



HU000230758B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**  
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 758**(13) **B1**

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 08 00388**(51) Int. Cl.: **C07K 1/30** (2006.01)(22) A bejelentés napja: **2006. 04. 12.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

(40) A közzététel napja: **2012. 07. 30.****PCT/US 06/13751**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2018. 03. 28.**

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

**WO 08051178**(72) Feltaláló(k):  
**Fischer, Meir, Rehovot (IL)**  
**Harosh, Eliyahu, Ashdod (IL)**(73) Jogosult(ak):  
**Crealta Pharmaceuticals LLC, Lake Forest,**  
**Illinois (US)**(74) Képviselő:  
**ADVOPATENT Szabadalmi és Védjegy Iroda,**  
**Budapest**(54) **Fehérjék tisztítása kationos felületaktív anyaggal**

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás célfehérje tisztítására.

A találmány értelmében úgy járnak el, hogy

(a) szolubilizált célfehérjét és egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét és lúgos puffert tartalmazó oldatból indulnak ki, ahol a célfehérje izoelektromos pontja nagyobb mint 7, a célfehérje lúgos pH-értéken pozitív töltésű és az egy vagy több szennyező fehérje polianion töltéssel rendelkezik;

(b) az oldatot egy vagy több kationos felületaktív anyaggal érintkeztetve az egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét preferenciálisan kicsapják, ezzel megnövelve az oldatban maradó szolubilizált fehérjék között a szolubilizált célfehérje arányát, ahol az egy vagy több kationos felületaktív anyag amfipatikus ammóniumvegyület, amely a  $QN^+$  általános képletű kvaterner ammóniumvegyületekből, az  $RNH_3^+$  általános képletű, paraffinláncot tartalmazó primer

ammóniumvegyületekből és a felsoroltak sóiból álló csoportból kerül kiválasztásra; és

(c) a szolubilizált célfehérjét kinyerik.

## FEHÉRJÉK TISZTÍTÁSA KATIONOS FELÜLETAKTÍV ANYAGGAL

### A TALÁL MÁNY TÁRGYA

5 A találmány fehérjetisztításra vonatkozik felületaktív anyagok alkalmazásával.

### A TALÁL MÁNY HÁTTERE

10 A biológiai makromolekulák, különösen a fehérjék előállítása gyakran tartalmaz a fizikai és fizikokémiai tulajdonságokon alapuló, a tisztaságot növelő lépéseket. Az ilyen eljárási lépések során olyan nehézségekkel találkozunk, többek között, mint az oldható és oldhatatlan molekulák elkülönítését lehetővé tevő feltételek, a kívánt molekula viszonylag csekély termeléssel való kinyerése a kezelési lépés után, a biológiai  
15 aktivitás csökkenése az eljárás folyamán, valamint a fehérje érzékenysége olyan eljárási paraméterekkel szemben mint a pH.

20 Biológiai makromolekulák feldolgozása folyamán használnak felületaktív anyagokat. A kationos felületaktív anyagok a felületaktív anyagok egyik elismert alcsoportját képezik, és magukba foglalják az amfipatikus ammóniumvegyületeket. Az amfipatikus ammóniumvegyületek tartalmazzák a  $QN^+$  általános képletű kvaterner ammóniumvegyületeket és az  $RNH_3^+$  általános képletű, paraffinláncal ellátott primer ammóniumvegyületeket. Az amfipatikus ammóniumvegyületek mindkét típusa hosszú alifás láncot tartalmaz, amely előnyösen legalább  
25 hat szénatomos [Scott (1960) Methods Biochem. Anal., 8:145-

197]. Ismert, hogy a hosszúláncú kvaterner ammónium-  
 vegyületből álló felületaktív anyagok kölcsönhatásba lépnek  
 biológiai makromolekulákkal. A hosszúláncú kvaterner  
 ammóniumvegyületeknél legalább egy olyan szubsztituens  
 5 kapcsolódik a nitrogénatomhoz, amely 6-20 szénatomos  
 egyenes alkilláncból áll. Ennek a csoportnak a legjobban is-  
 mert képviselői a következők: benzalkóniumsók (kloridok és  
 bromidok), hexadecil-piridinium-klorid, dekvalinium-acetát,  
 cetil-dimetil-ammónium-bromid (CTAB), hexadecil-piridinium-  
 10 klorid (CPCI) és benzetónium-klorid. A kvaterner ammónium  
 felületaktív anyagok például olyan sók mint a cetil-piridinium-  
 sók, így cetil-piridinium-klorid (CPC), sztearamid-metil-  
 piridinium-sók, lauril-piridinium-sók, cetil-kinolinium-sók, lauril-  
 amino-propionsav-metil-észter-sók, lauril-amino-propionsav-  
 15 fémsók, lauril-dimetil-betain, sztearil-dimetil-betain, lauril-  
 dihidroxil-etil-betain és benzetóniumsók. Az alkil-piridinium-sók  
 átfogják a sztearil-trimetil-ammónium-sókat, alkil-dimetil-benzil-  
 ammónium-kloridot és a diklór-benzil-dimetil-alkil-ammónium-  
 kloridot.

20 A kationos felületaktív anyagoknak biológiai makromoleku-  
 lák tisztítására történő ismert felhasználásai a következők:  
 1) aggregátumok, közöttük fehérje aggregátumok szolubilizá-  
 lása; 2) kromatografáló oszlophoz kötött biológiai makromole-  
 kulák elúciója; és 3) polianionok mint hialuronsav (HA),  
 25 nukleinsavak és heparin (valamint a polianionokkal együtt  
 kiváló molekulák) kicsapása.

Kationos felületaktív anyagokat alkalmaznak fehérje aggregátumok szolubilizálására. Otta és Bertini [(1975) *Acta Physiol. Latinoam.* 25:451-457] kimutatta, hogy aktív urikáz szolubilizálható rágcsáló máj peroxiszomákból a Hyamine 2389 kvaterner ammónium felületaktív anyaggal. Azt tapasztalták, hogy az ammónium felületaktív anyag koncentrációjának növelése növelte mind az urikáz oldódását (az enzimaktivitás alapján), mind az összfehérje oldódását úgy, hogy nem növekedett az urikázfehérjének az összfehérjéhez viszonyított mennyisége. Más szavakkal, nem következett be az összfehérjéhez képest az urikáz-fehérje szelektív szolubilizációja, és az urikázfehérje nem alkotta az összfehérje nagyobb százalékos hányadát a kationos felületaktív anyaggal végzett szolubilizálás hatására. Ennél az eljárásnál tehát az összfehérje-tartalomhoz képest az urikáz tisztasága láthatóan nem növekedett a kvaterner ammónium felületaktív anyaggal végzett szolubilizálás eredményeként.

Egy másik vizsgálat során Truscoe [(1967) *Enzymologia* 33:1 19-32] azt nézte, hogy egy sor kationos, anionos és semleges detergens milyen hatásokkal extrahálja az urát-oxidázt (urikáz) ökör veseporból. Amíg a semleges és anionos detergensok növelték az oldható urát-oxidáz aktivitását, addig a kationos detergensok, például a kvaterner ammóniumsók csökkentették a teljes enzimaktivitást a koncentráció növelésével. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a kationos detergensok nem használhatók az ökörvese urát-oxidáz tisztítására.

Rekombináns fehérjék, sertés növekedési hormon, sertés növekedési hormon metionilszármazékának, fertőző nyálkátömlő-gyulladást okozó vírus fehérjéjének, B-galaktozidáz fúziós fehérjének és E. coliból származó zárványtesteknek vagy –sejteknek kationos felületaktív anyagokkal végzett szolubilizálását ismertetik a 4,797,474; 4,992,531; 4,966,963 és 5,008,377 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. A szolubilizálást lúgos körülmények között hajtják végre kvaterner ammóniumvegyületek, közöttük cetil-trimetil-ammónium-klorid, vegyes n-alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, CPC, N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tetra-metil-butil)-fenoxi]-etoxi]-etil]-benzol-metán-ammónium-klorid, tetradecil-trimetilammónium-bromid, dodecil-trimetil-ammónium-bromid, cetil-trimetil-ammónium-bromid alkalmazásával. Ezek a közlemények megemlítik, hogy minden egyes szolubilizáló folyamat után az oldatokat centrifugálják, és kevés szemcsét figyeltek meg vagy egyáltalán nem figyeltek meg szemcsét az egyes esetekben. Ez a megfigyelés arra mutat, hogy a fehérjék legnagyobb része vagy teljes mennyisége szolubilizálódik, tekintet nélkül a célt képező fehérje szolubilizálásának szelektivitására. A kinyert fehérjék tisztaságát nem jellemezték. Az 5,929,231 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás keményítőket tartalmazó granulátumok és aggregátumok cetil-piridinium-kloriddal (CPC) történő szétejtését ismerteti. A technika állása tehát a kationos felületaktív anyagoknak a biológiai makromolekula részecskék általános, nem-specifikus szolubilizálására való alkalmazására vonatkozik. Az ismert

eljárások nem ismertetik valamely kívánt célfehérje tisztaságának az összfehérjéhez viszonyított növelését kationos felületaktív anyag alkalmazásával.

5 Kationos felületaktív anyagokat kationcserélő gyanták vagy alumíniumtartalmú adjuvánsok által adszorbeált biológiai makromolekulák elúciójához is használnak [Antonopoulos és munkatársai (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 54:213-226; Embery (1976) *J. Biol. Buccale* 4:229-236; valamint Rinella és munkatársai (1998) *J. Colloid Interface Sci.* 197:48-56]. A 4,169,764  
10 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás urokináz elúcióját ismerteti karboxi-metil-cellulóz oszlopokról sokféle kationos felületaktív anyag oldatának felhasználásával. A szerzők kijelentik, hogy előnyösek az olyan tetraszubsztituált ammóniumsók, amelyekben az egyik alkilcsoport legfeljebb 20  
15 szénatomos hosszúlancú alkilcsoport, a többi legfeljebb 6 szénatomos rövidlancú alkilcsoport. Az ilyen kationos felületaktív anyagok lehetővé teszik valamely szilárd mátrixhoz kapcsolt biológiai makromolekulák eltávolítását.

Ennek megfordításaként a szűrők, például a nylonból készült szűrők impregnálása kationos felületaktív anyaggal lehetővé teszi poliszacharidok vagy nukleinsavak megkötését [Maccari és Volpi (2002) *Electrophoresis* 23:3270-3277; Benitz és munkatársai (1990), 4,945,086 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Macfarlane (1991), 5,010,183 sz.  
25 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás]. Ez a jelenség nyilvánvalóan a kationos felületaktív anyag és a polianion

közötti, a polianionok kicsapását biztosító kölcsönhatások következménye.

Megállapították, hogy az amfipatikus ammóniumvegyületek, amelyek átfogják a  $QN^+$  általános képletű kvaterner ammóniumvegyületeket és az  $RNH_3^+$  általános képletű, paraffinláncot tartalmazó primer ammóniumvegyületeket, meghatározott körülmények között képesek polianionok kicsapására [Scott (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 18:428-429; Scott (1960) *Methods Biochem. Anal.* 8:145-197; Laurent és munkatársai, (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 42:476-485; Scott (1961) *Biochem. J.* 81:418-424; Pearce és Mathieson (1967) *Can. J. Biochemistry* 45:1565-1676; Lee (1973) *Fukushima J. Med. Sci.* 19:33-39; Balazs (1979), 4,141,973 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Takemoto és munkatársai, (1982), 4,312,979 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Rosenberg (1981), 4,301,153 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Takemoto és munkatársai, (1984), 4,425,431 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; d'Hinterland és munkatársai, (1984), 4,460,575 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Kozma és munkatársai, (2000) *Mol. Cell. Biochem.* 203:103-112]. Ez a kicsapás függ a nagy polianion-töltéssűrűségű és nagy molekulásúlyú kicsapódó anyagtól [Saito (1955) *Kolloid-Z.* 143:66]. Sók jelenléte zavarhatja vagy megfordíthatja a kationos felületaktív anyaggal kiváltott polianion-kicsapást.

Emellett a polianionok megkülönböztetett módon csaphatók ki, lúgos pH-értéken, az olyan oldatokból, amelyek fehérjéből

- álló szennyező anyagokat tartalmaznak. Ilyen esetekben a polianionokhoz kémiailag nem kötődő fehérjék oldatban maradnak, míg a polianionok és a polianionokhoz kötött egyéb molekulák kicsapódnak. A polianionok, így a poliszacharidok és nukleinsavak kicsapását például olyan molekulák kicsapódása kíséri mint a polianionokkal reakcióba lépő proteoglikánok és fehérjék [Blumberg és Ogston (1958) *Biochem. J.* 68:183-188; Matsumura és munkatársai, (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 69:574-576; Serafini-Fracassini és munkatársai, (1967) *Biochem. J.* 105:569-575; Smith és munkatársai, (1984) *J. Biol. Chem.* 259:11046-11051; Fuks és Vlodavsky (1994), 5,362,641 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Hascall és Heinegard (1974) *J. Biol. Chem.* 249:4232-4241, 4242-4249 és 42-50-4256; Heinegard és Hascall (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 165:427-441; Moreno és munkatársai, (1988), 4,753,796 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Lee és munkatársai, (1992) *J. Cell. Biol.* 116:545-557; Varelas és munkatársai, (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 321:21-30].
- 20 Valamely fehérje izoelektromos pontja (vagy  $pI$ ) az a pH-érték, amelynél a fehérjének azonos számú pozitív és negatív töltése van. Oldási körülmények között, amikor a pH-érték közel (különösen alatta) van a fehérje izoelektromos pontjának, a fehérjék stabil sókat tudnak képezni erősen savas polianionokkal, így heparinnal. Az ilyen polianionok kicsapását elősegítő körülmények között a polianionokkal komplexet képező fehérjék szintén kicsapódnak [LB Jaques (1943)



Biochem. J. 37:189-195; AS Jones (1953) Biochim.Biophys. Acta 10:607-612; JE Scott (1955) Chem. And Ind. 168-169; 3,931,399 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Bohn és munkatársai, 1976); és 4,297,344 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Schwinn és munkatársai, 1981)].

