenou hladinou imunokomplexů a eluuje výše uvedeným pufrem (průtok 10 ml/h). Odštěpení specificky vázaných imunokomplexů a s tím spojená regenerace matrice probíhá, jak je popsáno v příkladu 1, 2M roztokem NaCl v PBS-puftru, pH 7,4. Koncentrace bílkovin byla sledována kontinuálně pomocí průtokového UV fotometru. Výsledky byly obdobné výsledkům uvedeným v příkladu 3.

Příklad 5

Porézní skleněné kuličky s průměrem pórů 135 nm byly aktivovány varem v 30% kyselině dusičné a vypíráním neutrálním roztokem silanového spojovacího činidla NB 114 (Aminopropyltriethoxysilan, VEB Chemiewer Nüchritz) ve směsi etanol/voda (1 : 1), pH 3,5, po dobu 4 h při 60 °C a 6 h při 120 °C. Po vyprání směsí etanol/voda a po několikanásobném vyprání PBS-pufrem, pH 7,4, se takto funkcionalizované sklo inkubuje 2% glutardialdehydem v 0,1 M fosfátizovaném sklo inkubuje 2% glutardialdehydem v 0,1 M fosfátovém puftru, pH 6,8 po dobu 2 h při 37 °C. Po dalším vymytí PBS-pufrem se směsí aktivované sklo s proteinem Clq (500 $\mu\text{g/ml}$) v PBS-puftru, pH 7,4, který obsahuje 10 mM EDTA a inkubuje při 37 °C po dobu 4 h. Po dalších vymývacích procesech se ještě volné aldehydicke skupiny blokují pomocí 1M roztoku ethanolaminu. Po opakovaném vypírání 0,01 M fosfátovým pufrem, pH 7,4, který obsahuje 0,05 M NaCl, se tato matrice se zakotveným proteinem Clq použije k navázání cirkulujících imunokomplexů. To se provede smísením séra odebraného pacientovi s lupus erythematoses visceralis), obsahujícího zvýšenou koncentrací cirkulujících imunokomplexů se skleněnými kuličkami, na nichž byl zakotven protein Clq a inkubací po dobu 2 hod. při pokojové teplotě. Nosič se oddělí centrifugací nebo dekantací a vymývá 0,01 M fosfátovým pufrem, pH 7,3, 0,05 M NaCl, načež se regeneruje 2M NaCl v PBS-puftru, pH 7,4. Stanovení imunokomplexů bylo provedeno znovu pomocí imunoeseje s proteinem Clq na pevné fázi. Pro určení nespecifického navázání na nosič se stanovuje koncentrace bílkovin ve specifickém eluátu podle Lowryho a provádí se imunoelktroforéza. Tabulka 2 ukazuje charakteristický výsledek této procedury.

Tabulka 2

	cirkulující imunokomplexy ($\mu\text{g/ml}$ ekvivalenty agreg. IgG)	%
Serum pacienta		
před procedurou	90	100
po proceduře	68	73

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Selektivní adsorbens pro vázání imunokomplexů z tělních tekutin na základě bio-spezifických interakcí na pevných fázích, vyznačené tím, že jako pevnou fázi obsahují nosiče, například kopolymery 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylenmethakrylátu nebo materiály obsahující celulózu nebo oxid křemíku, které obsahují protein Clq kovalentně vázaný pomocí spojovacích můstků.

2. Selektivní adsorbens podle bodu 1, vyznačené tím, že pevné fáze tvořící nosiče sestávají ze sférických, planárních nebo vláknitých tvarových tělísek nebo jsou nanášeny jako vrstvy, filmy nebo laky.

3. Selektivní adsorbens podle bodu 2, vyznačené tím, že tvarová tělíska tvořící nosiče jsou uspořádána sintrováním, tkaním, slepením nebo uložení v obalu, například do planární formy, nebo tvoří náplně kolon.

4. Selektivní adsorbens podle bodů 1 až 3, vyznačené tím, že materiál nosiče tvoří sférické kopolymery poly(hydroxyethylmethakrylátu), jejichž velikost částic činí 10 až 1 000 μm a jejichž průměr pórů je v rozmezí 10 až 1 000 nm.

5. Selektivní adsorbens podle bodů 1, 2, 3 vyznačené tím, že materiál na bázi celulózy je perlová celulóza s velikostí částic 10 až 500 μm a průměrem pórů 10 až 1 000 nm.

6. Selektivní adsorbens podle bodů 1 až 3, vyznačené tím, že materiály nosičů obsahující oxid křemíku mají kulovitou formu částic, jejichž velikost činí 1 až 1 000 μm , průměr pórů 0,05 až 100 μm , nebo jsou utvořeny ve tvaru vláken.