

2233/95

5472

A

75678

61.070/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

K I V O N A T

Eljárás a szarvasmarha-szomatotropin hatékonyságának meghatározására nem-denaturáló eljárással

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1994. 01. 24.

Elsőbbsége: 1993. 01. 26. (08/009,034),

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/00850

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/17403

A találmány tárgya eljárás a szarvasmarha-szomatotropin minták hatékonyságának meghatározására, valamint a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin biológiailag inaktív szarvasmarha-szomatotropintól történő elválasztására méretkizárásos HPLC-vel, ahol az állófázis 5-15 μm átlagos szemcseméretű, hidrofil, porózus polimergél; a mozgófázis pH = 8-12 kémhatású, a szarvasmarha-szomatotropint nem denaturáló, pufferolt vizes oldat.

2233/95

75678

2233/95

61.70

A

61.070/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás a szarvasmarha-szomatotropin hatékonyságának meghatározására nem-denaturáló eljárással

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS, Indiana,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló:

CHANG Jen, P. INDIANAPOLIS, Indiana,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1994. 01. 24.

Elsőbbsége: 1993. 01. 26. (08/009,034),
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/00850

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/17403

A találmány a szarvasmarha-szomatotropinnal (bST) foglalkozik, közelebbről a jelen találmány egy nem-denaturáló eljárást nyújt a biológiailag aktív bST proteinfrakció bST-ből való elkülönítésére, ami alkalmas a bST hatékonyság vizsgálatára.

A rekombináns DNS technológia mára lehetővé tette a bST nagyléptékű előállítását. A rekombináns mikroorganizmusok, például a rekombináns *Escherichia coli* a plazmájukban lévő oldhatatlan szemcsék alakjában termelik a bST-t. A fénytörő vagy zárványtesteknek nevezett szemcsék aggregálódtak, denaturált bST-t tartalmaznak.

A fénytörő testeket kinyerik, és rendszerint egy denaturálással, például guanidin-hidrokloriddal, nátrium-dodecil-szulfáttal vagy karbamiddal kezelik. A denaturálás kitekeri és oldatba viszi a szabálytalanul feltekeredett bST molekulákat. Később a bST molekulák renaturálódnak, kialakítva a helyesen tekeredett, biológiailag aktív bST monomer fehérjét.

Az említett denaturációs és renaturációs lépések tökéletlensége miatt azonban valamennyi szabálytalanul feltekeredett, biológiailag inaktív aggregátum is keletkezik.

Így a nagy tömegben kapott bST biológiailag aktív monomert és biológiailag inaktív bST aggregátumot egyaránt tartalmaz. Ezért fontos volt egy módszert kidolgozni, mellyel a minőségi ellenőrzésnél meg tudjuk határozni a bST hatásosságát.

A bST hatásosságának megállapítására ezt megelőzően a patkány súlygyarapodását használták. A módszer lényege: bST-t adunk be a patkánynak, és nyomon követjük a súlygyarapodását,

ebből egy olyan adathoz jutunk, ami a bST hatásosságát jellemzi. Rutin vizsgálatoknál azonban ez a vizsgálati eljárás nem alkalmazható a bST pontos minősítésére. A bST hatásosság meghatározására a radioreceptor assay-t (RRA) is használhatjuk, ez azonban időigényes. Az RRA ugyancsak pontatlan, ezért rendszerint több vizsgálatot végeznek, és az eredmények átlaga adja a bST hatásossági értékét.

A proteinek meghatározására fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (RPHPLC) alkalmaznak, azonban a használt legtöbb RPHPLC módszer alkalmazhatatlannak látszott a bST hatásosság mérésére, mert a mozgófázisukban savas közeget és szerves oldószereket alkalmaznak, ami denaturálja a bST-t.

Korábban méretkizárásos HPLC-t használtak a bST meghatározáshoz, melynek mozgófázisa nátrium-dodecil-szulfátot vagy guanidin-hidrokloridot tartalmazott. Ezzel a módszerrel azonban a biológiai hatékonyság nem határozható meg, minthogy a mozgófázis denaturálja a bST-t.

Szükség volt tehát egy alkalmas, pontos és megbízható nem-denaturáló eljárásra a bST biológiai hatékonyságának meghatározásához. A jelen találmány ezt az igényt kívánja kielégíteni.

A jelen találmány egyik előnyös kivitelezési módja eljárást nyújt a szarvasmarha-szomatotropin-minta hatékonyságának meghatározására. A módszer abból áll, hogy a szarvasmarha-szomatotropin-mintában méretkizárásos HPLC-vel mérjük a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin fehérje szintjét. A méretkizárásos HPLC-hez 5-15 μm átlagos szemcseméretű, hidrofil, porózus polimer gélt

használunk állófázisként; a mozgófázis pH = 8-12 kémhatású, pufferolt vizes oldat, mely nem denaturálja a szarvasmarha-szomatotropin-mintát. A szarvasmarha-szomatotropin-minta hatékonyságának meghatározása a mintában mért biológiailag aktív szomatotropin fehérje szintjének mérésén alapszik.

A jelen találmány egy másik előnyös kivitelezési módja eljárást nyújt a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin frakció kinyerésére a szarvasmarha-szomatotropinból. A módszer méretkizárásos HPLC-t alkalmaz, ahol az állófázis egy 5-15 μm átlagos szemcseméretű, porózus polimergél; a mozgófázis pH = 8-12 kémhatású, pufferolt vizes oldat, ami nem denaturálja a szarvasmarha szomatotropint.

A jelen találmány egy további előnyös kivitelezési módja eljárást nyújt a tömegben készült rekombináns szarvasmarha-szomatotropin feldolgozására azzal a céllal, hogy a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropint elválasszuk a biológiailag inaktív szarvasmarha-szomatotropin nem-kovalens, oldható aggregátumából. A módszer abból áll, hogy a nagy tömegben készült rekombináns szarvasmarha-szomatotropint méretkizárásos HPLC-nek vetjük alá, szilárd fázisként 5-15 μm átlagos szemcseméretű hidrofí, porózus polimergélt; mozgó fázisként pH = 8-12 kémhatású, pufferolt vizes oldatot használva, ami nem denaturálja a szarvasmarha-szomatotropint. A kromatografálást úgy végezzük, hogy a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin elváljon a biológiailag inaktív szarvasmarha-szomatotropin nem-kovalens, oldódó aggregátumaitól.

A találmány olyan módszereket nyújt, melyekkel a biológiai-

lag aktív bST fehérje kedvezően elválasztható a biológiailag inaktív bST alaktól. A módszerek jól alkalmazhatók a bST hatásosságának előnyös, pontos és megbízható meghatározására. Továbbá az ötletes eljárások alkalmazásával először lehetett a bST nem-kovalens, oldódó aggregátumát elválasztani és alaposan jellemezni.

A találmány további tárgya, sajátosságai és előnyei a leírásból kitűnnek.

Az ábrák leírása:

1A ábra - a biológiailag aktív bST referencia standard méretkizárásos HPLC kromatogramja az alábbiakban tárgyalt példákban leírt módszert alkalmazva.

1B - 1E ábra - a nagy tömegben készült rekombináns bST anyagok méretkizárásos HPLC kromatogramjai a példákban leírt módszereket alkalmazva. A kromatogramok demonstrálják a bST oldható aggregátumok jelenlétét a nagy tömegben nyert anyagokban.

2A ábra - a hidrogén-karbonát puffer koncentrációjának hatása a biológiailag aktív bST fehérjefrakció méretkizárásos HPLC retenciós idejére, a példákban leírt eljárást alkalmazva.

2B ábra - a hidrogén-karbonát puffer koncentrációjának hatása a biológiailag aktív bST fehérjefrakció méretkizárásos HPLC csúcsának területére, a példákban leírt eljárást alkalmazva.

3A ábra - a mozgófázis kémhatásának hatása a biológiailag aktív bST fehérjefrakció méretkizárásos HPLC retenciós idejére, a példákban leírt eljárást alkalmazva.

3B ábra - a mozgófázis kémhatásának hatása a biológiailag aktív bST fehérjefrakció méretkizárásos HPLC csúcsának

területére, a példákban leírt eljárást alkalmazva.

4. ábra - a biológiailag aktív bST fehérje radioreceptor assay-jel mért potencia adatai (JU/mg) és a méretkizárásos HPLC-vel mért koncentráció adatok közötti korreláció néhány különböző rekombináns bST-nél, a példákban leírt eljárásokat alkalmazva.

5. ábra - a log móltömeg és a méretkizárásos HPLC elúciós idő közötti összefüggés, standard fehérjékkal felvett kalibrációs görbe és a biológiailag aktív bST fehérje ("B/A bST"), illetve a bST oldható aggregátum ("Agg") adatai. A mérési körülmények az alábbi példákban találhatók.

6. ábra - az ammónium-hidrogén-karbonát koncentrációjának hatása a méretkizárásos HPLC-vel kapott csúcs területére biológiailag aktív bST fehérjefrakció ("B/A bST") és a bST oldható aggregátum ("Agg") frakciója esetében; a meghatározási körülmények az alábbi példákban vannak leírva.

7. ábra - a mozgófázis kémhatásának hatása a méretkizárásos HPLC-vel kapott csúcs területére biológiailag aktív bST fehérjefrakció és a bST oldható aggregátumát tartalmazó frakció ("Agg") esetében; a meghatározási körülmények az alábbi példákban találhatók.

8. ábra - a centrifugálás hatása a méretkizárásos HPLC-vel kapott csúcs területére a biológiailag aktív bST fehérjefrakció ("B/A bST") és a bST oldható aggregátumot tartalmazó frakció esetében ("Agg"); a meghatározási körülmények az alábbi példákban találhatók.

A találmány alapelveinek jobb megértése érdekében referen-

ciát adunk a találmány előnyös kivitelezési módjára, és speciális kifejezőmódot használunk a leírására.

Világos azonban, hogy ezáltal nem korlátozzuk a találmány oltalmi körét, a találmány itt szemléltetett alapelveinek változásai, további módosításai és alkalmazása a szakemberek számára magától értetődik.