A 4,421,650 és 5,633,227 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, valamint Smith és munkatársai [(1984) J. Biol. Chem. 259:11046-11051] polianionok tisztítását ismerteti kationos felületaktív anyaggal, majd ammónium-szulfáttal (amely lehetővé teszi a polianion és a kationos felületaktív anyag komplexeinek disszociációját) végzett kezeléssel, és ezt követően hidrofób interakciós kromatográfiával történő elválasztással. Az EP 055188 sz. publikált európai szabadalmi bejelentés RTX toxinnak lipopoliszacharidtól kationos felületaktív anyag segítségével történő elválasztását ismerteti. Nincs azonban az endotoxin aktivitásának mérésével számszerűsített tömegmérés a lipopoliszacharid mennyiségét illetően. Megmutatták az endotoxinaktivitás semlegesítését erős kölcsönhatásba lépő kationos vegyületekkel [Cooper JF (1990) J. Parenter. Sci. Technol. 44:13-5]. Az EP 055188 sz. dokumentumnál tehát a kationos felületaktív anyag növekvő mennyiségeivel végzett kezelés után nyert csapadékban az endotoxinaktivitás hiánya valószínűleg az aktivitásnak a felületaktív anyag és lipopoliszacharid közötti komplexképződés hatására fellépő semlegesítésnek az eredménye.

A fentebb említett módszerek közbenső polianionokat, szilárd hordozókat vagy aggregátumokat igényelnek, amelyek valamely kationos felületaktív anyag hatására szelektív oldhatóságú fehérjéket tartalmaznak ahhoz, hogy lehetővé váljon az oldható fehérjék tisztítása a kationos felületaktív anyag alkalmazásával. Az ismert megoldások tehát nem biztosítanak

5 eljárást valamely célfehérje tisztítására oly módon, hogy a fehérjét olyan mennyiségű felületaktív anyaggal érintkeztetjük, amely hatékony a célfehérjétől eltérő fehérjék, azaz a szennyező fehérjék megkülönböztetett módon való kicsapásához,

10 különösen amikor az érintkeztetés közbenső polianionok, szilárd hordozók vagy fehérjeaggregátumok jelenlétében történik. A szakember gyakran találkozik oldható fehérjék elegyeivel, és nincs egyszerű, hatékony módszere a kívánt fehérje tisztításához. A fehérjék tisztításának itt leírt új módszere lehetővé teszi a célt képező fehérjék hatékony tisztítását úgy, hogy kationos felületaktív anyagok alkalmazásával megkülönböztetett módon csapjuk ki a célt képező fehérjétől eltérő fehérjéket. A szennyező fehérjék ilyen kicsapása előnyösen közvetlen, és nem

15 függ polianionok, szilárd hordozók vagy a szennyező fehérjéket és más molekulákat tartalmazó aggregátumok jelenlététől.

20

#### **A TALÁLMÁNY ÖSSZEFOGLALÁSA**

A jelen találmány eljárást biztosít a célt képező fehérje tisztítására a célfehérjét és szennyező fehérjét tartalmazó

25 elegyből, ahol az elegyet valamely kationos felületaktív anyag hatékony mennyiségével érintkeztetjük úgy, hogy a szennyező

fehérje preferenciálisan kicsapódjon, majd a célfehérjét kinyerjük.

### AZ ÁBRÁK RÖVID LEÍRÁSA

5 Az 1. ábra a CPC-koncentrációnak az urikáz aktivitására és tisztaságára gyakorolt hatásait mutatja be.

Feloldott *E. coli* zárványtestekből származó emlős eredetű urikáz fehérjekoncentrációját (A) és enzimaktivitását (B) mérjük a CPC-vel végzett kezelések és a centrifugálásos elválasztás után. Az egyes izolátumok fajlagos aktivitását (C) ezeknek az értékeknek a hányadosaként számítjuk ki (aktivitás/fehérjekoncentráció).

10

A 2. ábra zárványtestekből nyert nyers emlős eredetű urikáz és 0,075 % CPC-vel kezelt urikáz méretkizárásos HPLC kromatográfiás analizisét mutatja be.

15 (A) CPC-vel végzett kezelés nélküli, szolubilizált *E. coli* zárványtestek és (B) CPC-vel (0,075 %) végzett kicsapás és szűrés utáni felülúszó folyadék méretkizárásos HPLC profiljait analizáljuk. Az ábrák alatti táblázatokban összesítjük az egyes maximumok alatti területeket és az összterület százalékában kifejezett értékeket.

20

A 3. ábra a CPC-vel kezelt urikáz SDS-PAGE (15 % gél) analizisét mutatja be.

Az urikáztartalmú mintákat az 1. példában leírtak szerint állítottuk elő. A minták az eljárás különböző lépéseiben vett alikvot részek a következők szerint: 1. mező: oldott zárványtestek; 2. mező: CPC-vel végzett kezelés utáni felülúszó folyadék; 3. mező: CPC-vel végzett kezelés utáni szemcse.

25

A 4. ábra nyers scFv antitest méretkizárásos HPLC analízisét mutatja be 0,02 % CPC-vel végzett kezelés után.

(A) Összehasonlító standardként BTG-271 scFv antitest, (B) szolubilizált zárványtestek és (C) begöngyölést biztosító  
5 kezelés, CPC-vel (0,02 %) történő kicsapás és szűrés utáni felülúszó folyadék méretkizárásos HPLC profiljait elemezzük. Az egyes maximumok alatti területet és az összterület százalé-  
lékában kifejezett értékeket az ábrák alatti táblázatokban foglaljuk össze.

10 Az 5. ábra CPC-vel kezelt scFv antitest SDS-PAGE (15 % gél) analízisét mutatja be.

Az eljárás különféle lépéseiben vett, scFv antitestet tartalmazó mintákat és standardokat mutatunk be a következő  
sorrendben: 1. mező – molekulasúly standardok; 2. mező –  
15 oldott zárványtestek; 3. mező – begöngyölt fehérje; 4. mező – CPC szemcse; 5. mező – CPC-vel végzett kezelés utáni felülúszó folyadék.

A 6. ábra beta-interferon CPC-vel való kezelése előtti és utáni HPLC gélszűrési kromatográfiáját mutatja be.

20 (A) CPC-vel történő kezelés előtt.

(B) CPC-vel történő kezelés után.

200 µl mennyiséget vittünk fel az oszlopra 0,1 mg/ml koncentrációjú beta-interferon-oldatból.

#### **A TALÁL MÁNY RÉSZLETES LEÍRÁSA**

25 A fehérjék amfolitok, mind pozitív, mind negatív töltéssel rendelkeznek. A fehérjével kölcsönhatásba lépő oldat és a töltéssel rendelkező molekulák pH-értéke befolyásolja a fehérje

nettó töltését. Fehérjék között erős kölcsönhatások mehetnek végbe, ha valamely fehérje nettó töltése semleges (izoelektromos pont). Ha az oldat pH-értéke a fehérje izoelektromos pontja alatt van, akkor a fehérje nettó pozitív töltéssel rendelkezik, és elektrosztatikus taszítás léphet fel a kationos molekulák között, ideértve az egyéb fehérjéket is.

A találmány célja eljárás biztosítása szolubilizált célfehérje tisztítására a célfehérje és szennyező fehérjék elegyét tartalmazó oldatból oly módon, hogy a szolubilizált elegyet valamely kationos felületaktív anyag hatékony mennyiségével érintkez-  
10 tetjük, és a célfehérjét kinyerjük. A kationos felületaktív anyagok pozitív töltésű felületaktív molekulák. Ezek a vegyü-  
letek általában legalább egy nem-poláros alifás csoportot is tartalmaznak. A célfehérje izoelektromos pontja előnyösen na-  
15 gyobb mint 7. Az egyik kiviteli alaknál az oldat pH-értéke körülbelül ugyanakkora mint a célfehérje izoelektromos pontja. Az egyik előnyös kiviteli alaknál az oldat pH-értéke kisebb mint a célfehérje izoelektromos pontja. Az egyik kiviteli alaknál, amikor az oldat pH-értéke nagyobb mint a célfehérje izo-  
20 elektromos pontja, az oldat pH-értéke 1-2 pH-egységen belül megközelíti a célfehérje izoelektromos pontját. Az egyik kiviteli alaknál, amikor az oldat pH-értéke nagyobb mint a célfehérje izoelektromos pontja, az oldat pH-értéke 1 pH-egységen belül megközelíti a célfehérje izoelektromos pontját.

25 Az egyik kiviteli alaknál a szennyező fehérjét vagy fehérjéket preferenciálisan csapjuk ki, növelve ezáltal az oldatban maradó fehérjékben a célfehérje részarányát. Ha például a cél-

fehérje és a szennyező fehérje olyan oldatából indulunk ki, ahol a célfehérje 20 %-a az oldatban lévő összes fehérjének, akkor a találmány szerinti eljárással úgy tisztíthatjuk a célfehérjét, hogy a kapott oldatban a célfehérje az oldatban  
5 visszamaradó összes fehérjének 30 %-a vagy több, 40 %-a vagy több, 50 %-a vagy több, 60 %-a vagy több, 70 %-a vagy több, 80 %-a vagy több, 90 %-a vagy több, 95 %-a vagy több.

A „preferenciálisan kicsapjuk” kifejezés, amint azt itt használjuk, azt jelenti, hogy egy fehérjét vagy fehérjék egy  
10 csoportját nagyobb mértékben csapjuk ki mint egy másik fehérjét vagy fehérjék egy másik csoportját. Célfehérje és szennyező fehérjék elegye esetén például a szennyező fehérjéket preferenciálisan csapjuk ki a célfehérjéhez képest akkor, ha a szennyező fehérjék 20 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 20 %-át  
15 csapjuk ki. Előnyösen a szennyező fehérjéknek nagy százalékát kicsapjuk, miközben a célfehérjének csak kis százalékát csapjuk ki. Az előnyös kiviteli alakoknál a szennyező fehérjének 30 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 30 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 40 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 40 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 50 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 50 %-át  
20 csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 60 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 60 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 70 %-át vagy ezt  
25 csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 70 %-át vagy ezt

meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 70 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 80 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 80 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 90 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 90 %-át csapjuk ki; a szennyező fehérjéknek 95 %-át vagy ezt meghaladó részét kicsapjuk, miközben a célfehérjének kevesebb mint 95 %-át csapjuk ki. Előnyösen a célfehérje kis százalékát csapjuk ki, például kevesebb mint 60 %-át, kevesebb mint 50 %-át, kevesebb mint 40 %-át, kevesebb mint 30 %-át, kevesebb mint 20 %-át, kevesebb mint 10 %-át, kevesebb mint 5 %-át vagy kevesebb mint 1 %-át.

Az egyik kiviteli alaknál az oldatban lévő fehérje teljes mennyisége (célfehérje + szennyező fehérje) a találmány szerinti tisztító eljárás kivitelezése előtt 0,1-10 mg/ml. Egyes kiviteli alakoknál az oldatban lévő fehérje teljes mennyisége a találmány szerinti tisztító eljárás kivitelezése előtt 0,1-3 mg/ml, 0,3-2 mg/ml, 0,5-2 mg/ml, 0,5-1 mg/ml, 1-2 mg/ml vagy 1 mg/ml körüli.

Egyes kiviteli alakoknál a szennyező fehérjék preferenciális kicsapása közvetlen, és nem függ vagy nem függ lényegesen a polianionok jelenlététől. Egy másik kiviteli alaknál a szennyező fehérjék preferenciális kicsapása közvetlen, és nem függ vagy nem függ lényegesen szilárd hordozó jelenlététől. Egy további kiviteli alaknál a szennyező fehérjék preferenciális kicsapása nem függ vagy nem függ lényegesen a szennyező

fehérjék és más molekulák közötti aggregátumok jelenlététől. A szennyező fehérjék preferenciális kicsapása nem függ vagy nem függ lényegesen valamelyik alkotórésztől (pl. polianionoktól, szilárd hordozóktól vagy a szennyező fehérjék és más molekulák aggregátumaitól), ha például az illető alkotórész eltávolítása nincs kihatással illetve nincs lényeges kihatással a szennyező fehérje preferenciális kicsapására. Valamely alkotórész eltávolítása például akkor nincs lényeges hatással, ha a szennyező fehérjék preferenciálisan kicsapódnak mind az illető alkotórész jelenlétében, mind a távollétében. További példa az lehet, hogy a szennyező fehérjék ugyanolyan mértékben csapódnak ki preferenciálisan, akár jelen van az illető alkotórész, akár nincs. Előnyösen a szennyező fehérjéknek azonos vagy lényegében azonos mennyisége csapódik ki az illető alkotórész távollétében vagy lényegében távollétében mint az alkotórész jelenlétében.

Egy másik kiviteli alaknál az eljárást polianionok távollétében vagy lényeges mennyiségű polianionok távollétében folytatjuk le. Egy további kiviteli alaknál az eljárást szilárd hordozó távollétében vagy lényeges szilárd hordozó távollétében vitelezzük ki. Egy másik kiviteli alaknál az eljárást a szennyező fehérjék és más molekulák közötti aggregátumok távollétében vagy a szennyező fehérjék és más molekulák közötti molekulák lényeges mennyiségeinek távollétében folytatjuk le. A polianionokból, szilárd hordozóból valamint a szennyező fehérjék és más molekulák közötti aggregátumokból álló csoport két vagy három tagjának távollétében vagy lényeges



mennyiségeinek távollétében vitelezzük ki előnyösen az eljárást.

A találmány értelmében tehát úgy járunk el, hogy

- 5 (a) szolubilizált célfehérjét és egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét és lúgos puffert tartalmazó oldatból indulunk ki, ahol a célfehérje izoelektromos pontja nagyobb mint 7, a célfehérje lúgos pH-értéken pozitív töltésű és az egy vagy több szennyező fehérje polianion töltéssel rendelkezik;
- 10 (b) az oldatot egy vagy több kationos felületaktív anyaggal érintkeztetve az egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét preferenciálisan kicsapjuk, ezzel megnövelve az oldatban maradó szolubilizált fehérjék között a szolubilizált célfehérje arányát, ahol az egy vagy több kationos felületaktív anyag amfipatikus ammóniumvegyület, amely a  $QN^+$  általános képletű kvaterner ammóniumvegyületekből, az  $RNH_3^+$  általános képletű, paraffinláncot tartalmazó primer ammóniumvegyületekből és a felsoroltak sóiból álló csoportból kerül kiválasztásra; és
- 15 (c) a szolubilizált célfehérjét kinyerjük.
- 20 A találmány szerinti eljárás birtokában a szakember rutinjába tartozik az alkalmazandó felületaktív anyag és a körülmények, pl. pH, hőmérséklet, sótartalom, a kationos felületaktív anyag koncentrációja, teljes fehérjekoncentráció kiválasztása annak érdekében, hogy az eljárás kivitelezése során növekedjen a célfehérje tisztításának hatékonysága.
- 25 Összehasonlíthatunk például eltérő pH-értékeken és eltérő felületaktív anyagkoncentrációk mellett végzett tisztításokat az

optimális tisztítási feltételek meghatározásához. Példákat erre az eljárásra a kiviteli példák szolgáltatnak. Az egyik kiviteli alaknál az oldat pH-értékét úgy választjuk meg, hogy a lehető legnagyobb értékű legyen anélkül, hogy lényegesen csökkenne a kinyert célfehérje mennyisége.

A találmány további célja eljárás biztosítása azoknak a feltételeknek a meghatározására, amelyek lehetővé teszik a célfehérjék hatékony tisztítását az oldhatóságuk alapján a kationos felületaktív anyagok hatására.

A kationos felületaktív anyag hatékony mennyisége az a mennyiség, amely a szennyező fehérjék preferenciális kicsapását okozza. Az egyes kiviteli alakoknál a felületaktív anyag hatékony mennyisége a szennyező fehérjék 40 %-át, 50 %-át, 60 %-át, 70 %-át, 80 %-át, 90 %-át, 95 %-át vagy 99 %-át csapja ki.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a kationos felületaktív anyagot 0,001-5,0 % koncentrációban adagoljuk, előnyösen a kationos felületaktív anyagot 0,01-0,5 % koncentrációban adagoljuk, és különösen előnyösen a kationos felületaktív anyagot 0,03-0,2 % koncentrációban adagoljuk. Egyes kiviteli alakoknál a kationos felületaktív anyagot 0,01-0,1 %, 0,01-0,075 %, 0,01-0,05 % vagy 0,01-0,03 % koncentrációban adagoljuk.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a fenti eljárást akkor folytatjuk le, amikor a kationos felületaktív anyag amfipatikus ammóniumvegyület.

Az egyik előnyös kiviteli alaknál a szolubilizált célfehérjét további feldolgozásnak vetjük alá, miután preferenciálisan ki-

csaptuk a szennyező fehérjéket. Az ilyen további feldolgozás magába foglalhat további tisztító lépéseket, aktivitás- vagy koncentrációmeghatározásokat, dialízist, kromatográfiát (pl. HPLC, méretkizárásos kromatográfia), elektroforézist stb.

5 Amint e kifejezéseket itt használjuk, az amfipatikus ammóniumvegyületek átfogják a mind kationos, mind nem-  
 poláros részeket tartalmazó,  $QN^+$  vagy  $RNH_3^+$  általános kép-  
 10 letű vegyületeket. Q azt jelzi, hogy a nitrogén kvaterner ammóniumcsoport (ahol a nitrogénatom kovalens kötással  
 kapcsolódik négy szerves csoporthoz, amelyek egymáshoz is  
 kapcsolódhatnak vagy egymáshoz nem kapcsolódnak). Ha a  
 szerves csoportok egymáshoz kapcsolódnak, gyűrűs alifás  
 vagy aromás vegyületeket alkothatnak a gyűrűs szerkezetet  
 15 képező alkotórészek közötti kötések elektronkonfigurációjától  
 függően. Ha a kiválasztott amfipatikus ammóniumvegyület ál-  
 talános képlete  $RNH_3^+$ , akkor a vegyület primer amin, ahol R  
 jelentése alifás csoport. Az alifás csoportok nyílt szénláncú  
 szerves csoportok.

20 A találmány egyik kiviteli alakjánál a kiválasztott amfipatikus ammóniumvegyület halogeniddel sót képezhet. A halogenidsók általában a fluorid-, klorid-, bromid- és jodidiont tartalmazó sók.

A találmány egyik kiviteli alakjánál az amfipatikus ammóniumvegyület legalább egy, 6-20 szénatomos alifás lán-  
 cot tartalmaz, előnyösen az amfipatikus ammóniumvegyület  
 25 legalább egy, 8-18 szénatomos alifás láncot tartalmaz.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a kiválasztott amfipatikus ammóniumvegyület a cetil-piridinium-sókból, sztearamid-metil-

piridinium-sókból, lauril-piridinium-sókból, cetil-kinolinium-sókból, lauril-amino-propionsav-metil-észter-sókból, lauril-amino-propionsav-fémsókból, lauril-dimetil-betainból, sztearil-dimetil-betainból, lauril-dihidroxi-etil-betainból és benzetónium-sókból álló csoportból kerül kiválasztásra.

A használható amfipatikus ammóniumvegyületek átfogják a következőket, azonban nem korlátozódnak a felsoroltakra: hexadecil-piridinium-klorid, dekvalinium-acetát, hexadecil-piridinium-klorid, cetil-trimetil-ammónium-klorid, vegyes n-alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, cetil-piridinium-klorid (CPC), N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenoxi]-etoxi]-etil]-benzol-metán-ammónium-klorid, alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid és diklór-benzil-dimetil-alkil-ammónium-klorid, tetradecil-trimetil-ammónium-bromid, dodecil-trimetil-ammónium-bromid, cetil-trimetil-ammónium-bromid, lauril-dimetil-betain, sztearil-dimetil-betain és lauril-dihidroxi-etil-betain.

A találmány egyik kiviteli alakjánál az amfipatikus ammóniumvegyület valamely cetil-piridiniumsó, így cetil-piridinium-klorid.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a kívánt fehérjét tartalmazó elegy sejtalkotórészeket, például mikroorganizmusoktól, így baktériumoktól mint E. colitól származó, sejtalkotórészeket is tartalmaz.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a sejtalkotórész egy vagy több fehérje.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a célfehérje rekombináns fehérje, például enzim lehet,

A találmány szerinti eljárás felhasználható sokféle fehérje tisztítására. Ezek a fehérjék a következők lehetnek, azonban  
 5 nem korlátozódnak a felsoroltakra: antitestek, urikáz, beta-interferon, pióca faktor X inhibitor, savas dezoxi-ribonukleáz II, elasztáz, liszozim, papain, peroxidáz, pankreatin ribonukleáz, tripszinogén, tripszin, citokróm c, erabutoxin, staphylococcus aureus enterotoxin C1 és monoamin-oxidáz A, valamint egyéb  
 10 olyan fehérjék, amelyek lúgos körülmények között pozitív töltésűek.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a célfehérje lehet antitest, receptor, enzim, transzport fehérje, hormon vagy ezek  
 15 töredéke vagy konjugátum pl. egy második fehérjéhez vagy vegyszerhez vagy toxinhoz kapcsolódott fehérje.

Az antitestek átfogják a felsoroltakat, azonban nem korlátozódnak ezekre: monoklon, humanizált, kiméra, egyláncú, bispecifikus, Fab töredékek, F(ab')<sub>2</sub> töredékek, Fab expresszálo könyvtár által termelt töredékek, anti-idiotípusú  
 20 (anti-Id) antitestek, valamint a fentiek közül bármelyik epitopmegkötő töredékei, azzal a feltétellel, hogy a tisztítás körülményei között az antitest pozitív töltésű.

Monoklon antitestek előállítására minden olyan módszer használható, amely sejtvonalak folyamatos kulturájából  
 25 antitest-molekulákat termel. Ezek a módszerek a következőket fogják át, azonban nem korlátozódnak a felsoroltakra: Kohler és Milstein hidridoma módszere [1975, Nature 256, 495-497 és

4,376,110 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás],  
emberi B-sejt hibridoma módszer [Kozbor és munkatársai,  
1983, Immunology Today 4, 72; Cole és munkatársai, 1983,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030] és emberi  
5 monoklon antitestek előállítására szolgáló EBV-hibridoma  
módszer [Cole és munkatársai, 1985, Monoclonal Antibodies  
and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96].

Az ilyen antitestek alapként alkalmazhatók, amelyről  
klónozhatók és rekombinálással expresszálnak az egyes  
10 nehéz és könnyű láncok. A két lánc rekombinálással  
expresszálnak ugyanabban a sejtben vagy in vitro kombinál-  
ható külön-külön történő expresszálnak és tisztítás után. A  
kivánt nehéz vagy könnyű láncot kódoló vagy a kivánt nehéz  
vagy könnyű lánc változó tartományát tartalmazó molekulát  
15 kódoló nukleinsavakat (pl. plazmid vektoron) sejtbe juttathatjuk,  
amely így egy antitest meghatározott nehéz vagy könnyű  
láncát vagy az azt tartalmazó molekulát expresszálnak multimer  
fehérje kifejezése érdekében. Úgy is eljárhatunk, hogy nehéz  
láncokat vagy azok változó tartományát vagy CDR-ét  
20 tartalmazó molekulákat a kiegészítő könnyű lánc vagy annak  
változó tartományának jelenléte nélkül expresszálnak és  
használunk fel. Más kiviteli alakoknál az ilyen antitestek és  
fehérjék a láncvégi nitrogénatomnál vagy szénatomnál módó-  
sítottak lehetnek, például a láncvégi karboxilcsoport amidá-  
25 lásával vagy a láncvégi aminocsoport acetilezésével.

A kiméra antitest olyan molekula, amelynek a különféle  
részei különböző állatfajtaktól származnak, például patkány

mAb eredetű és emberi immunglobulin állandó tartományból származó változó tartományt tartalmaz. [Lásd például Cabilly és munkatársai, 4,816,567 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; és Boss és munkatársai, 5,816,397 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás.] A kiméra antitestek előállítására szolgáló módszerek közé tartozik a megfelelő antigénspecifikusságú egér antitest molekulától származó gének és megfelelő biológiai aktivitású emberi antitest molekula génjeinek részekre bontása [lásd például Morrison és munkatársai, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger és munkatársai, 1984, Nature 312, 604-608; Takeda és munkatársai, 1985, Nature 314, 452-454.]

A humanizált antitestek nem-emberi egyedektől származó olyan antitest molekulák, amelyeknek egy vagy több kiegészítésmeghatározó tartománya (CDR, complementarity-determining region) van nem-emberi egyedektől és váz tartományai vannak egy emberi immunglobulin molekulából. A humanizált antitestek előállítására szolgáló módszereket például a következő dokumentumokban írtak le: Queen, 5,585,089 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Winter, 5,225,539 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás. A váz tartományok és a CDR-ek nagyságát pontosan definiálták [lásd „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E. és munkatársai, U.S. Department of Health and Human Services (1983)].