Mint már fentebb említettük, a jelen találmány egyik előnyös kivitelezési módja a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin frakciónak a szarvasmarha-szomatotropinból való elválsztására irányul. A "szarvasmarha-szomatotropin" kifejezés olyan - természetes vagy szintetikus eredetű - anyagot jelent, ami a természetes szarvasmarha-szomatotropin tulajdonságait mutatja. A szarvasmarha-szomatotropin a szarvasmarha megfelelő mirigyszöveteiből, például az agyalapi mirigyből vonható ki; vagy ma már egy jól kidolgozott technikával a szarvasmarha-szomatotropin és más ilyen anyag genetikailag módosított mikroorganizmusokkal, például baktériumokkal előállítható. Gyakran megfelelnek vagy még előnyösebbek is a módosított szarvasmarha-szomatotropint eredményező eljárások, vagyis az olyan szomatotropinoké, melyeknek szerkezete eltér a természetben előforduló növekedési hormonétól, de megőrzi a természetes hormon biológiai aktivitását. Így például a módosított szarvasmarha-szomatotropin egy vagy több aminosavval többel rendelkezhet a polipeptidlánc egyik vagy mindkét végén. A szakemberek előtt további módosítások is ismertek. A jelen találmányban tehát a szarvasmarha-szomatotropin kifejezést úgy a természetben előforduló szarvasmarha-szomatotropinra, mint az olyan szinte-

tikusan előállított szarvasmarha-szomatotropinra alkalmazzuk, mely rendelkezik a természetben előforduló szarvasmarha-szomatotropin biológiai tulajdonságaival és amelyiknek szerkezete azonos vagy eltérő lehet.

A jelen találmány előnyösen használható a rekombináns DNS technológiával előállított bST-hez ("rekombináns bST"). A rekombináns bST-t tipikusan a rekombináns bST-t tartalmazó zárványok elkülönítésével, denaturálásával és oldatba vívésével nyerjük. A bST-t azután biológiailag aktív bST fehérjévé renaturáljuk. A denaturáló/renaturáló lépéseknél biológiailag inaktív bST nem-kovalens aggregátumok keletkeznek a kívánt biológiailag aktív bST fehérje mellett. A kolloidok és bizonyos nagyon nagy molekulatömegű szennyezések ultraszűréssel eltávolíthatók. A biológiailag inaktív bST nem-kovalens aggregátumok lényeges mennyisége, azonban a biológiailag aktív bST fehérjével együtt átmegy az ultraszűrőn. Ennek eredményeként a rekombináns bST végtermék biológiailag aktív bST fehérjét és biológiailag inaktív bST oldható aggregátumot egyaránt tartalmaz.

A jelen találmány módszere felhasználható ennek a nagy tömegben készült rekombináns bST-nek a feldolgozására azzal a céllal, hogy a biológiailag aktív bST fehérjét elválasszuk a biológiailag inaktív bST nem-kovalens aggregátumoktól. Ez az eljárás továbbá módszert nyújt a nagy tömegben nyert bST hatékonyságának előnyös, megbízható és pontos megállapítására.

A rekombináns bST-k két példája somidobore és sometribove vegyületként ismert. A jelen találmány különösen előnyösen al-

kalmazható ehhez a két rekombináns bST-hez.

A találmány szerinti módszer méretkizárásos HPLC-t alkalmaz, amihez szilárd fázisként hidrofil, porózus polimergélt használunk. A találmányhoz alkalmazható porózus gélnek átlagos részecskeátmérője előnyösen 5-15, még előnyösebben 10-15 μm . A gél átlagos pórusmérete 100-200 Å, a jelen találmány szempontjából a 150 Å pórusátmérő az előnyös. Más szempontból, a találmányban alkalmazott porózus gél kizárási határa átlagosan nagyobb, mint a bST nem-kovalens, oldható aggregátum molekulatömege, például 10^6 vagy ennél nagyobb, még előnyösebben 10^7 vagy még nagyobb.

A jelen találmányhoz használt mozgófázis vizes pufferoldat, melynek kémhatása $\text{pH} = 8-12$, és amelyik nem denaturálja a bST mintát. A mozgófázisban általában bármilyen koncentráció alkalmazható egészen addig az ionerősségig, amelyik a bST mintából még nem sóz ki fehérjét. Előnyös mozgófázis például a vizes hidrogén-karbonát (HCO_3^-) puffer, például az ammónium-hidrogén-karbonát vizes oldata. A hidrogén-karbonát puffer koncentrációjának 0,7M alatt kívánatos lennie, előnyösen 0,1-0,4M. Előnyösebb, ha a mozgófázis kémhatása $\text{pH} = 9-11$, legelőnyösebb, ha $\text{pH} = 9-10$ érték között van.

A szilárd fázist egy szokásos HPLC oszlopba töltjük, mely a szokásosan használt méretkizárásos HPLC készüléknek része. Így például a méretkizárásos HPLC készülék tipikusan a pumpákból, a vizes puffer tartályaiból, egy ultraibolya (UV) abszorpciós detektorból és a frakciószedőből áll:

A jelen találmány módszerével feldolgozott bST minta

előnyösen elkészíthető ugyanabban a vizes pufferoldatban, amit mozgófázisként használunk. A mintában a bST kívánatos koncentrációja milliliterenként 0,05-2 milligramm. Még előnyösebb, ha a minta bST koncentrációja 0,1-1 mg/ml.

A méretkizárásos HPLC oszlophoz alkalmazott nyomás biztosítja a találmány szerinti elválasztáshoz a megfelelő áramlási sebességet. A kellő áramlási sebességhez szükséges nyomást természetesen az állófázis szemcsemérete határozza meg. A találmány előnyös módszerénél a méretkizárásos HPLC-hez alkalmazott nyomás és áramlási sebesség 30 perc alatt teljesen eluálja a biológiailag aktív bST fehérjefrakciót úgy, hogy egy alkalmas vizsgálati lehetőséget szolgáltat. Ilyen vonatkozásban a tipikus oszlopnymomás 500-1500 psi, méginkább 800-1000 psi.

Az alkalmazási módnak egy másik lehetősége, hogy a fent leírt nem-denaturáló méretkizárásos HPLC eljárást a bST nagy molekulatömegű, oldható aggregátumának izolálására és jellemzésére használjuk. Az 1B és 1C ábrákon kb. 9 percnél kezdődnek a csúcsok, melyek ezeket a nagy molekulatömegű oldható bST aggregátumokat tartalmazzák. Ezeknek az oldható bST aggregátumoknak a molekulatömege nagyobb, mint 660.000, amint az a méretkizárásos HPLC-vel megállapítható (5. ábra). Amint azt a radio receptor assay bizonyítja, a bST oldható aggregátumok biológiailag inaktívak.

A bST oldható aggregátum oldatban való viselkedését szintén megállapítottuk. A bST oldható aggregátum jelentősen oldódik a nem-denaturáló vizes pufferoldatban, melynek kémhatása pH = 8,5

értéknél magasabb és pH = 12 értéknél alacsonyabb (1D., 1E és 7. ábra). Ezen a tartományon kívüli kémhatásnál az oldható aggregátum kicsapódik a nem-denaturáló vizes pufferoldatból. A sókoncentráció ugyancsak a bST oldható aggregátum kicsapódását eredményezheti (6. ábra). Így például 0,7M feletti hidrogén-karbonát koncentrációnál a bST oldható aggregátum kisózása figyelhető meg. Ezenkívül a bST oldható aggregátum oldatban marad a 0,2M hidrogén-karbonát pufferben (pH = 9), ha 30 percen át vagy ennél hosszabb ideig is 16000 g értéken centrifugáljuk az oldatot (8. ábra). A denaturálószeres, például a nátrium-dodecil-szulfát vagy a karbamid, monomer bST-vé denaturálják a bST oldható aggregátumot. A bST oldható aggregátumnak ezen és más tulajdonságait az alábbi példákban tovább tárgyaljuk.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célzatúak és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák. A találmány alapelvét nem érintő változatok és módosítások ugyancsak beletartoznak az oltalmi körbe.

Példák

Vegyületek és reagensek: valamennyi analitikai tisztaságú és valamennyit további tisztítás nélkül használtuk. A vizet a Millipore Milli-Q víztisztító berendezésből kaptuk. A bST referencia anyagot és a nagy tömegben készült rekombináns bST-t (somidobove) az Eli Lilly and Company cégtől kaptuk.

A méretkizárásos HPLC kromatográfiás körülményei: A példákhoz használt rideg, porózus polimergél számos hidrofíli csoportot tartalmaz (a gél hidroxilált poliéterrel keresztkötött), átlagos szemcsemérete $10\ \mu\text{m}$ (Beckman Sepharogel TSK 3000 PW oszlop, $600 \times 7,5\ \text{mm}$ átmérő). Az itt leírt elválasztásokhoz, hacsak másként nem jelöljük, mozgófázisként $0,2\text{M}$ ammónium-hidrogén-karbonát-oldatot használunk, melynek kémhatását nátrium-hidroxiddal $\text{pH} = 9$ értékre állítjuk be. Valamennyi elválasztást szobahőmérsékleten végezzük, $0,5\ \text{ml/perc}$ áramlási sebesség mellett, hacsak másként nem jelezzük (az elért nyomás $800\text{--}1000\ \text{psi}$). A beinjektált minta térfogata $20\ \mu\text{l}$. A legtöbb elválasztást Waters 625 LC berendezéssel végezzük, amit 911 photodiode array detektorral és WISP 721 automata mintaadagolóval látunk el. A pontos és linearitási vizsgálatokat azonban Beckman System-Gold HPLC készüléken végezzük, ami egy Model 126 oldószerellátó rendszerből, egy Model 116 változtatható hullámhosszú detektorból és egy Model 507 automata mintaadagolóból áll.

Minta elkészítése: a mintákat és a standard anyagok oldatát a mozgófázisban készítjük el. Hacsak másként nem jelezzük, valamennyi bST minta koncentrációja $1\ \text{mg/ml}$. Hogy csökkentjük a nem teljes oldódás lehetőségét, a mozgófázis egy kivétjét hozzáadjuk a bST-hez, és a minta oldatát szobahőmérsékleten hagyjuk állni 30 percen át, ezután a minta oldatát gyengén kevertetjük 5-10 percen keresztül. A mintát injektálás előtt egy Acrodisc $0,45\ \mu\text{m}$ szűrőn szűrjük át.