Egyláncú antitestek az Fv tartomány nehéz és könnyű lánc-töredékeinek aminosavhidon keresztül történő összekapcsolá-

sával képződnek, amikor is egyetlen láncból álló polipeptid jön létre. Az egyláncú antitestek előállítására szolgáló módszereket például a következő helyeken írták le: 4,946,778 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston és munkatársai, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; Ward és munkatársai, 1989, Nature 334, 544-546.

A bispecifikus antitest olyan genetikailag kialakított antitest, amely két céltípust ismer fel, pl. (1) egy specifikus epitópot és (2) egy „kioldó” (trigger) molekulát, például mieloid sejteken lévő Fe receptorokat. Az ilyen bispecifikus antitesteket kémiai összekapcsolással, hibridomával vagy rekombináns biológiai módszerekkel állíthatjuk elő.

Az antitest töredékek kiterjednek a következőkre, azonban nem korlátozódnak a felsoroltakra: az  $F(ab')_2$  töredékek, amelyek az antitest molekula pepszines feltárásával nyerhetők és az  $F(ab')$  töredékek, amelyek az  $F(ab')_2$  töredékek diszulfid-hídjaik redukciójával állíthatók elő. Fab expresszálo könyvtárát is kialakíthatunk [Huse és munkatársai, 1989, Science 246, 1275-1281] annak érdekében, hogy gyorsan és könnyen azonosíthassuk a kívánt specifikusságú monoklon Fab töredékeket.

A találmány egyik kiviteli alakjánál a fehérje valamely urikáz.

A találmány egy másik kiviteli alakjánál az urikáz emlős eredetű urikáz.



A találmány egy másik kiviteli alakjánál az emlős eredetű urikáz változékony emlős eredetű urikáz.

A találmány egy további kiviteli alakjánál az emlős eredetű urikáz sertés eredetű urikáz.

5 A találmány egy még további kiviteli alakjánál a változékony sertés eredetű urikáz PKSΔN jelzésű urikáz.

A találmány egy másik kiviteli alakjánál a fehérje valamely antitest.

10 A találmány egy másik kiviteli alakjánál az antitest egyláncú antitest.

A találmány egy további kiviteli alakjánál a fehérje valamely interferon.

A találmány egy még további kiviteli alakjánál az interferon beta-interferon. Az egyik kiviteli alaknál az interferon 1b beta-interferon. [Nagola, S. és munkatársai, Nature, 284:316 (1980);  
15 Goeddel, D.V. és munkatársai, Nature, 287:411 (1980);  
Yelverton, E. és munkatársai, Nuc. Acid Res., 9:731 (1981);  
Streuli, M. és munkatársai, Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.),  
78:2848 (1981); 28033 sz. európai szabadalmi bejelentés,  
20 1981 május 6-án publikálva; 321134 sz. európai szabadalmi bejelentés, 1981 július 15-én publikálva; 34307 sz. európai szabadalmi bejelentés, 1981 augusztus 26-án publikálva; és 837 379 sz. belga szabadalom, 1981 július 1-én megadva.] A felsorolt dokumentumokban különféle módszereket írtak le  
25 beta-interferon előállítására rekombináns DNS módszerek alkalmazásával. A bakteriális úton termelt interferonok kinyerésére és tisztítására szolgáló módszereket a következő do-

kumentumok ismertetik: 4,450,103; 4,315,852; 4,343,735; és 4,343,736 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások; Derynck és munkatársai, Nature (1980) 287:193-197; és Scandella és Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971).

5 Az egyik kiviteli alaknál a célfehérje pióca faktor Xa. A pióca faktor Xa bármilyen, a szakember számára ismert módon előállítható, így a 6,211,341 sz. amerikai szabadalmi leírásban és a WO 94/23735 sz. nemzetközi szabadalmi publikációban leírt módszerrel.

10 A találmány egyik kiviteli alakjánál az érintkeztetést körülbelül 1 perc és körülbelül 48 óra közötti ideig, előnyösebben körülbelül 10 perc és körülbelül 24 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és körülbelül 12 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és körülbelül 8 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és  
15 körülbelül 6 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és körülbelül 4 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és körülbelül 2 óra közötti ideig, körülbelül 30 perc és körülbelül 1 óra közötti ideig vagy körülbelül 1 óra és körülbelül 2 óra közötti ideig végezzük.

A találmány egyik kiviteli alakjánál az érintkeztetést  
20 körülbelül 4 °C és körülbelül 36 °C közötti hőmérsékleten, különösen előnyösen körülbelül 4 °C és körülbelül 26 °C közötti hőmérsékleten folytatjuk le.

A jelen találmány egyetlen szerként is felhasználja a kationos felületaktív anyagot 7-nél nagyobb izoelektromos ponttal rendelkező fehérje lúgos körülmények között történő  
25 tisztítására.

A jelen találmány olyan urikázt is biztosít, amely az elegyből cetil-piridinium-klorid hozzáadásával lúgos körülmények között lett tisztítva.

5 A találmány egyik kiviteli alakjánál az urikázt kódoló DNS-t tartalmazó baktériumsejtből nyerjük az urikázt oly módon, hogy a baktériumsejtet kezelésnek vetjük alá a DNS expresszáálására és az urikáz termelésére, majd az urikázt kinyerjük.

A találmány egyik kiviteli alakjánál az urikázt a baktériumsejten belüli kicsapott anyagokból nyerjük ki.

10 A jelen találmány tisztított urikázt is biztosít urikáz-polimer konjugátum készítéséhez történő felhasználásra.

A találmány 7-nél nagyobb izoelektromos ponttal rendelkező tisztított fehérjét is biztosít, amely úgy állítható elő, hogy a fehérjét tartalmazó elegyet valamely kationos felületaktív anyag hatékony mennyiségével érintkeztetjük olyan körülmények között, hogy a fehérje pozitív töltésű vagy pozitív töltésű részt tartalmaz, majd a fehérjét kinyerjük.

20 A jelen találmány olyan felhasználást is biztosít, amelynél cetil-piridinium-sót használunk olyan fehérje tisztítására, amelynek az izoelektromos pontja 7-nél nagyobb.

Az olyan kiviteli alakoknál, amelyeknél az elegyet egy kationos felületaktív anyag hatékony mennyiségével érintkeztetjük pozitív töltésű célfehérjét biztosító körülmények között, a pH értéke függ a célfehérje természetétől. Előnyösen azonban a pH értéke 7-11 között van; előnyösek a körülbelül 7-10, 7-9, 25 8-11, 8-10 vagy 8-9 közötti pH-tartományok.

## PÉLDÁK

Az itt következő példák célja a találmány megértésének elősegítése a találmány korlátozása nélkül.

### 1. példa

5 **CPC felhasználása emlős eredetű rekombináns urikáz tisztítására**

#### 1.1. Háttér

A gyógyszer minőségű urikáznak lényegében mentesnek kell lennie az urikáztól eltérő fehérjétől. Az E. coli tenyészetben termelt, emlős eredetű urikáz (izoelektromos pontja 10 8,67) a sejteken belül halmozódott fel az organelákhoz hasonló kivált alakban, amit zárványtesteknek (IB) nevezünk. Ez könnyen elkülöníthető további tisztításhoz. Ellentétben azzal a régi nézettel, hogy a zárványtestek kuszált/kigöngyölt expresszált fehérjét tartalmaznak, ezek a zárványtestszerű elemek helyesen begöngyölt urikázt tartalmaznak kicsapott alakban. 15 Lúgos pH, például mintegy 9-11 közötti pH behatásának téve ki a zárványtestszerű elemeket, a kicsapódott fehérje újraoldódott. A szolubilizált zárványtestszerű elemekben az urikáztartalom körülbelül 40-60 % volt, és kiterjedt tisztításra 20 volt szükség ahhoz, hogy homogén urikázkészítményt kapjunk. Ezen a helyen bemutatjuk az urikáz és más fehérje tisztítását cetil-piridinium-kloriddal (CPC), ahol a tisztaság sokféle módszerrel állapítható meg. Az emlős eredetű urikáz tisztaságát például olyan módon értékelhetjük ki, hogy meghatározzuk 25 a fajlagos aktivitást, az elektroforézist és az SDS-PAGE gélek festését követően megjelenő sávok számát, vagy a méretkizá-

rásos HPLC utáni kromatogramban megjelenő maximumok számát és méretét.

## **1.2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **1.2.1. 50 mM NaHCO<sub>3</sub> puffer (pH=10,3)**

5 Ezt a puffert úgy állítottuk elő, hogy nátrium-hidrogén-karbonátot oldottunk, és a végső koncentrációt 50 mM-ra állítottuk be. A pH értékét 10,2-10,4-re állítottuk. A kezdeti pH-értéktől függően 0,1 M HCl-oldat vagy 1 N NaOH-oldat használható.

### **10 1.2.2. 10 %-os CPC-oldat**

10 %-os CPC-oldatot készítettünk oly módon, hogy a CPC-t desztillált vízben oldottuk, és 10 g/100 ml végső koncentrációt állítottunk be.

### **1.2.3. Sertés eredetű rekombináns urikáz expresszálása**

15 Emlős eredetű rekombináns urikázt (urát-oxidáz) expresszáltunk *E. coli* K-12 W3110 F<sup>-</sup> törzsben a Duke University WO 00/08196 sz. nemzetközi szabadalmi publikációjában és a 60/095,489 sz. amerikai egyesült államokbeli ideiglenes szabadalmi bejelentésben leírt módon.

### **20 1.2.4. Az urikázt termelő baktériumok tenyésztése és a tenyészet összegyűjtése**

A baktériumokat 37 °C-on tenyésztettük kazein-hidrolizátumot, élesztőkivonatot, sókat, glukózt és ammóniát tartalmazó táptalajon.

25 A tenyésztés után a baktériumokat, amelyekben az urikáz felhalmozódott, centrifugálással összegyűjtöttük, és a táptalaj maradékának eltávolítására vízzel mostuk.

### 1.2.5. Sejteltörés és kinyerés

5 Az összegyűjtött sejteket 50 mM trisz puffert (pH=8,0) és 10 mM EDTA-t tartalmazó oldatban szuszpendáltuk, és olyan vég-ső térfogatot állítottunk be, amely mintegy 20-szorosa volt a sejtek száraz súlyának. Keverés közben liszozimot adtunk a szemcséhez 2000-3000 egység/ml koncentrációban, és 16-20 órán át inkubáltuk 4-8 °C-on.

10 A sejtlyúzatumot örvényléeses keveréssel, majd ultrahanggal kezeltük. A szuszpenziót azonos térfogatú ionmentesített vízzel hígítottuk, és centrifugáltuk. Az urikáz-zárványtesteket tartalmazó szemcsét ionmentesített vízzel hígítottuk és centrifugáltuk a szennyezések további eltávolítására. Az ennél az utolsó mosó lépésnél nyert szemcsét a további feldolgozáshoz elítettük, a felülúszó folyadékot pedig elöntöttük.

### 15 1.2.6. Oldás

A zárványtestből álló szemcsét 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pufferben (pH= 10,3±0,1) szuszpendáltuk. A szuszpenziót 25±2 °C-on körülbelül 0,5-2 órán át inkubáltuk a zárványtest-eredetű urikáz szolubilizálására.

### 20 1.2.7. Kezelés CPC-vel

25 10 %-os CPC-oldatot élénk keverés közben részletekben adtunk a homogenizált zárványtestekhez (pH=10,3) a kívánt CPC-koncentráció eléréséig. A mintát 1-24 órán át inkubáltuk, amint azt az 1. táblázatban feltüntettük. Az inkubálás folyamán pelyhes csapadék vált ki. A mintát 15 percig centrifugáltuk 12000 x g értéken. A szemcsét és a felülúszó folyadékot elválasztottuk, a szemcsét az eredeti térfogatnak megfelelő 50 mM

NaHCO<sub>3</sub> pufferoldatban (pH=10,3) szuszpendáltuk. Meghatároztuk az egyes frakciók enzimaktivitását, a frakciókat betöményítettük és dializáltuk a maradék CPC eltávolítására.

#### 1.2.8. Fehérjevizsgálat

- 5 A kezelt és kezelés nélküli zárványtestminták alikvot részeinek fehérjetartalmát a módosított Bradford-módszerrel határoztuk meg [Macart és Gerbaut (1982) Clin. Chim. Acta 122:93-101].

#### 1.2.9. Urikázvizsgálat

##### 10 1.2.9.1. Enzimaktivitás

- Az urikáz aktivitását az ultraibolya módszerrel mértük [Fridovich, I. (1965) "The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines", J. Biol. Chem., 240, 2491-2494], azzal a módosítással, hogy 1 mg/ml BSA-t használtunk. Párhuzamos mintákon határoztuk meg az enzimreakció sebességét, mérve a húgysav allantoinná oxidálása folytán bekövetkező abszorbanciacsökkenést 292 nm-en. A definíció szerint egy aktivitásegység az az urikáz-mennyiség, amely percenként egy mikromól húgysav oxidálásához szükséges 25 °C-on a megadott körülmények között. Az urikáz hatékonyságát 1 mg fehérjére vonatkoztatott aktivitásegységekben (U/mg) fejezzük ki.