A bST minták méretkizárásos HPLC kromatografálásának

eredményei:

Az 1A ábrán egy biológiailag aktív rekombináns bST fehérje referencia standardjának méretkizárásos HPLC kromatogramját látjuk, ahol csak egy főcsúcs található, amiben a biológiailag aktív bST fehérje található.

Az 1A ábrán látható kromatogramot a fentiekben leírt eljárással kaptuk azzal a különbséggel, hogy az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Az 1B és 1C ábrák nagy tömegben kapott, különböző bST anyagok méretkizárásos HPLC kromatogramjait mutatják. Két erős csúcs figyelhető meg közöttük kiváló alapvonaltartással. Az elsőként eluálódó csúcs (~ 9 perc) tartalmazza a nagy molekulású bST oldható aggregátumot, a második csúcs (~ 13 perc) a biológiailag aktív bST fehérjét.

Az 1D és 1E ábrák ugyanabból a rekombináns bST anyagból származó minták méretkizárásos kromatogramjait mutatják, mint amit az 1C ábra kromatogramjának felvételéhez használtunk. Az 1D ábra egyedülálló kromatogramját pH = 11,3 kémhatású mozgófázissal kaptuk. Az 1E ábra egymásra halmozott kromatogramjait pH = 7,9-12,2 kémhatás tartomány közötti mozgófázisokkal vettük fel. Csökken a csúcs alatti terület a vizsgált alacsonyabb és a magasabb pH értékeknél, ami bizonyítja a bST oldható aggregátum csökkenő oldhatóságát. Előnyös a találmány szerinti eljárásoknál olyan pH értékű mozgófázist használni, melyben magasabb a bST oldható aggregátum oldhatósága, például pH = 9 és 12 közötti tartományban.

További méretkizárásos kromatogramokat vettünk fel az 1B és

1C ábrához használt anyaggal ugyanolyan körülmények között azzal az eltéréssel, hogy más, nem-denaturáló mozgófázist (0,05M borát puffert) használtunk. A kromatogramok hasonlóak voltak az 1B és 1C ábrán láttal, ahol két csúcs figyelhető meg köztük jó alapon tartással. Tehát más, nem-denaturáló vizes puffer is könnyen alkalmazható a méretkizárásos HPLC elválasztáshoz.

A méretkizárásos HPLC kromatográfiás körülményeinek változásai:

Vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a különböző ammónium-hidrogén-karbonát koncentráció a biológiailag aktív bST fehérjefrakció elúciós idejére. A kísérletsorozat bizonyítja, hogy a biológiailag aktív bST fehérje az ammónium-hidrogén-karbonát-oldat változtatásával egy tipikus méretkizárásos HPLC-re jellemző görbét ad (2A ábra). Az elúciós idő gyenge változása figyelhető meg 0,1M és 0,4M ammónium-hidrogén-karbonát-koncentráció között. Az elúciós idő gyorsabban nő, ha az ammónium-hidrogén-karbonát koncentrációja 0,4M fölé emelkedik. A bST csúcs területe lényegesen csökken, ha a sókoncentráció (ammónium-hidrogén-karbonát) magasabb, mint 0,7M (2B ábra). A találmányhoz alkalmazott előnyös méretkizárásos HPLC-hez tehát a mozgófázisban 0,7M-nál alacsonyabb hidrogén-karbonát sókoncentrációt alkalmazunk.

Ugyancsak tanulmányoztuk, hogy milyen hatással van a biológiailag aktív bST fehérjefrakció elúciós idejére és a csúcs alatti területre a mozgófázis kémhatása. A 0,2M ammónium-hidrogén-karbonátos mozgófázis kémhatását pH = 7,5 és pH = 10,5

tartományban emelve, az nincs hatással a bST elúciós idejére; a csúcs alatti terület nagysága azonban gyengén emelkedik ugyan-ezen pH tartományban (3A, 3B ábra).

A méretkizárásos HPLC legelőnyösebb áramlási sebessége vizsgáltainkban 0,5 ml/perc értéknek adódott. A 0,3 ml/perc áramlási sebesség alkalmazható, és azonos hatékonyságú, de a futtatási idő közel megkétszereződik. A biológiailag aktív bST fehérje csúcs és az "üres" csúcs 1 ml/perc áramlási sebességnél átfedik egymást.

Annak bizonyítására, hogy a találmány szerinti módszer nem denaturálja a bST-t, a referencia standard biológiailag aktív bST fehérje frakcióját összegyűjtöttük, és a biológiai aktivitását (1A ábra) RRA módszerrel mértük. Az eredmények azt mutatják, hogy a mozgó fázisban összegyűjtött biológiailag aktív bST fehérje komponens változatlanul megtartotta a méretkizárásos HPLC eljárás előtti kiindulási oldat biológiai aktivitását.

Több különböző rekombináns bST minta vizsgálata azt mutatja, hogy szoros korreláció van a találmány szerinti méretkizárásos HPLC-vel mért biológiailag aktív bST fehérje aktivitási szintje és az RRA módszerrel mért hatékonysági adatok (IU/mg) között. A méretkizárásos HPLC-vel és az RRA módszerrel nyert adatok lineáris regressziós grafikonját mutatjuk be a 4. ábrán. Az adatok korrelációs együtthatója: 0,845. Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a találmány szerinti méretkizárásos HPLC használható módszer a bST minták hatékonyságának a meghatározására. Azaz a találmány szerinti méretkizárásos HPLC módszer fel-

használható az ismeretlen hatékonyságú bST minta biológiailag aktív bST fehérjeszintjének a meghatározására (például a csúcs alatti területet százalékában kifejezve). A biológiailag aktív bST fehérje mintában mért szintjét azután rávihetjük a 4. ábrához hasonló kalibrációs grafikonra, mely bST kontrollok RRA és méretkizárásos HPLC módszerekkel nyert adataiból áll. Az RRA adatok jó összhangban vannak más módszerekkel - például a jól ismert patkány testsúlygyarapodás módszerével - nyert bioaktivitási adatokkal is. Hasonló korreláció állapítható meg tehát a méretkizárásos HPLC-vel és más ismert bST biokativitási meghatározási módszerekkel kapott adatok között is.

A módszer linearitása és pontossága: A találmány szerinti méretkizárásos HPLC módszer linearitásának meghatározásához egy biológiailag aktív bST referencia standarddal koncentrációsorozatot készítünk a mobil fázisban oldva. A 0,1-1 mg/ml koncentrációjú standard bST oldatokat három párhuzamosban vizsgáljuk a méretkizárásos HPLC-vel, és elvégezzük az adatok lineáris regressziós analízisét. Három különböző oszlopon és különböző napon meghatározott linearitás reprodukálhatóságát az I. táblázatban mutatjuk be. A korrelációs koeficiens a 0,9998-1,000 tartományba esik, és az átlagos relatív standard deviáció (R.S.D.): 1,36 %.

I. T Á B L Á Z A T

meredekség	306600	301200	311400
R.S.D. %	0,60	1,51	0,77
y ordináta tengelymetszete	-3940	-2050	-3270
korrelációs koeficiens	1,0000	0,9998	0,9999

A találmány szerinti méretkizárásos HPLC pontosságát három napon át, két különböző HPLC rendszerrel, három különböző sorozatszámú oszloppal és három különböző bST mintával határoztuk meg. A II. táblázatban bemutatott eredmények szemléltetik, hogy a biológiailag aktív bST fehérje megállapított R.S.D értéke kevesebb, mint 2,8 % és a retenciós idő reprodukálhatósága kevesebb, mint 0,18 % R.S.D. értékkel jellemezhető.

II. T Á B L Á Z A T

Beckman rendszer							Waters rendszer			
minta	nap	n	%bST	%RSD	r.i.	%RSD	%bST	%RSD	r.i.	%RSD

001	1	3	83,5	0,70	851	0,12	83,8	2,67	827	0,07
	2	3	81,7	1,27	831	0,09	83,7	0,91	846	0,07
	3	3	82,7	0,75	822	0,10				

002	1	3	87,1	2,33	849	0,18	86,1	2,80	824	0,15
	2	3	86,1	2,72	830	0,06	86,7	2,56	850	0,09
	3	3	88,9	1,34	824	0,10				

003	1	3	44,9	0,47	853	0,08	44,5	2,40	827	0,10
	2	3	46,3	1,48	837	0,13	46,9	1,21	854	0,17
	3	3	46,8	0,75	829	0,10				

n = ismétlés száma

r.i. = retenciós idő (másodperc)

RSD = relatív standard deviáció

A bST visszanyerési vizsgálatokat a biológiailag aktív bST fehérje referencia standard két különböző koncentrációban, két különböző bST mintához történő hozzáadásával végeztük. Az említett vizsgálatokban kapott visszanyerési értékek 101-104 % tartományba esnek (III. táblázat).

III. T Á B L Á Z A T

minta	hozzáadott refe- rencia standard	me- rt érték (mg)	n	vi- sszanyerés (%)	RSD (%)
-----	-----	-----	-----	-----	-----
003A	0,186	0,191	3	102,5 %	0,34
003A	0,465	0,471	3	101,2 %	0,58
003B	0,186	0,193	3	103,8 %	0,90
003B	0,465	0,472	3	101,4 %	0,72
-----	-----	-----	-----	-----	-----

n = ismétlés száma

RSD = relatív standard deviáció

A bst oldható aggregátum jellemzése: Amint fentebb már említettük, a 13. percnél jelentkező csúcs a biológiailag aktív bst fehérjefrakciót a 9. percnél megjelenő csúcs a bst oldható aggregátum frakcióját jelenti (1B-1E ábrák). A méretkizárásos HPLC "fotódióda array" detektorával felvett UV spektrumai azt mutatják, hogy a biológiailag aktív bst fehérjefrakció és a bst oldható aggregátum frakció UV spektruma hasonló. A bst oldható aggregátum UV spektrum 250-270 nm tartományban mutat eltérést, ami annak lehet a következménye, hogy az aggregáció után megváltozik az aromás aminosavak környezete.

A bst aggregátumok molekulatömegét egy kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg, méretkizárásos HPLC-t alkalmazva. Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A bst oldható aggregátum az oszlop kizárásos térfogatánál eluálódik, és molekulatömege több, mint 660000 (a tiroglobulin molekulatömege).

A bST oldható aggregátum további jellemzéséhez, a bST mintát 0,4M ammónium-hidrogén-karbonát-oldatban (pH = 9) oldottuk 5 mg/ml koncentrációban. 16000 g értéken történő centrifugálás után a felülúszót a fentiekben leírt standard méretkizárásos HPLC-nek vetjük alá, azzal a különbséggel, hogy a mozgófázis 0,4M ammónium-hidrogén-karbonát. Az elválasztásnál két alkotórészt kapunk, a biológiailag aktív bST fehérjét és a bST oldható aggregátumot, melyeket különálló frakciókba gyűjtjük össze. Mindegyik összegyűjtött frakciót újra kromatografáljuk, hogy megerősítsük a retenciós idejüket és a tisztaságukat. Az eredmények azt mutatják, hogy a bST aggregátum a centrifugálást követően is oldatban marad.

Kísérleteket végeztünk annak megerősítésére, hogy a bST oldható aggregátum nem-kovalensen kötött. Ha a bST oldható aggregátum egy nem-kovalensen kötött fehérje, monomerré kell disszociálnia olyan denaturálószer jelenlétében, mint a detergens, nagy koncentrációjú karbamid és a guanidin-HCl. Ennek megállapítására az összegyűjtött bST oldható aggregátum-frakció és 2 % nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 1:1 arányú elegyét duPont 250 oszlopon kromatografáltuk; a mozgófázis: 1 % SDS-t tartalmazó 0,4M hidrogén-karbonát-oldat. Amint az várható volt, a disszociált protein kromatográfiás profilja és UV spektruma azonos az ugyanilyen körülmények között kapott SDS-monomerével. Hasonló vizsgálatokkal bizonyítható, hogy a bST oldható aggregátum 3M karbamidban ugyancsak disszociálódhat.

Az oldatban lévő bST oldható aggregátum további jellemzőit

is megállapítottuk. A bST oldható aggregátum oldhatósága erősen befolyásolható az oldat sókoncentrációjával. Növelve a hidrogén-karbonát koncentrációját, élesen csökken az oldható aggregátum oldékonysága a fehérje kisózódási jelensége miatt, amint az a méretkizárásos HPLC-vel bizonyítható. A vizsgálatoknál a fentiekben ismertetett HPLC körülményeket alkalmazzuk, azzal a különbséggel, hogy a mintában és a mozgófázisban változtatjuk a hidrogén-karbonát koncentrációját, amint azt a 6. ábrán jelezzük. Ugyancsak megvizsgáltuk a hidrogén-karbonát puffer kémhatásának befolyását a bST oldható aggregátum oldékonyságára. pH = 8,5 alatt és pH = 12,5 felett a bST oldható aggregátum a 0,2M hidrogén-karbonát-oldatban kicsapódik. pH = 8,5 és pH = 9,5 közötti tartományban a bST oldható aggregátum oldékonysága a növekvő pH értékkel nő (7. ábra).

Tanulmányoztuk az oldható aggregátum hidrogén-karbonát-oldatban való stabilitását. A bST oldható aggregátum oldat 4°C hőmérsékleten két napon át, szobahőmérsékleten több, mint 9 órán keresztül stabil (a méretkizárásos HPLC kromatogram csúcs alatti területével meghatározva).

Továbbá, ha a bST oldható aggregátumot 16000 g értéken centrifugáljuk, az az oldatban marad legalább 30 percen át (8. ábra).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szarvasmarha-szomatotropin hatékonyságának meghatározására, azzal j e l l e m e z v e, hogy

a szarvasmarha-szomatotropin mintában mérjük a szarvasmarha-szomatotropin fehérje biológiai aktivitását méretkizárásos HPLC-vel, állófázisként 5-15 μm átlagos részecskeátmérőjű, hidrofíll, porózus polimergélt, mozgófázisként pH = 8-12 kémhatású, a szarvasmarha szomatotropin mintát nem-denaturáló pufferolt vizes oldatot használva; és

meghatározzuk a szarvasmarha-szomatotropin minta hatékonyságát a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin fehérje mért szintjének alapján.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofíll porózus polimergél átlagos részecskemérete 10-15 μm .

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett pufferolt vizes oldat hidrogén-karbonát pufferoldat.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofíll porózus polimergél átlagos részecskemérete 10-15 μm .

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett meghatározás azt jelenti, hogy a biológiailag aktív BST fehérje mért szintjét grafikusán felvisszük a szarvasmarha-szomatotropin kontrollminták méretkizárásos HPLC-vel megállapított és RRA módszerrel korreláló hatékonysági adatokból kapott kalibrációs görbére.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofíll porózus polimergél átlagos részecskemérete kb. 10 μm .

7. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrophil porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis kémhatása pH = 9-11.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrophil porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

10. A 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett méret-kizáró HPLC 800-1000 psi nyomáson történik.

11. A 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis ammónium-hidrogén-karbonát pufferozott, melynek koncentrációja 0,7M-nál alacsonyabb.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett méret-kizáró HPLC 800-1000 psi nyomáson történik.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrophil porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

14. Eljárás a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin frakció szarvasmarha-szomatotropin mintában lévő biológiailag inaktív szomatotropin frakciótól történő elválasztására, azzal jellemezve, hogy a biológiailag aktív szarvasmarha-szomatotropin frakció biológiailag inaktív szarvasmarha-szomatotropintól történő elválasztásához méretkizáró HPLC-t alkalmazunk, ahol az állófázis 5-15 μm átlagos részecskeméretű, hidrophil, porózus polimergél és a mozgófázis egy pH = 8-12 kémhatású, a szarvasmarha-szomatotropint nem denaturáló, pufferozott vizes oldat.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett pufferozott vizes oldat hidrogén-karbonát oldat.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofil porózus polimergél átlagos szemcsemérete 10-15 μm .

17. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hid-rofil, porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

18. A 16. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett méret-kizárásos HPLC 800-1000 psi nyomáson történik.

19. A 16. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis kém-hatása pH = 9-11.

20. A 16. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis 0,7M-nál alacsonyabb koncentrációjú ammónium-hidrogén-karbonát-oldat.

21. A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofil, porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

22. A 20. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett méretkizárásos HPLC 800-1000 psi nyomáson történik.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hid-rofil, porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

24. Eljárás a nagytömegű rekombináns borjú-szomatotropin feldolgozására azzal a céllal, hogy a biológiailag aktív szarvas-marha-szomatotropint elválasztjuk a nagytömegű rekombináns szarvasmarha-szomatotropinban lévő biológiailag inaktív szarvas-marha-szomatotropin nem-kovalensen kötött, oldható aggregátumaitól, azzal jellemezve, hogy a nagytömegű rekombináns szarvasmarha-szomatotropint méretkizárásos HPLC-nek vetjük alá, ahol állófázisként 5-15 μm átlagos részecskeméretű, hidrofil, porózus polimergélt, mozgófázisként pH = 8-12 kémhatású, a szarvasmarha-szo-

matotropint nem-denaturáló, pufferolt vizes oldatot használunk.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett pufferolt vizes oldat hidrogén-karbonát-oldat.

26. A 24. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofil, porózus polimergél átlagos szemcsemérete 10-15 μm .

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett méret-kizárásos HPLC 800-1000 psi nyomáson történik.

28. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis kémhatása pH = 9-11.

29. A 26. igénypont szerinti eljárás, ahol a mozgófázis 0,7M-nál alacsonyabb koncentrációjú ammónium-hidrogén-karbonát pufferoldat.

30. A 27. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett hidrofil, porózus polimergél átlagos pórusátmérője 150 Å.

A meghatalmazott

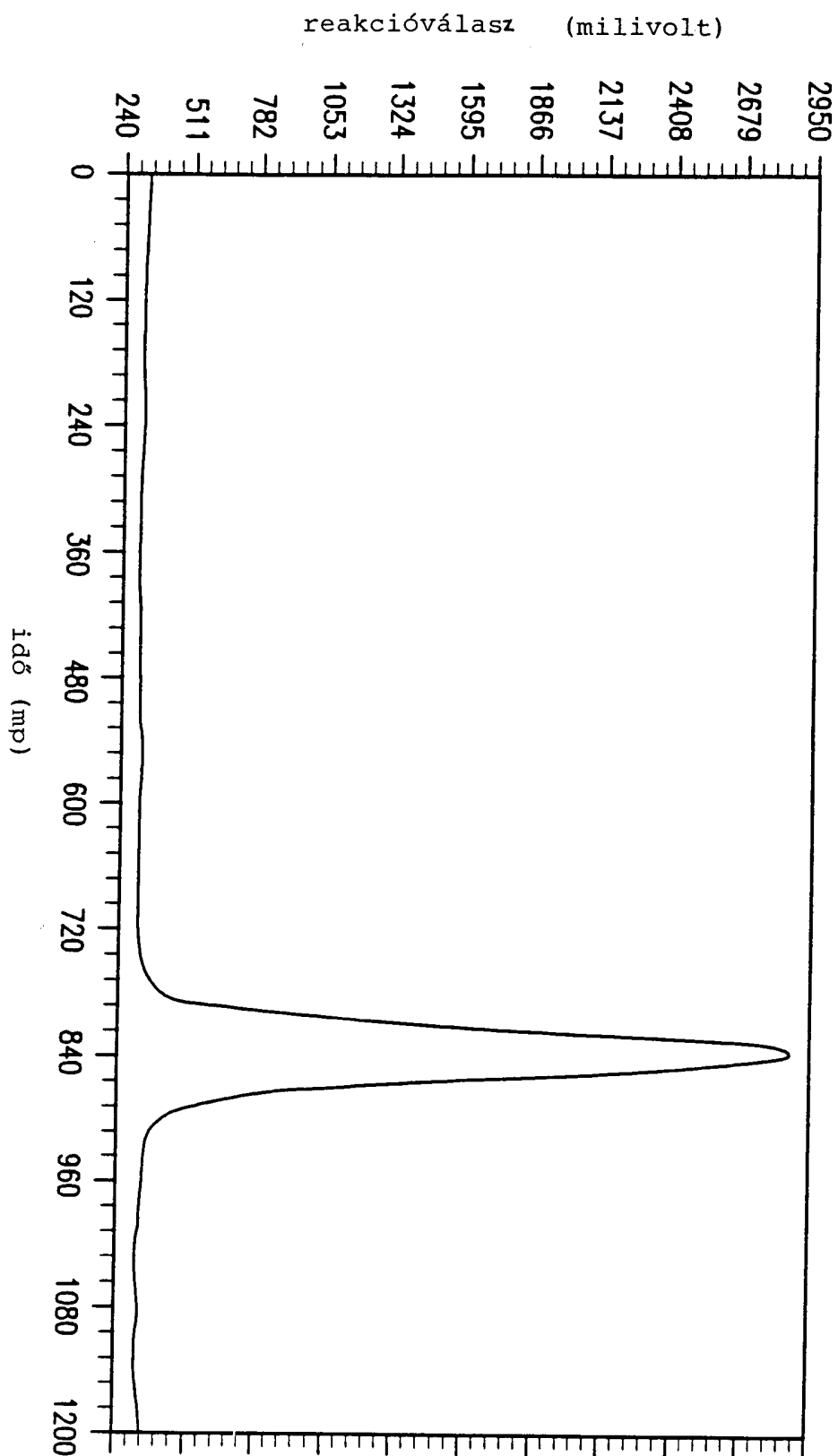
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-958, Fax: 34-24-323