- 1 mM húgysav extinkciós együtthatója 292 nm-en 1 cm úthossz mellett 12,2. Ezért 1 ml reakcióelegyben jelenlevő 1 μmól húgysav oxidációja 12,2mA<sub>292</sub> abszorbanciacsökkenést eredményez. Az abszorbanciának az idő függvényében fellépő

csökkenését a görbe lineáris szakaszáról állapítottuk meg. Az urikázaktivitást ezután a következőképpen számítottuk ki:

$$\text{aktivitás (U/ml)} = \frac{\Delta A_{292\text{nm}} (\text{AU/min}) \times \text{DF} \times V_{\text{RM}}}{V_{\text{S}} \times 12,2}$$

5

Ahol DF = hígítási faktor;

$V_{\text{RM}}$  = a reakcióelegy össztérfogata ( $\mu\text{l}$ );

$V_{\text{S}}$  = a reakcióelegyhez felhasznált hígított minta térfogata ( $\mu\text{l}$ ).

#### 1.2.9.2. HPLC analízis Superdex 200 alkalmazásával

10 Natív urikáz enzim és a lehetséges szennyező anyagok mennyiségét és százalékos részarányát számszerűsítettük a Superdex 200 oszlop alkalmazásával végzett HPLC kromatográfiával nyert elúciós profil alapján. Az urikáz-oldatból párhuzamos mintákat fecskendeztünk be az oszlopba. Auto-

15 matikusan kiszámítottuk és táblázatokba foglaltuk az egyes maximumok alatti területet és ennek az összterület részarányaként kifejezett nagyságát.

#### 1.2.10. SDS-PAGE analízis

20 15 % SDS-PAGE géleken választottuk el a mintákban lévő fehérjéket, mezőnként mintegy 20  $\mu\text{g}$  fehérje volt jelen. A géleket Coomassie brilliant blue festékkel festettük meg.

### 1.3. EREDMÉNYEK

25 A CPC-vel (0,005-0,075 %) 1-24 órán át végzett kezelésnek a felülúszó folyadékban kimutatott urikázaktivitásra és az urikáz tisztaságára gyakorolt hatását az 1. táblázatban és az 1. ábrán mutatjuk be. A CPC-vel pH=10,3 értéken végzett kezelés előtt a fehérjekoncentráció 1,95 mg/ml, a fajlagos



enzimaktivitás pedig 3,4-4,67 U/mg volt. Az 1B ábrán bemutatott eredmények azt jelzik, hogy az egyes inkubálási időközön belül a felülúszó folyadék fehérjekoncentrációja csökkent a CPC-koncentráció növelésével. 0,04 %-nál kisebb CPC-koncentráció esetén viszonylag csekély hatás volt megfigyelhető a fehérjekoncentráció tekintetében. 0,04-0,075 % koncentrációkban a CPC az eredeti értéknek mintegy 50 %-ára tudta csökkenteni a fehérjekoncentrációt.

Ellentétben a CPC-nek az összfehérje-koncentrációra gyakorolt hatásaival, az összes oldható urikáz aktivitását nem befolyásolta szignifikáns módon a CPC-koncentráció és az inkubálási idő növelése (1A ábra). Az egyes inkubálási időközön belül a fajlagos enzimaktivitás (1C ábra) egyenesen növekedett a CPC-koncentráció függvényében a 0,04-0,075 % közötti tartományban. Ez a növekedés az urikáztól eltérő fehérjek specifikus eltávolításának volt az eredménye. Mivel a végső tisztított enzim fajlagos enzimaktivitása közelítőleg 9 U/mg volt, a szennyező fehérjek többségét a CPC-vel végzett kicsapás távolította el. A HPLC és SDS-PAGE analízisek valóban alátámasztották ezt a következtetést.

#### 1. táblázat

A CPC-vel végzett kezelés hatása az urikáz fajlagos aktivitására és tisztaságára

Inkubálás ideje (h)	[CPC] (%)	Urikáz aktivitása (U/ml)	[Fehérje] (mg/ml)	Urikáz fajlagos aktivitása (U/mg)

1	0 (hozzá- adás)	6,63	1,95	3,4
1	0,005	7,1	1,8	3,9
1	0,01	6,63	1,75	3,7
1	0,02	6,63	1,75	3,7
1	0,04	6,4	1,47	4,35
1	0,06	5,9	0,95	6,2
1	0,075	6,4	0,9	7,1
4	0,005	8,61	1,7	5,06
4	0,01	8,36	1,66	5,04
4	0,02	8,36	1,6	5,04
4	0,04	7,38	1,32	5,59
4	0,06	6,4	0,9	7,1
4	0,075	6,9	0,82	8,4
24	0,005	8,8	1,9	4,66
24	0,01	7,9	1,9	4,14
24	0,02	7,9	1,9	4,14
24	0,04	7,3	1,5	4,9
24	0,06	6,9	0,97	7,1
24	0,075	6,6	0,9	7,4
24	0 (hozzá- adás)	9,1	1,95	4,67

#### 1.4 Annak megerősítése, hogy a CPC-kezelés növeli az urikáz tisztaságát

Az 1.3. pontban leírtak szerint elkülönítettünk és szolubilizáltunk urikáz tartalmú zárványtesteket. Az oldható anyag

mintáit a CPC-vel végzett kezelés előtt és a CPC-vel kicsapott fehérje szűrése után analizáltuk.

#### 1.4.1. Az urikáztól eltérő fehérjék HPLC analízise 0,075 % CPC-vel végzett kezelés után

5       A szolubilizált zárványtestek HPLC analízise azt mutatta, hogy az urikáznak megfelelő maximum (retenciósi idő (RT) ~25,5 min) a nyers zárványtestekből álló minta fehérjetartalmának körülbelül 46 %-át tartalmazza (2A ábra). A CPC-vel végzett kezelés után az urikáznak megfelelő maximum a  
10       fehérjetartalomnak mintegy 92 %-ára növekedett (2B ábra), és egyidejűleg jelentősen csökkentek a 15-22 min retenciósi időnél eluálódó szennyező anyagok (2A ábra). Az urikáznak megfelelő maximum alatti terület mintegy 70 %-a a 2A ábrán lévőnek. Ezek az eredmények tehát azt jelzik, hogy az urikáz tisztasága kétszeresre növekszik annak eredményeként, hogy a  
15       CPC-vel végzett kezeléssel eltávolítottuk az urikáztól eltérő fehérjét.

#### 1.4.2. 0,075 % CPC hatása az enzimaktivitásra

20       A 2. táblázatban feltüntetett eredmények azt mutatják, hogy az urikázaktivitás tömegmérlege megmaradt a kezelés folyamán. A CPC-vel végzett kezelés az oldatban lévő összes fehérje 60 %-át kicsapta. Az enzimaktivitásnak több mint 85 %-a az oldatban maradt, tehát a külső fehérje eltávolítása több mint 110 %-kal növelte meg a képződött felülúszó folyadék fajlagos aktivitását. Hasonlóan a legtöbb tisztító eljáráshoz, a  
25       kívánt aktivitásnak egy része a szemcsében maradt. Ebben az esetben az eredeti aktivitásnak mindössze 17,6 %-a maradt a

szemcsében (ezt 50 mM nátrium-bikarbonátot tartalmazó oldattal (7 mSi, pH=10,3) extraháltuk analitikai célokra), és ez a teljes mennyiségnek viszonylag csekély része.

2. táblázat

5 A CPC-vel végzett kezelés hatása az urikáz aktivitására

Minta	Teljes aktivitás (U)	Aktivitás (U/ml)	[Fehérje] (mg/ml)	Fajlagos aktivitás (U/mg)	Visszanyert aktivitás
CPC előtt	490	4,9	2	2,46	100
CPC-kezelés után	418	4,18	0,8	5,2	85,3
Szemcsé a CPC-kezelés után	86	0,8	-	-	17,6

1.4.3. SDS-PAGE analízis a 0,075 % CPC-vel végzett kezelés után

10 SDS-PAGE módszerrel analizáltuk az azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó következő mintákat: nyers urikáz, CPC-vel való kezelés előtt, a következő frakciók, az oldható és oldhatatlan anyag elválasztása után, CPC-vel végzett kezelés után, a frakciók centrifugálásos elválasztása után és a centrifugálással nyert pellet rekonstitúciója után. Az eredmények  
15 (lásd a 3. ábrát) azt mutatják, hogy szennyező fehérjék vannak

jelen a CPC-vel végzett kezelés előtt. A CPC-vel végzett kezelés után a szemcse tartalmazta a szennyező fehérjék legnagyobb részét, míg a felülúszó folyadék tartalmazta az urikázt, amely egyetlen nagyobb fehérjesávon eredményezett.

5                    **2. példa**

**CPC hatása egyláncú (scFv) antitestek tisztítására**

**2.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

**2.1.1. Pufferek**

**2.1.1.1. Puffer a zárványtest oldásához**

10            Az oldáshoz használt puffer a következőket tartalmazta: 6M karbamid, 50 mM trisz, 1 mM EDTA és 0,1 M cisztein. A puffer pH-értékét 8,5-re állítottuk be.

**2.1.1.2. A fehérje begöngyöléséhez használt puffer**

15            A fehérje begöngyöléséhez használt puffer a következőket tartalmazta: 1 M karbamid, 0,25 mM NaCl, 1 mM EDTA és 0,1 M cisztein. A puffer pH-értékét 10,0-re állítottuk be.

**2.1.2. Az scFv antitestek expresszálása baktériumokban**

20            A karboxil végen cisztein-lizin-alanin-lizin szekvenciát tartalmazó scFv-t kódoló vektorral transzformált E. coli baktériumokban expresszáltunk scFv antitesteket (pI=8,9) a WO 02/059264 sz. PCT publikációban leírtak szerint.

**2.1.3. Az scFv antitestet termelő baktériumok tenyésztése és a tenyészet összegyűjtése**

25            Az scFv-t tartalmazó baktériumsejteket minimális táptalajon tenyésztettük pH=7,2 értéken, és a táptalajt L-argininnel egészítettük ki 0,5 % végső koncentrációig. A tenyésztést 5 órán át végeztük az indukció előtt. Az scFv expresszálását a

táptalajban lévő glukóz mennyiségének korlátozásával indukáltuk. Az scFv-t tartalmazó baktériumsejteket ultraszűréssel gyűjtöttük össze a táptalajról.

#### 2.1.4. Sejteltávolítás és a zárványtestek kinyerése

5 Az összegyűjtött sejtek szemcséjét 50 mM trisz puffert (pH=8,0) és 10 mM EDTA-t tartalmazó oldatban szuszpendáltuk, és olyan végső térfogatot állítottunk be, amely közelítőleg 20-szorosa volt a száraz sejt súlynak. Keverés közben liszozimot adtunk 2000-3000 egység/ml koncentrációban a  
10 szuszpendált szemcséhez, majd 16-20 órán át inkubáltuk 4 °C hőmérsékleten.

A sejtlyúzást örvényléssel, majd ultrahanggal kezeltük. Az scFv antitestet tartalmazó zárványtesteket centrifugálással nyertük ki 10 000 x g értéken. A szemcsét a tömegének közelítőleg 16-szorosára hígítottuk ionmentesített vízzel,  
15 majd centrifugáltuk a szennyező anyagok további eltávolítására. Az ebben az utolsó mosólépésben kapott szemcsét eltettük további feldolgozáshoz.

#### 2.1.5. Oldás és a fehérje újragöngyölése

20 A zárványtestekben feldúsított szemcsét a zárványtest oldására használt pufferben (lásd fentebb) szuszpendáltuk, 5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, és in vitro újragöngyöltük a fehérjét arginin/oxidált glutation alapú oldatban. Újragöngyölés után a fehérjét dializáltuk és koncentráltuk  
25 tangenciális áramlású szűréssel karbamidot tartalmazó foszfát pufferrel szemben.

#### 2.1.6. Kezelés CPC-vel

10 %-os CPC-oldatot adtunk az scFv újragöngyölő elegy-  
hez 0,02 % végső koncentráció eléréséig, majd 1-2 órán át  
szobahőmérsékleten végzett inkubálás után a csapadékot  
szűréssel eltávolítottuk. A felülúszó folyadék tartalmazta az  
5 scFv antitestet.

## 2.2. EREDMÉNYEK

### 2.2.1. A CPC-koncentráció hatása a kinyerhető scFv antitestre

10 A 3. táblázatban tüntetjük fel a CPC-nek az scFv antitest  
tisztaságára és termelésére gyakorolt hatását (7,5 vagy 10 pH-  
értéken). A CPC-vel végzett kezelés előtt a zárványtestben  
lévő kezdeti fehérjemennyiség 73 mg volt, amely Superdex 75  
oszlopon végzett HPLC analízissel meghatározva 15,87 mg  
scFv antitestet tartalmazott. Az scFv antitestnek megfelelő  
15 maximumok retenciós ideje (RT) közelítőleg 20,6 perc volt. Az  
eredmények azt mutatják, hogy a CPC-koncentráció növelésé-  
vel általában csökkent az összfehérje kinyerése, és 0,03 %-nál  
kisebb CPC-koncentráció esetén az scFv antitest termelése  
>80 % maradt. A szennyező fehérje hatékonyabb eltávolítását  
20 érték el pH=7,5 értéken, mint pH=10 értéken. Tehát az scFv  
antitest tisztítását érték el 0,01-0,03 % CPC-vel végzett  
kezeléssel.