1987.09.28

2233/95

5.7.10/1

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



1A
ÁBRA

ifj. Szentpéteri
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
H-1062 Budapest, Apáczai köz 113
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-300

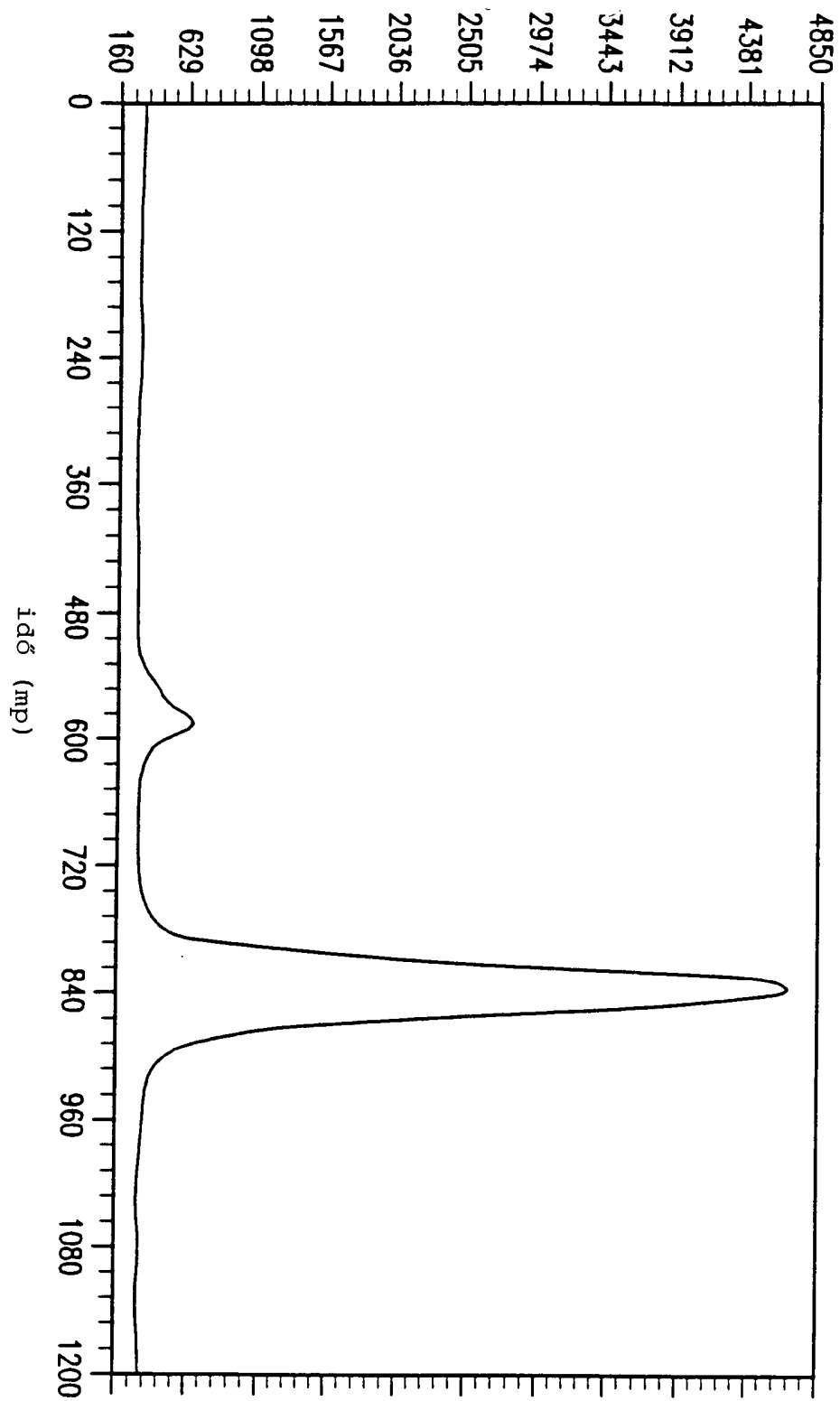
2233/95



10/2

reakcióválasz (milivolt)

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



1B
ÁBRA

ifj. Szentpéteri Adam
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1042 Budapest, Árpád út 113.
Tel.: 34-24-930, Fax: 34-24-323

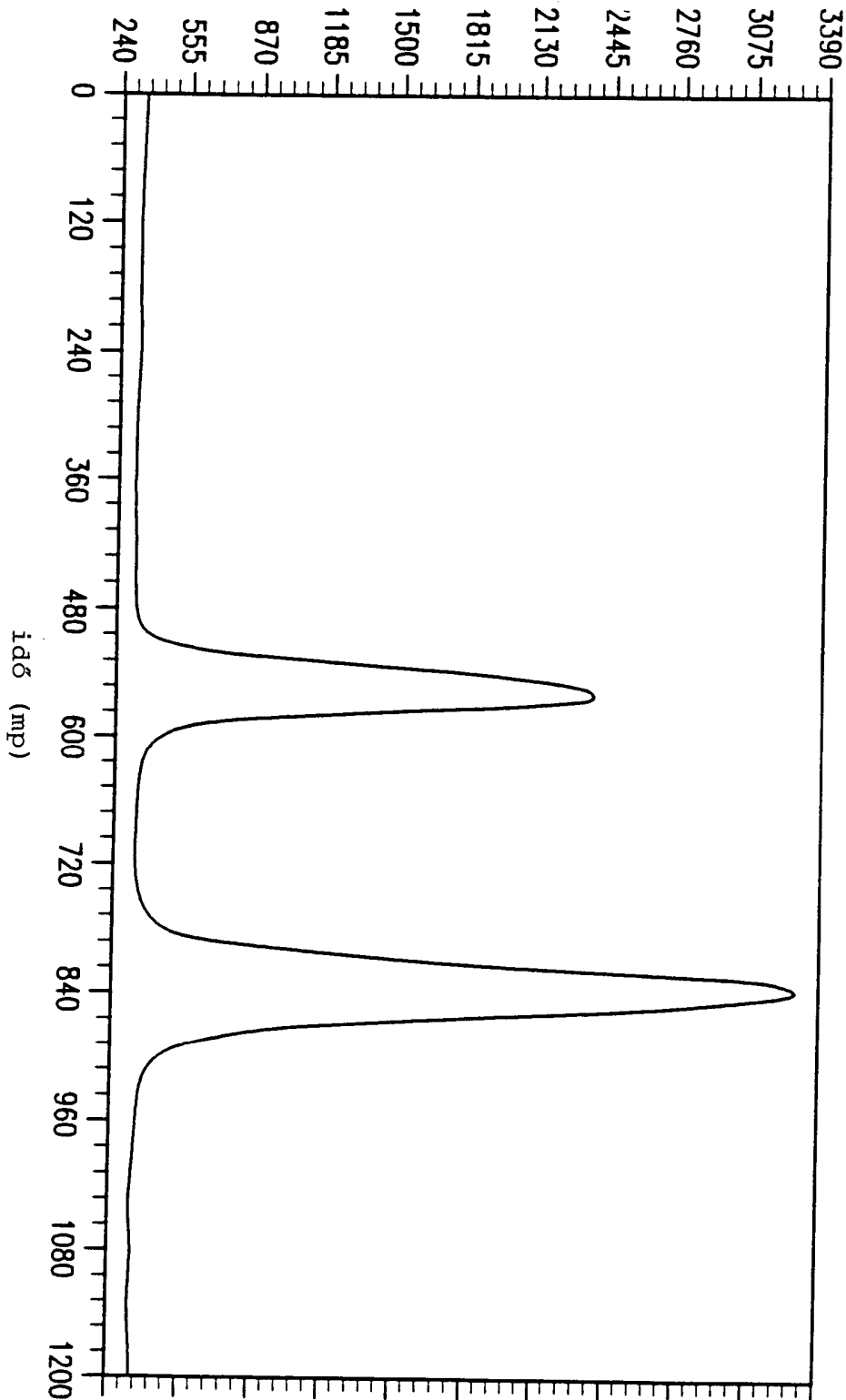
2233/95

5.7.2

reakcióválasz (milivolt)

10/3

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



1C
ÁBRA

Dr. Szentpéteri Adam
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
1065 Budapest, Andrássy út 113.
Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323

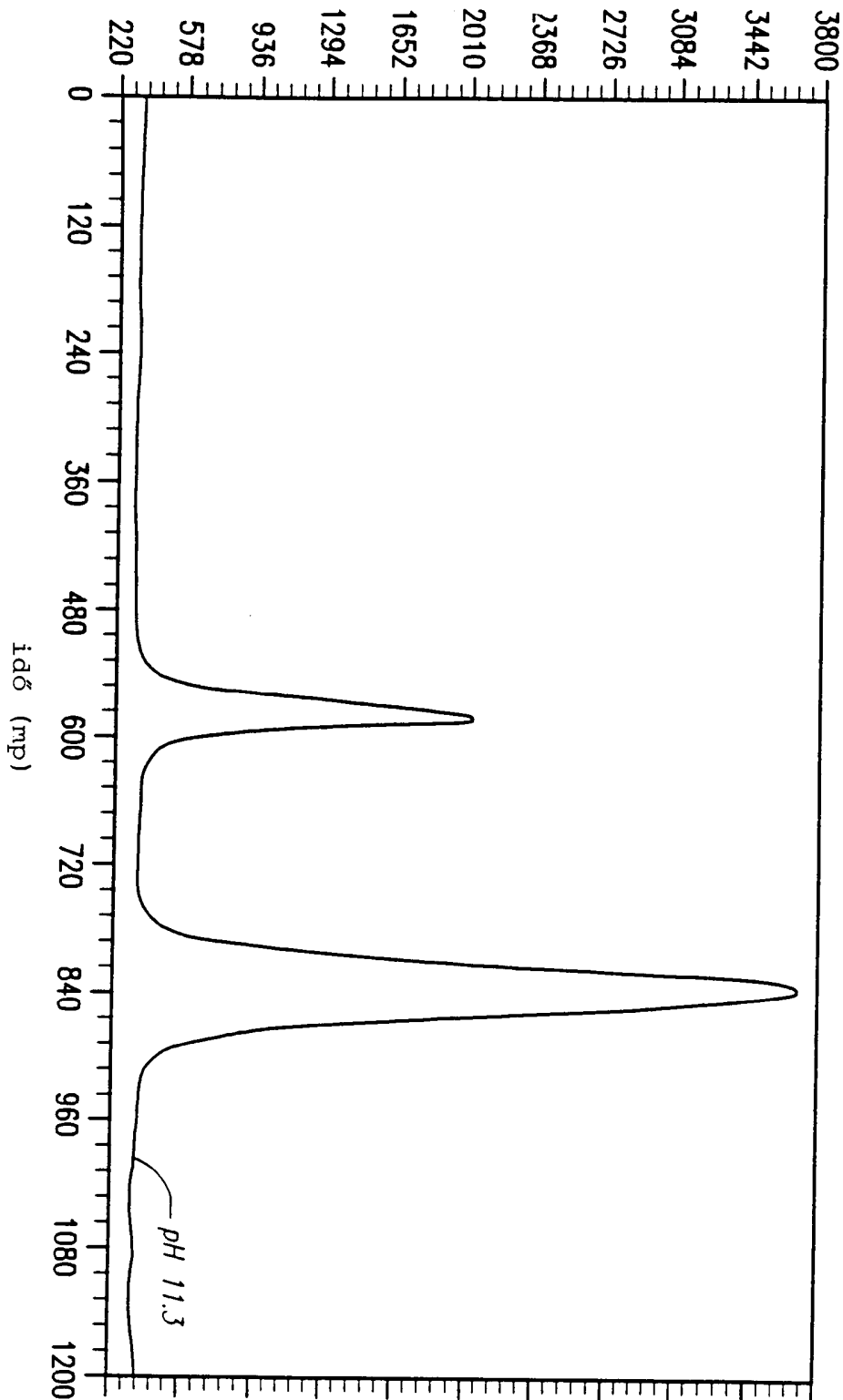
2233/95

5.7.2

reakcióválasz (milivolt)

10/4

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



ID
ÁBRA

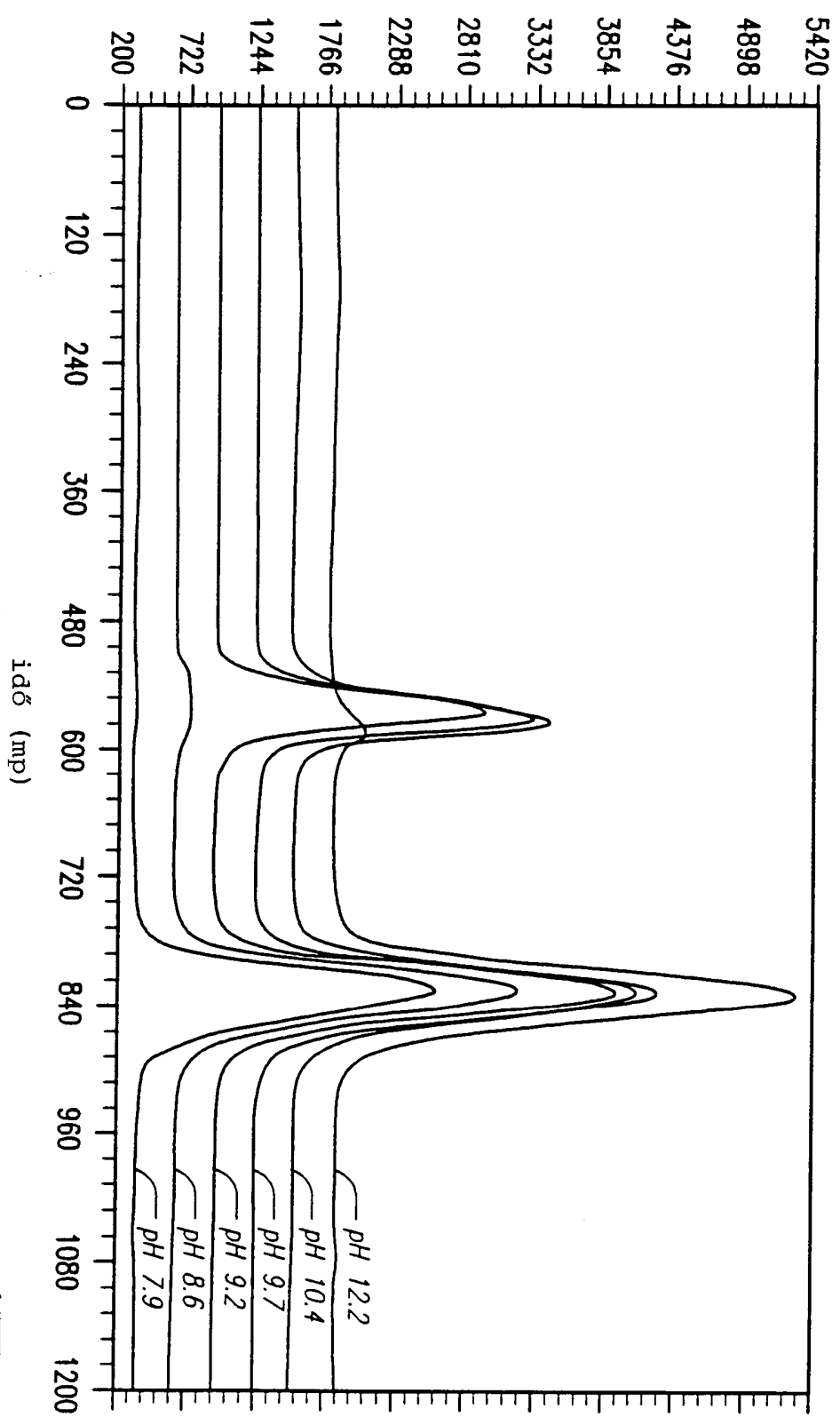
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

5.7.2

2298/95

reakcióválasz (millivolt)