### 3. táblázat

25 A CPC-kezelés hatása az scFv antitest termelésére és  
tisztaságára

Oldható	Össz-	Összes	Tisztítási	ScFv
---------	-------	--------	------------	------

zárványtestek kezelése	fehérje (mg)	scFv HPLC alapján (mg)	tényező	kitermelés HPLC alapján (%)
Kontroll (CPC- kezelés előtt)	73	15,87		100
0,01 % CPC (pH=10)	64	15,66	1,13	98,68
0,01 % CPC (pH=7,5)	50,76	14,97	1,36	94,33
0,015 % CPC (pH=10)	54	14,49	1,23	91,30
0,015 % CPC (pH=7,5)	39,96	14,22	1,64	89,60
0,02 % CPC (pH=10)	43	13,35	1,43	84,12
0,02 % CPC (pH=7,5)	37,8	13,02	1,58	82,04
0,03 % CPC (pH=10)	35	11,12	1,46	70,07
0,03 % CPC (pH=7,5)	37,8	12,47	1,52	78,58

### 2.3. ANNAK MEGERŐSÍTÉSE, HOGY A CPC-VEL VÉGZETT KEZELÉS NŐVELI AZ scFv ANTITEST TISZTASÁGÁT

5 2.3.1. A kinyert scFv HPCL analízise a CPC-kezelés után



Az újragöngyölt fehérje HPLC analízise azt mutatja, hogy az scFv antitestnek megfelelő maximum (retenciós idő: ~20,6 perc) az összes fehérjének körülbelül 22,7 %-át tartalmazta (4B ábra). A 4C ábrán látható kromatogram azt mutatja, hogy 0,02 % CPC-vel végzett kezelés után az scFv antitestnek megfelelő maximum az összes befecskendezett fehérje 75,9 %-át tartalmazta a felülúszó folyadékban, ami 3,3-szeres tisztítást jelez. A CPC-vel végzett kezelés tehát eltávolított szennyező fehérjéket az scFv antitest oldataiból.

### 2.3.2. A kinyert scFv SDS-PAGE analízise a CPC-kezelés után

Az eredmények (lásd az 5. ábrát) azt mutatják, hogy a CPC-vel végzett kezelés előtt a minta jelentős mennyiségeket tartalmazott nagy számú fehérjéből. Hasonló módon, a CPC-vel végzett kezelés után a szemcse nagy számú fehérjét tartalmazott. Ezzel ellentétben a CPC-kezelés utáni felülúszó folyadék egyetlen nagy fehérjesávot tartalmazott, amely az scFv antitestnek felelt meg.

### 3. példa

#### CPC hatása rekombináns beta-interferon tisztaságára

Ismert módszerekkel expresszáltunk beta-interferont (pl: 8,5-8,9) E. coli baktériumokban. Nagola, S. és munkatársai, Nature, 284:316 (1980); Goedel, D.V. és munkatársai, Nature, 287:411 (1980); Yelverton, E. és munkatársai, Nuc. Acid Res., 9:731 (1981); Streuli, M. és munkatársai, Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.), 78:2848 (1981); 1981 május 6-án publikált 28033 sz., 1981 július 15-én publikált 321134 sz. és 1981 augusztus 26-

án publikált 34307 sz. európai szabadalmi bejelentések; valamint az 1981 július 1-én engedélyezett 837 379 sz. belga szabadalom különféle módszereket ismertető beta-interferon rekombinációs DNS-módszerekkel történő előállítására. A bakteriális úton termelt interferonok kinyerésére és tisztítására szolgáló eljárásokat a következő dokumentumok ismertetik: 4,450,103; 4,315,852; 4,343,735; és 4,343,736 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások; valamint Derynck és munkatársai, *Nature* (1980) 287:193-197; és Scandella és Kornberg, *Biochemistry*, 10:4447 (1971). A beta-interferont tartalmazó zárványtesteket elkülönítettük és szolubilizáltuk.

A kapott oldatot CPC-vel kezeltük. A 6. ábrán bemutatott eredmények a szennyező fehérjék mennyiségének jelentős csökkenését jelzik a CPC-vel végzett kezelés után. A beta-interferon tényleges mennyisége (a maximum alatti terület) nem igen változott a CPC-vel végzett kezelés után.

A 4. táblázatban foglaljuk össze a CPC-vel végzett kezelés hatásait. Az összes fehérje (Bradford) 40 %-kal csökkent, az UV abszorbancia körülbelül 40 %-kal csökkent, a beta-interferon mennyisége azonban változatlan maradt.

4. táblázat

Minta és kezelés	Fehérje (mg/ml)	O.D. $A_{280}$	Beta-interferontartalom (mg/ml) <sup>a</sup>	SEC profil
Kontroll (fehérje göngyölése után nincs CPC, 1049-31)	0,51	1,55	0,069	A 13 <sup>a</sup> min retenció idejű maximum az össz-

				terület 15 %-a
Teszt (fehérje göngyölése után kezelés 0,05 % CPC- vel, 1049-31)	0,3	1,0	0,069	A 13 <sup>a</sup> min retenciós idejű maximum az össz- terület 7,34 %-a

<sup>a</sup> Vydac C4 oszlopon meghatározva.

<sup>b</sup> A SEC profil több maximumot tartalmazott. A 13 perc  
retenciós idejű elúciónak megfelelő maximum csökken a CPC-  
5 vel végzett kezelés hatására, és annak a tartománynak felel  
meg, amelyben a nagy molekulású fehérjék és azok  
változatai eluálódnak.

#### 4. példa

##### CPC hatása az Xa faktor inhibitor tisztítására

10 A pióca faktor Xa inhibitor tisztítására használtuk a CPC-t. A  
pióca faktor Xa inhibitor (FXaI, pl: 8,4-9,1) a 6,211,341 sz.  
amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és a WO  
94/23735 sz. nemzetközi szabadalmi publikációban ismertetett  
módon állítható elő. Az FXaI-tartalmú zárványtestek elkülöníté-  
15 se után az FXaI tisztítását lényegében az 1. példában leírt  
módon végeztük. A zárványtestekből álló szemcse oldása után  
10 %-os CPC-oldattal végeztünk inkubálást. Az elegyet ezután  
15 percig centrifugáltuk 12 000 x g értéken. A szemcsét elvá-  
lasztottuk a felülúszó folyadéktól. A szemcsét az eredeti tér-  
20 fogatnak megfelelő mennyiségű 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pufferoldat-  
ban szuszpendáltuk. A szemcsét és a felülúszó folyadékot

külön-külön koncentráltuk és dializáltuk a visszamaradó CPC eltávolítására. A fehérjetartalmat és –aktivitást meghatároztuk. Azt tapasztaltuk, hogy FXaI van jelen fő alkotórészként a felülúszó folyadékban, és lényegében nincs jelen a szemcsében. Az eredmények azt mutatják, hogy a CPC-vel végzett kezelés növelte a kinyerés hatásfokát és a kinyert FXaI tisztaságát.

#### 5. példa

#### Karboxipeptidáz B (CPB) tisztítása CPC-vel

10 A CPB-t expresszázó klónnal nyert zárványtestek azonos mennyiségeit szolubilizáltuk 8 M karbamidot tartalmazó oldatban, pH=9,5 értéken (kontroll és teszt). A CPB előállítását a WO 96/23064 sz. nemzetközi szabadalmi publikáció és az 5,948,668 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás  
15 ismerteti. A teszt mintát 0,11 % CPC-vel kezeltük, majd szűréssel tisztítottuk az újragöngyölés előtt. A kontroll és teszt mintákban a fehérje újragöngyölését úgy végeztük el, hogy az oldatokat 1:8 arányban hígítottuk a begöngyöléshez használt pufferoldattal. Endoproteinázzal egy éjszakán át környezeti  
20 hőmérsékleten végzett kezelés után a kontroll és a teszt oldatokból azonos mennyiségeket vittünk fel DEAE Sepharose oszlopra. Az oszlopot mostuk, majd az aktív enzimet 60 mM nátrium-kloridot tartalmazó 20 mM trisz-pufferoldattal (pH=8) eluáltuk.

25

#### 4. táblázat

Eljárási lépés	Paraméter	Kezelés	
		Kontroll	0,11 % CPC

Oldás 8 M karbamid- oldatban szűrés után	Összes $A_{280}$	960	494
	Fehérjetarta- lom (mg) <sup>x</sup>	490	272
	pH	9,5	9,5
	Enzimaktivi- tás (U)	Inaktív ( <sup>xx</sup> )	Inaktív ( <sup>xx</sup> )
26,5 mg újra- göngyölt fe- hérje kromatográfiája (DEAE MP)	Fehérjetarta- lom (mg) <sup>x</sup>	5,67	8,41
	Enzimaktivi- tás (U)	258	4043
	Fajlagos aktivitás (U/mg)	98	481

(<sup>x</sup>) A fehérje meghatározását Bradford módszerével végeztük.

(<sup>xx</sup>) Az újragöngyölés előtt a fehérje inaktív volt.

5 Az 5. táblázatban feltüntetett eredmények azt mutatják, hogy az összes optikai sűrűség (OD) a CPC-vel kezelt anyagban 49,5 %-kal csökkent, a teljes fehérjetartalom pedig 44,5 %-kal csökkent. Érdekes módon a CPC-vel kezelt mintából kinyert teljes enzimaktivitás 79 %-kal növekedett, ami arra mutat, hogy a CPC eltávolított egy olyan alkotórészt, amely

10 részlegesen gátolta az aktiv enzim képződését.

A jelen találmány sokféleképpen módosítható és változtatható meg anélkül, hogy eltávolodnánk a találmány szellemétől és az igényelt oltalmi körtől, amint az az ezen a területen járatos szakember számára nyilvánvaló. A leírásban

ismertetett kiviteli alakok csak példák, amelyek nem korlátozzák az ottalmi kört.

## Szabadalmi igénypontok

- 5           1. Eljárás célfehérje tisztítására, azzal jellemezve, hogy  
(a) szolubilizált célfehérjét és egy vagy több szolubilizált  
szennyező fehérjét és lúgos puffert tartalmazó oldatból  
indulunk ki, ahol a célfehérje izoelektromos pontja nagyobb  
mint 7, a célfehérje lúgos pH-értéken pozitív töltésű és az egy  
10 vagy több szennyező fehérje polianion töltéssel rendelkezik;  
(b) az oldatot egy vagy több kationos felületaktív anyaggal  
érintkeztetve az egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét  
preferenciálisan kicsapjuk, ezzel megnövelve az oldatban  
maradó szolubilizált fehérjék között a szolubilizált célfehérje  
15 arányát, ahol az egy vagy több kationos felületaktív anyag  
amfipatikus ammóniumvegyület, amely a  $QN^+$  általános képletű  
kvaterner ammóniumvegyületekből, az  $RNH_3^+$  általános  
képletű, paraffinláncot tartalmazó primer ammónium-  
vegyületekből és a felsoroltak sóiból álló csoportból kerül  
20 kiválasztásra; és  
(c) a szolubilizált célfehérjét kinyerjük.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az  
amfipatikus ammóniumvegyület a cetil-piridinium-sókból,  
sztearamid-metil-piridinium-sókból, lauril-piridinium-sókból,  
25 cetil-kinolinium-sókból, lauril-amino-propionsav-metil-észter-  
sókból, lauril-amino-propionsav-fémsókból, lauril-dimetil-  
betainból, sztearil-dimetil-betainból, lauril-dihidroxi-etil-betain-

ból és benzetónium-sókból álló csoportból kerül kiválasztásra, továbbá, adott esetben

- 5 (i) az amfipatikus ammóniumvegyület vagy a hexadecil-piridinium-klorid, dekvalinium-acetát, hexadecil-piridinium-klorid, cetil-trimetil-ammónium-klorid, vegyes n-alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, cetil-piridinium-klorid, N,N-dimetil-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenoxi]-etoxi]-etil]-benzolmetán-ammónium-klorid, alkil-dimetil-benzil-ammónium-klorid, diklór-benzil-dimetil-alkil-ammónium-klorid, tetradecil-trimetil-ammónium-bromid, dodecil-trimetil-ammónium-bromid, cetil-trimetil-ammónium-bromid, lauril-dimetil-betain, sztearil-dimetil-betain vagy lauril-dihidroxi-etil-betain közül kerül kiválasztásra, vagy
- 10 (ii) az amfipatikus ammóniumvegyület cetil-piridiniumsó, előnyösen/adott esetben halogenid, előnyösen/adott esetben cetil-piridinium-klorid,
- 15 és az amfipatikus ammóniumvegyületnek adott esetben legalább egy 6-20 szénatomos, előnyösen/adott esetben 8-18 szénatomos alifás szénlánc van.

20 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat egy vagy több sejtalkotórészt is tartalmaz, előnyösen/adott esetben

- (i) az egy vagy több sejtalkotórész mikroorganizmustól, előnyösen/adott esetben baktériumtól, előnyösen/adott esetben E. coli baktériumtól származik, vagy
- 25 (ii) az egy vagy több sejtalkotórész egy vagy több fehérje.