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

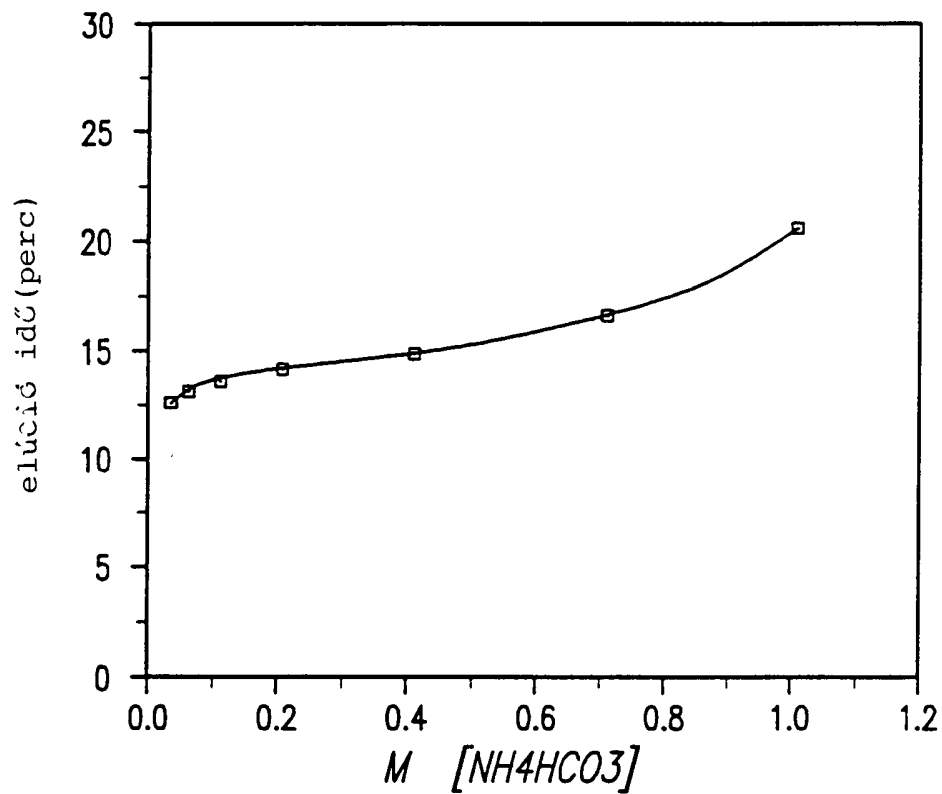


IE
ÁBRA

2233/95

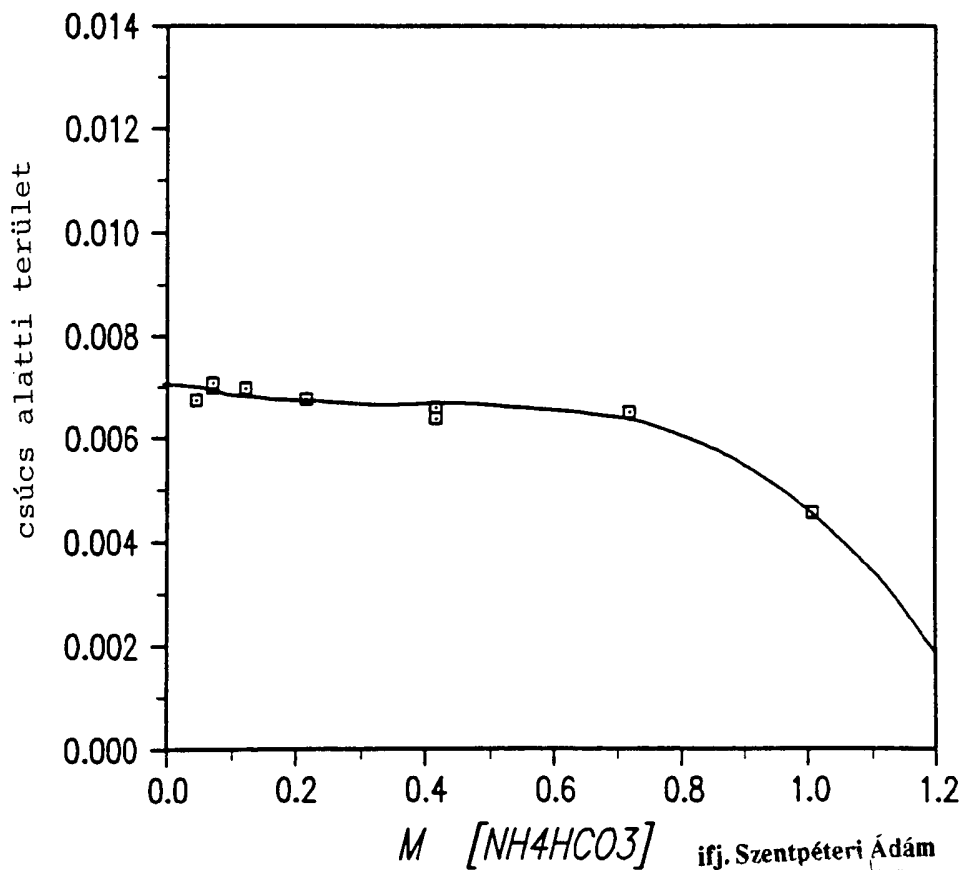
S.B.G.

10/6



KÖZZETÉL PÉLDÁNY

2A ÁBRA



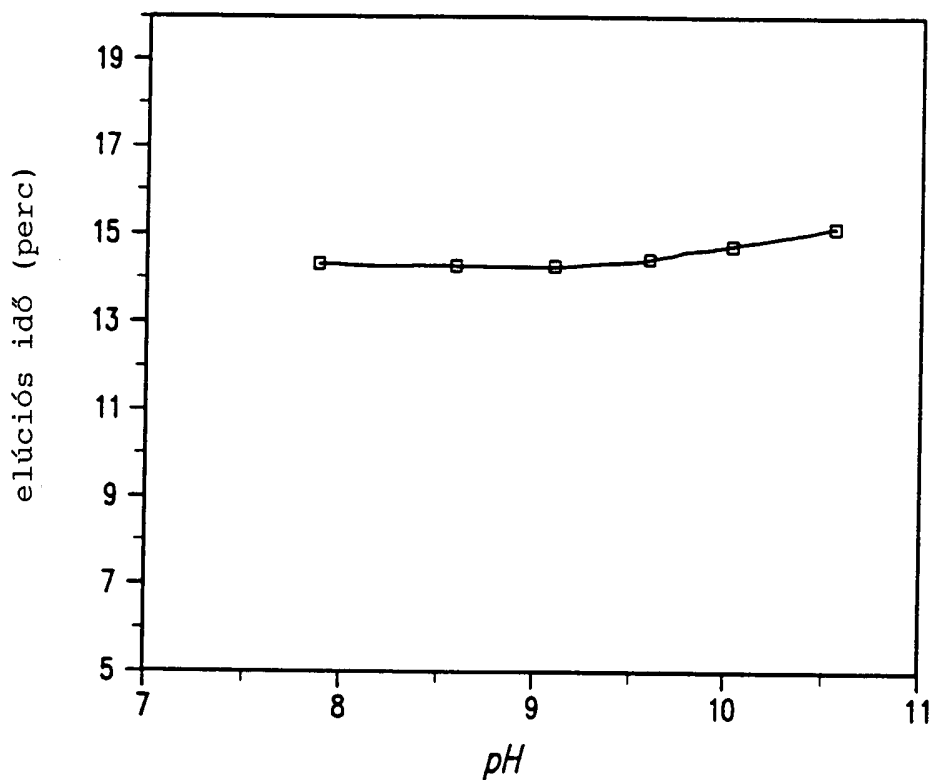
2B ÁBRA

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda részére
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

2233/95

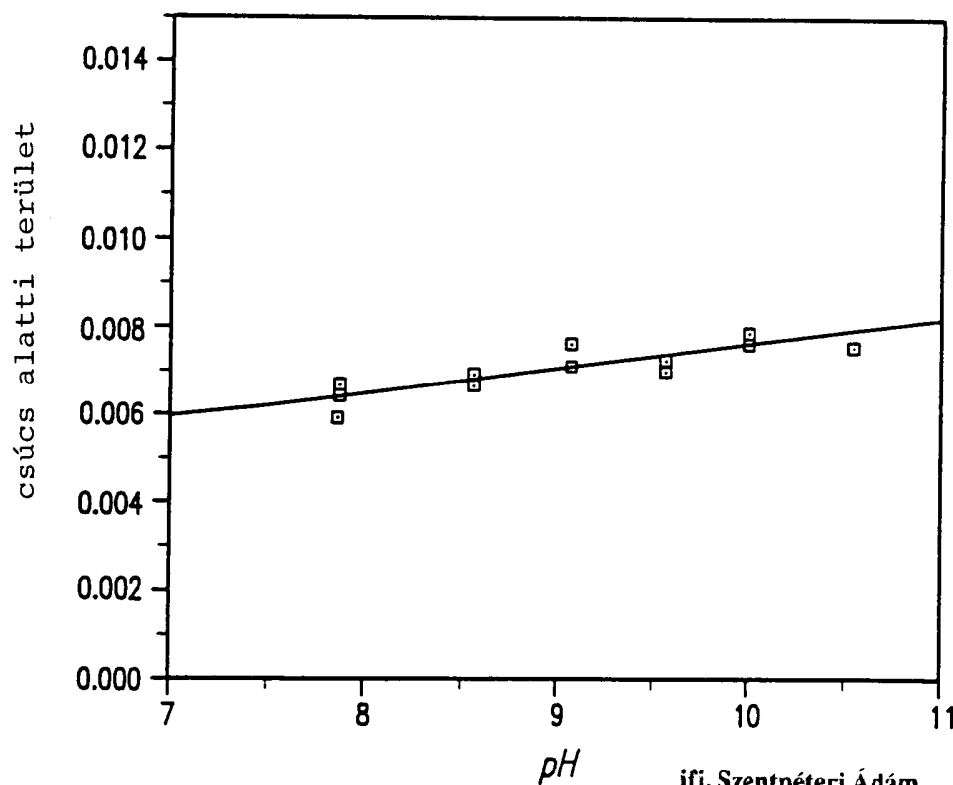
5472

10/7



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3A ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.b.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-930, Fax: 34-24-323