4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a célfehérje
- (i) rekombináns fehérje, előnyösen/adott esetben enzim vagy
  - (ii) antitest, előnyösen/adott esetben egyláncú antitest vagy
  - 5 (iii) interferon, előnyösen/adott esetben beta-interferon vagy
  - (iv) az antitestből, urikázból, beta-interferonból, X faktor inhibitorból, savas dezoxi-ribonukleáz II-ből, elasztázból, liszozimból, papainból, peroxidázból, pankreatin ribonukleázból, tripszinogénből, tripszinből, citokróm c-ből,
  - 10 erabutoxinból, staphylococcus aureus enterotoxin CI-ből, interferonból és monoamin-oxidáz A-ból álló csoportból kerül kiválasztásra, ahol a célfehérje előnyösen urikáz, előnyösen/adott esetben emlős eredetű urikáz, előnyösen/adott esetben sertés urikáz.
- 15 5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az egy vagy több kationos felületaktív anyagot 0,001-5,0 % közötti, előnyösen/adott esetben 0,01-0,5 % közötti, még előnyösebben/adott esetben 0,03-0,2 % közötti koncentráció eléréséig adagoljuk.
- 20 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az érintkeztetést 5 perc és 48 óra közötti ideig, előnyösen/adott esetben 10 perc és 24 óra közötti ideig és 4 °C és 36 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen/adott esetben 4 °C és 26 °C közötti hőmérsékleten végezzük.
- 25 7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat lényegében mentes
- (i) polianionoktól vagy

(ii) szilárd hordozóktól vagy

(iii) a szennyező fehérjéknek más molekulákkal alkotott aggregátumaitól vagy

5 (iv) polianionoktól, szilárd hordozóktól és a szennyező fehérjéknek más molekulákkal alkotott aggregátumaitól.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kationos felületaktív anyag egy cetil-piridiniumsó, előnyösen/adott esetben cetil-piridinium-klorid.

10 9. Eljárás valamely célfehérje százalékos mennyiségének növelésére fehérjéket tartalmazó oldatban, azzal jellemezve, hogy

15 (a) több fehérjét tartalmazó oldatból indulunk ki, ahol az oldatban a célfehérje, egy vagy több szennyező fehérje és lúgos puffer van jelen, a célfehérje az oldatban lévő összes fehérjének egy első tömegszázalékos hányadát képezi, a célfehérje izoelektromos pontja nagyobb mint 7, a célfehérje lúgos pH-értéken pozitív töltésű és az egy vagy több szennyező fehérje polianion töltéssel rendelkezik; és

20 (b) az oldatot egy vagy több kationos felületaktív anyaggal érintkeztetve az egy vagy több szolubilizált szennyező fehérjét preferenciálisan kicsapjuk, ahol az egy vagy több kationos felületaktív anyag amfipatikus ammóniumvegyület, amely a  $QN^+$  általános képletű kvaterner ammóniumvegyületekből, az  $RNH_3^+$  általános képletű, paraffinláncot tartalmazó primer ammónium-vegyületekből és a felsoroltak sóiból álló csoportból  
25 kerül kiválasztásra;

ahol a (b) lépésben kapott oldatban lévő célfehérje az oldatban lévő összes fehérjének egy második tömegszázalékos hányadát képezi, amely nagyobb az első tömegszázalékos hányadnál.

5

A meghatalmazott:

ADVOPATENT  
SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA  
1255 Budapest, Pf.: 80.

I.



Figure 1

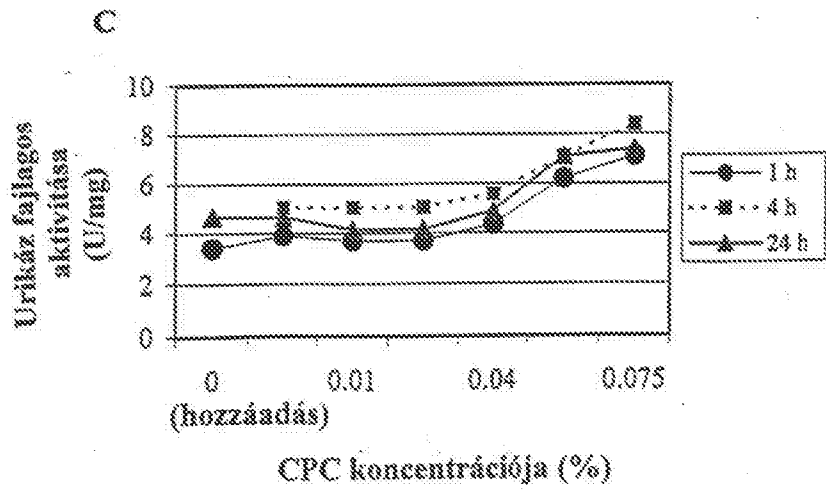
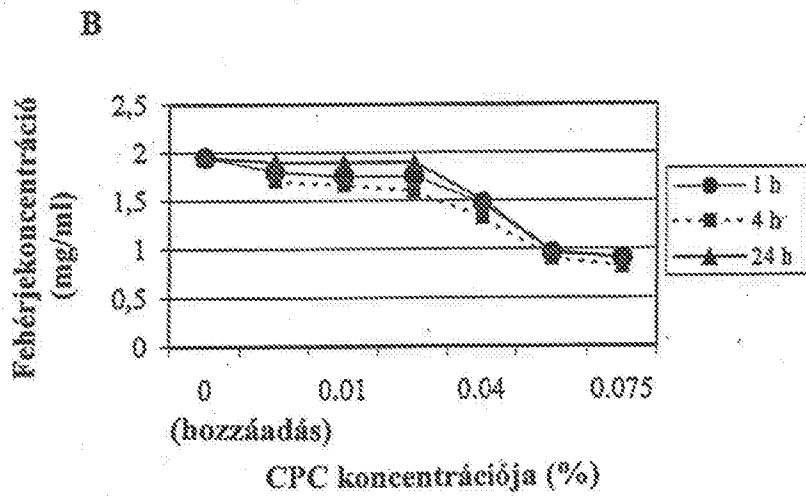
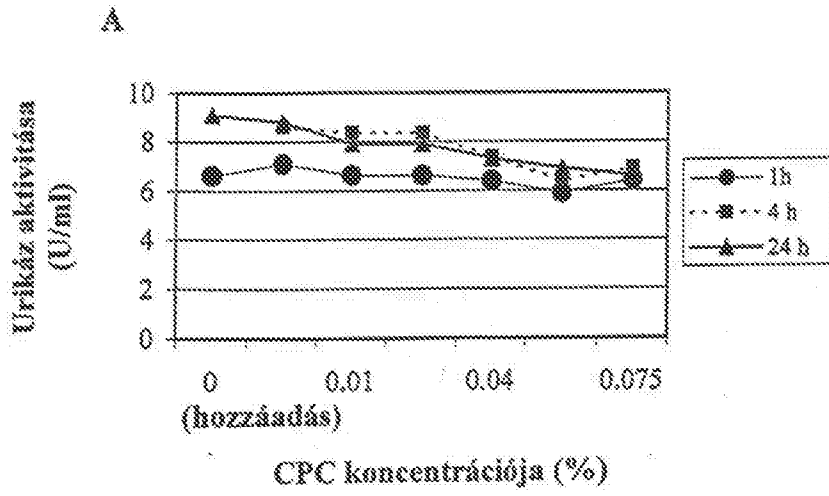




Figure 2.

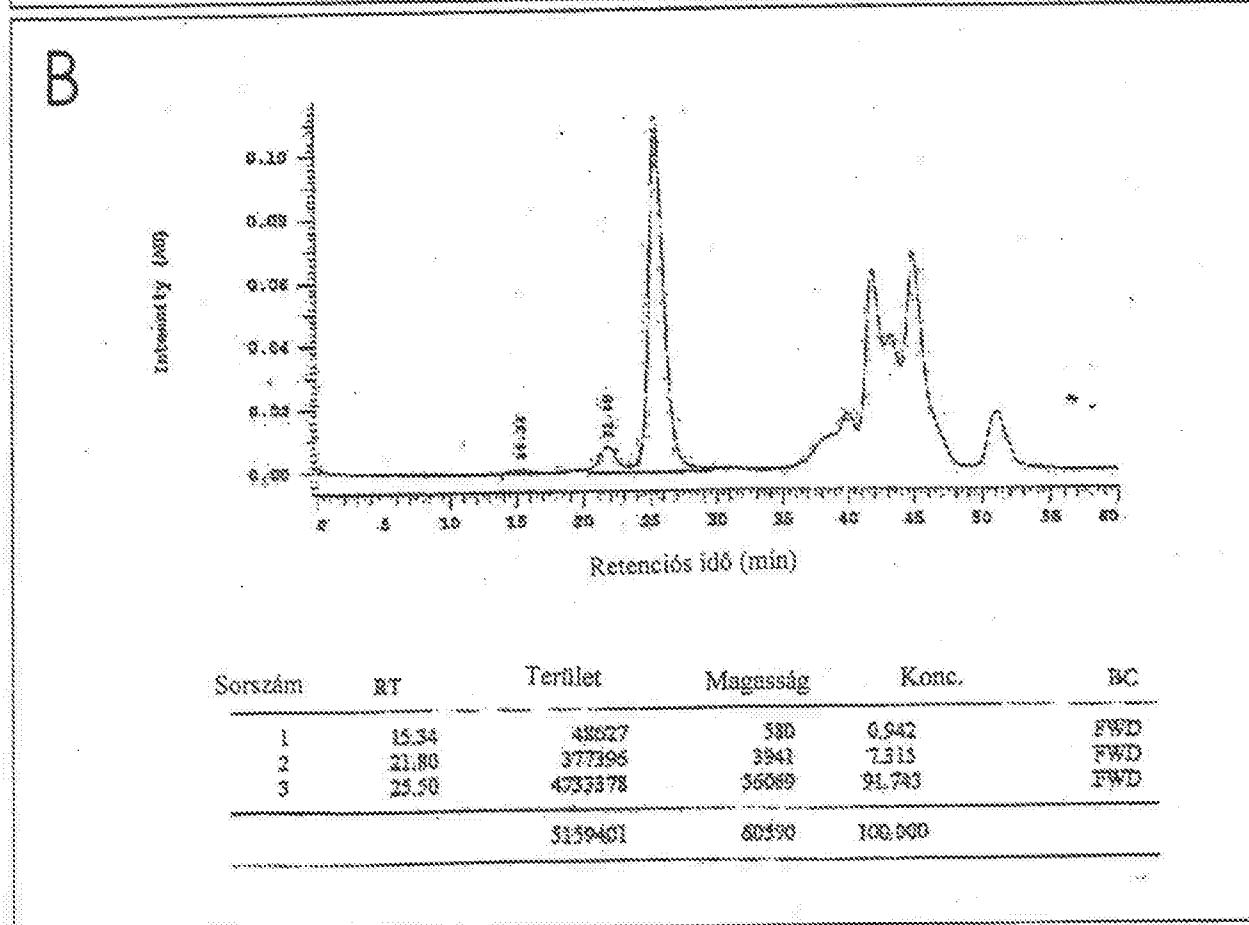
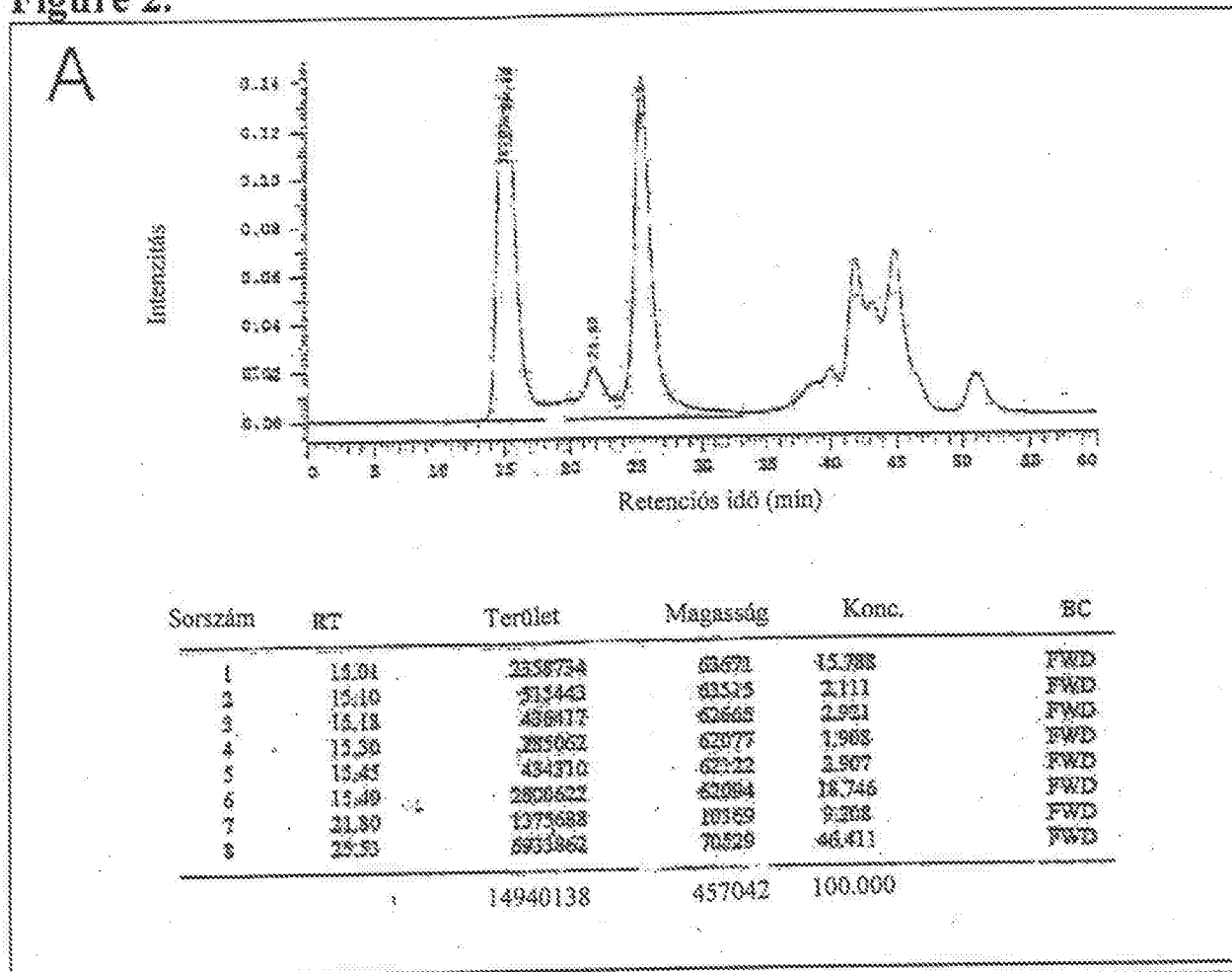


Figure 3.