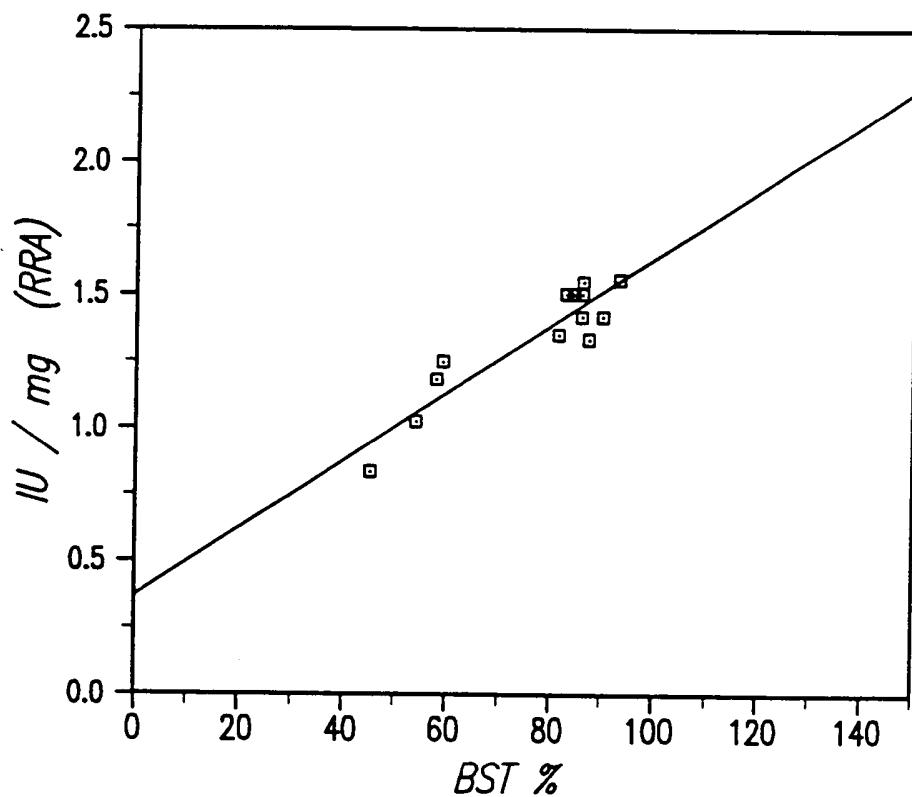
3B ÁBRA

2233/95

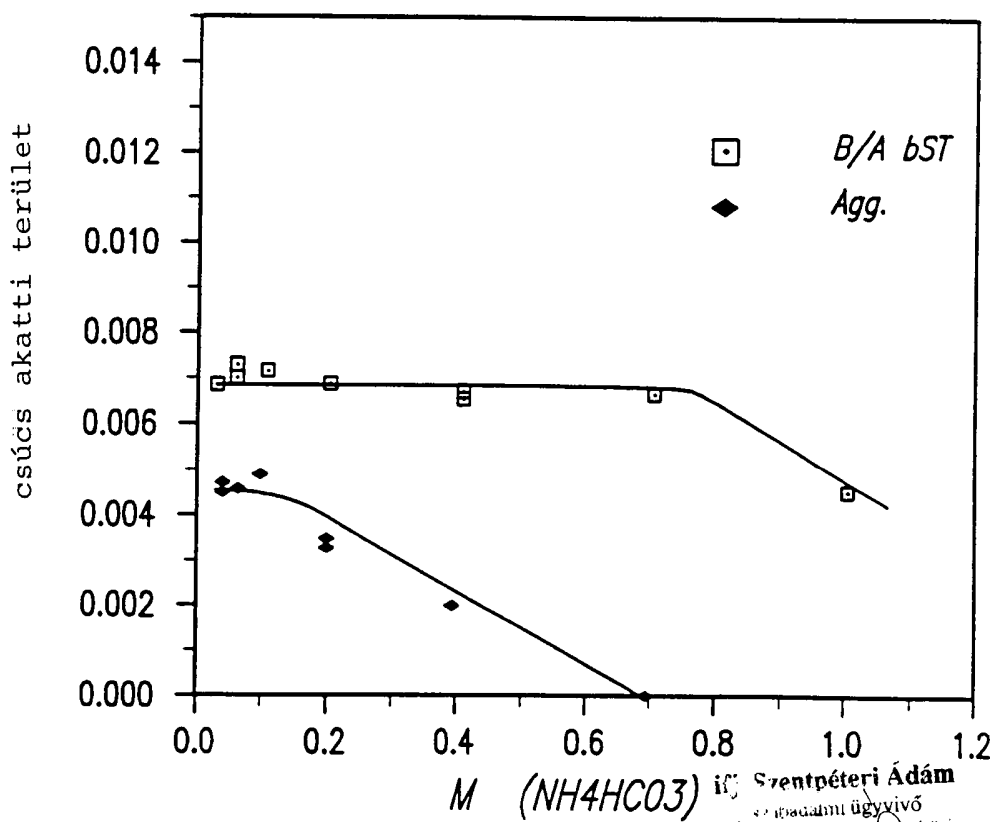
5472

10/8

KÖZLETTÉLI PÉLDÁNY

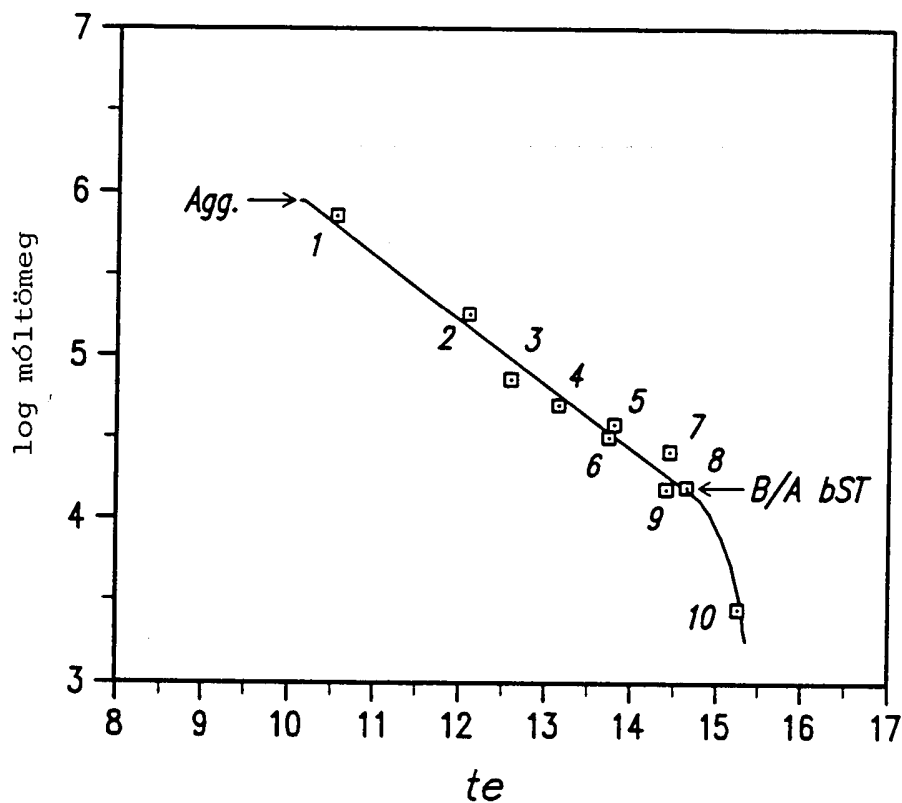


4. ÁBRA



6. ÁBRA

Dr. Szentpéteri Ádám
 tudományos főmunkatárs
 az S. G. & K. Nemzetközi
 Szaktanácsadói Iroda tagja
 H-1022 Budapest, Andrássy út 113.
 Tel.: 34-24-950, Fax: 34-24-323



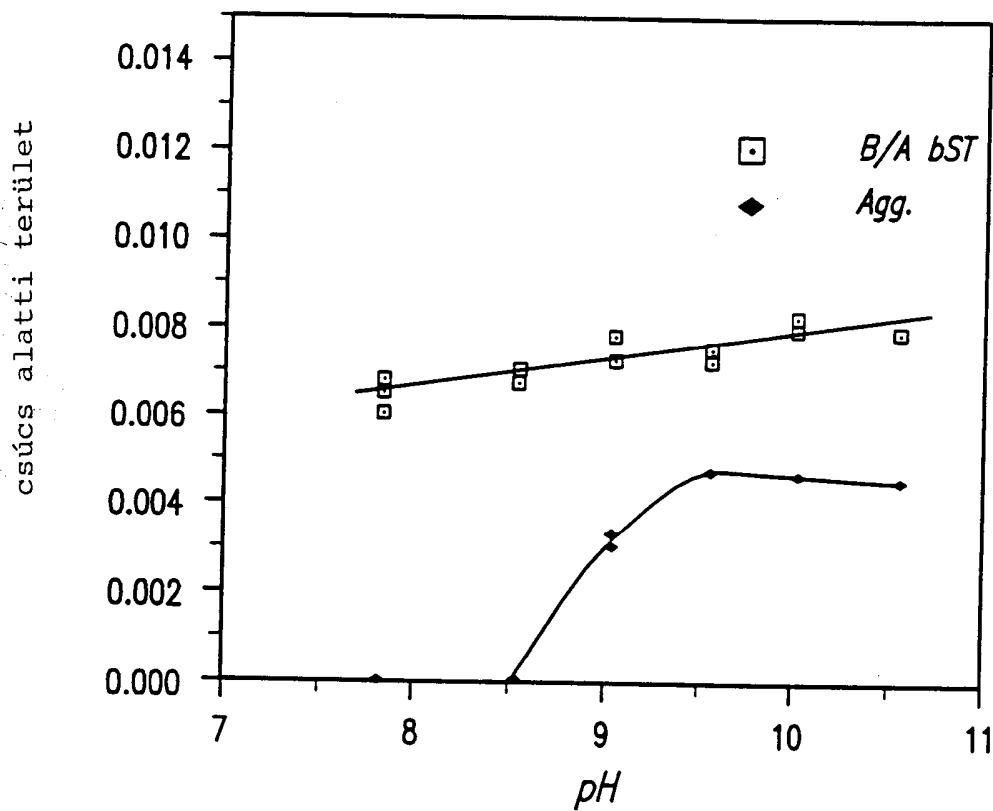
1. Tiroglobulin	660,000
2. γ -globulin	166,000
3. BSA	66,000
4. Ovalbumin	45,000
5. β -laktoglobulin	35,000
6. Carbonic anhydrase	29,000
7. α -kimotripszinogén	23,000
8. α -kimotripszinogén	14,200
9. Ribonukleáze A	13,700
10. Insulin A-lánc	2,531

5. ÁBRA

2233/95

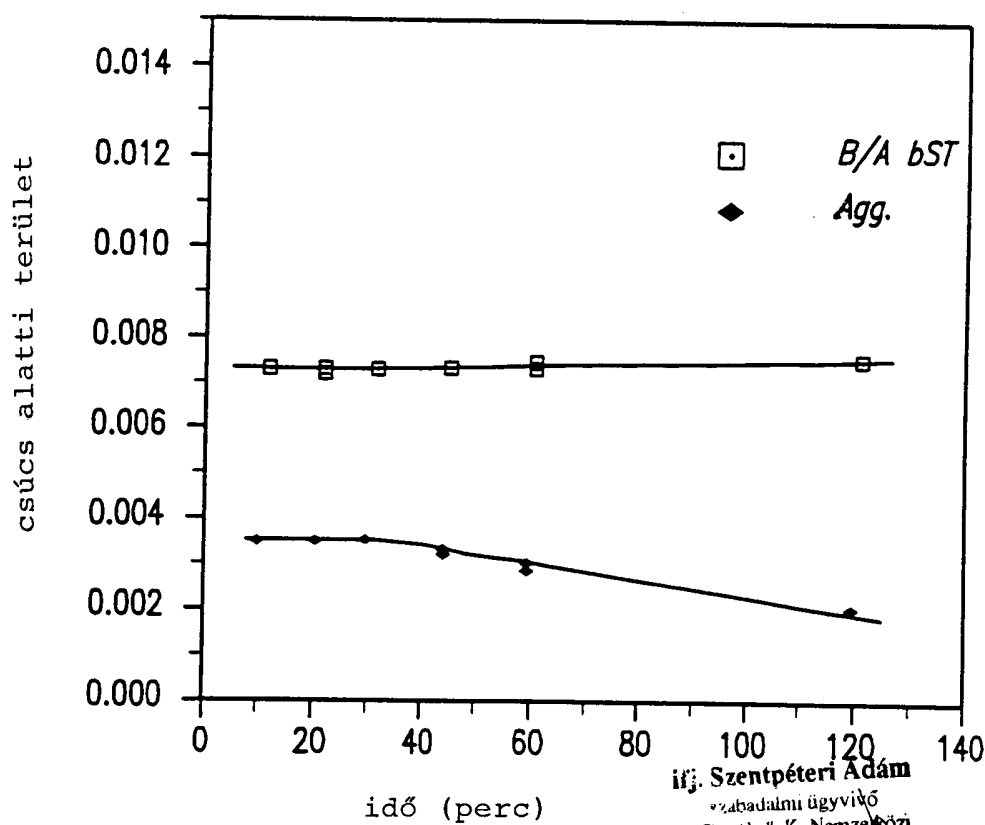
5472

10/10



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

7. ÁBRA



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B. & K. Nemzeti
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

8. ÁBRA