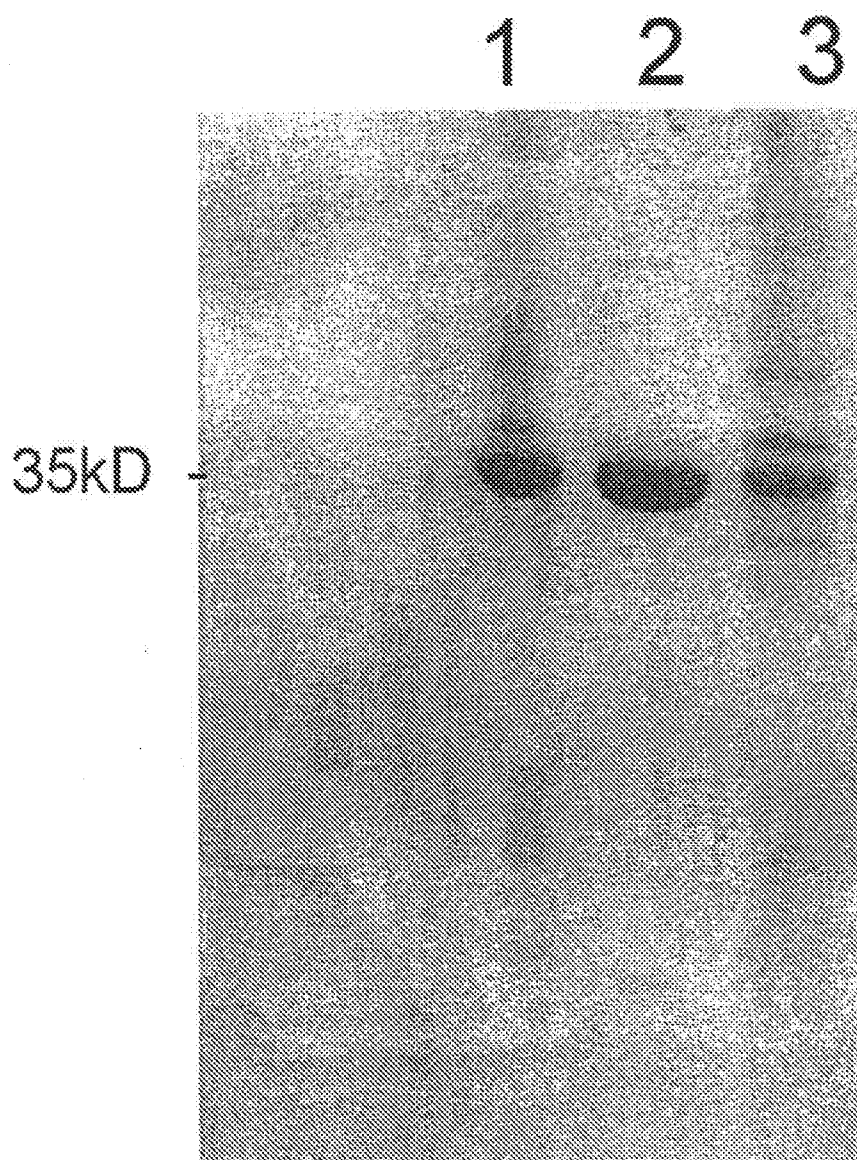


Figure 4.

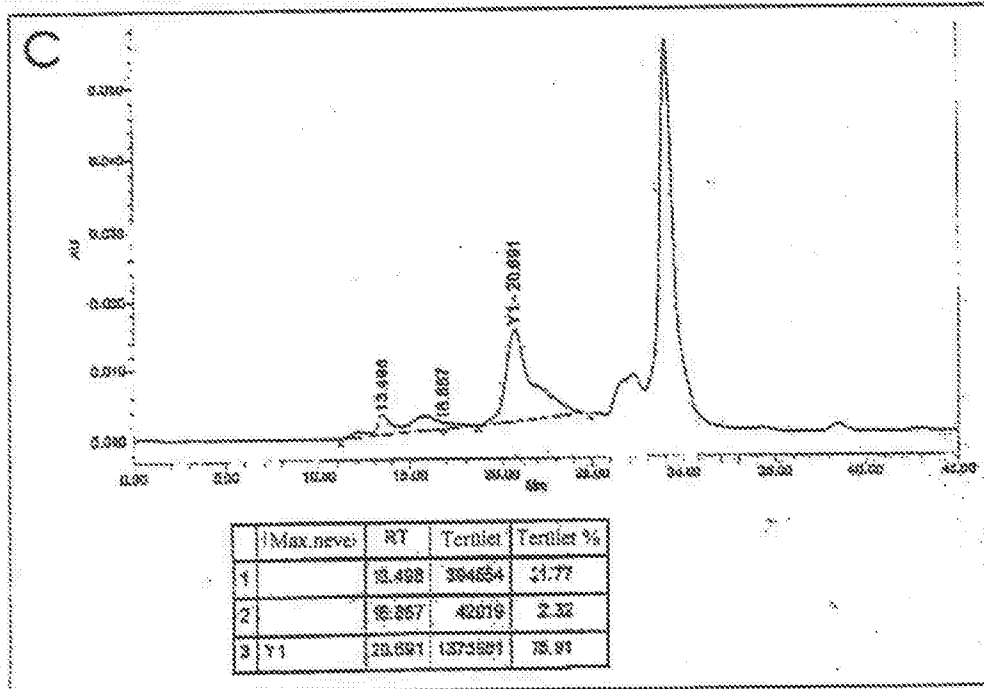
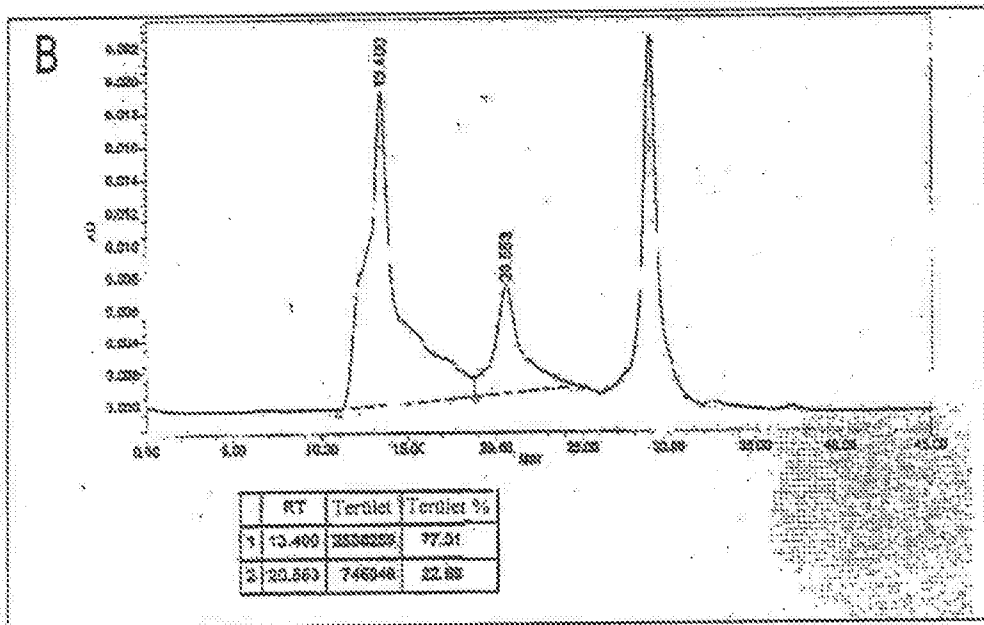
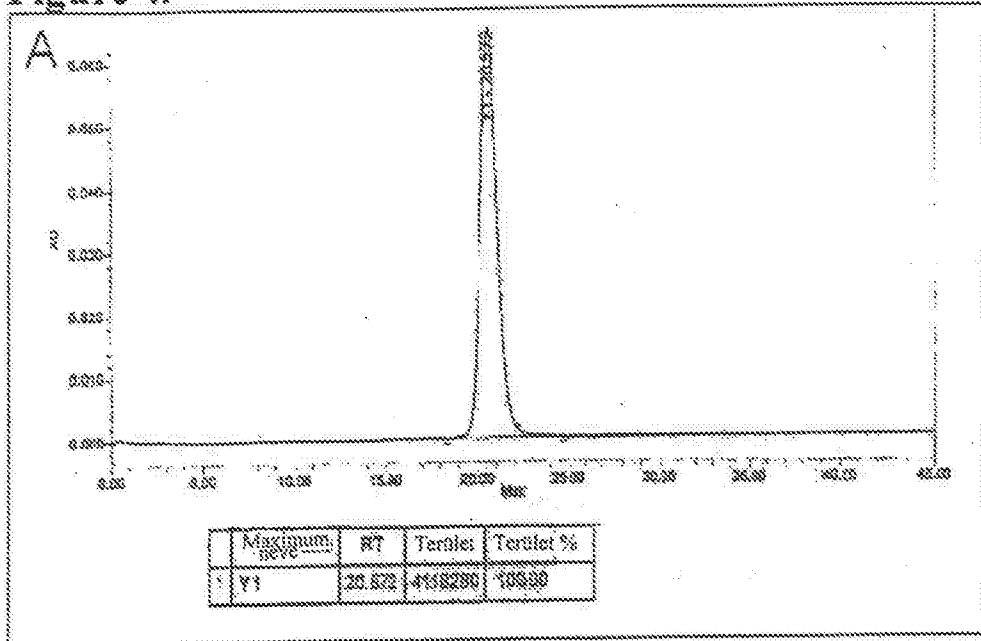


Figure 5.

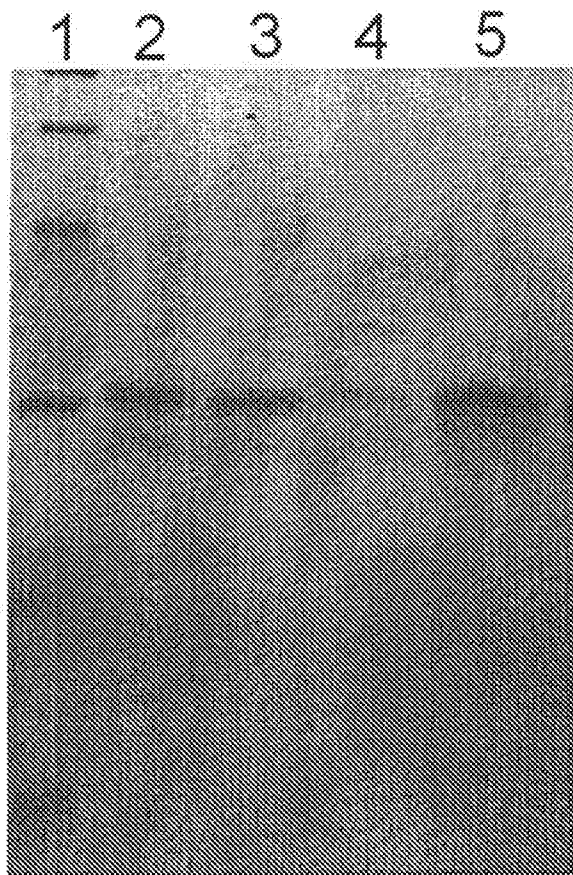




Figure 6

