



F1000092404B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT **92404**

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 11 1994

(51) Kv.lk.5 - Int.cl.5
C 07K 3/28, C 12P 21/02

(21) Patentihakemus - Patentansökning **885341**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **17.11.88**

(24) Alkupäivä - Löpdag **17.11.88**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **19.05.89**

(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad **29.07.94**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
18.11.87 EP 87202261 P

(71) Hakija - Sökande

1. Gist-Brocades N.V., Wateringseweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. König, Boudewijn Wynand, Fazantenkamp 64, 3607 CC Maarssenbroek, Netherlands, (NL)
2. Hamers, Michiel Nicolaas, Dorpsstraat 329, 1531 HJ Wormer, Netherlands, (NL)
3. Van der Laken, Cornelis Jacobus, Kroeskarper 9, 2318 NG Leiden, Netherlands, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä seerumin albumiinin puhdistamiseksi
Förfarande för rening av serumalbumin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP B 73646 (C 12N 15/00), GB A 1471006 (C 07G 7/00), US A 4086222 (B 01D 15/08),
US A 4228154 (A 61K 37/02),
Biochimica et Biophysica Acta 372 (1974) 218-224 (A. Wichman et al.),
Chemical Abstracts 91 (1979) 119043k

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Rekombinoimalla valmistettu seerumin albumiini puhdistetaan vaihesarjana käyttäen aluksi alkalista sakkautusta, jota valinnaisesti seuraa inkubointi anioninvaihto-adsorbentin kanssa, mitä seuraa affiniteettikromatografia, joka käyttää hydrofobista kiinteää faasia ja vesiliukoista lipidianionia desorbenssina vesifaasissa.

Med rekombinantteknik framställd serum albumin renas stegvis genom att först använda en alkalisk avsättning, som valbart följes av inkubering med anjonförväxlingsabsorbent, varefter utförs affinitetskromatografi med användning av en hydrofob fast fas och en vattenlöslig lipidanjon som desorbens i vattenfas.

Menetelmä seerumin albumiinin puhdistamiseksi

Tämä keksintö liittyy alaan, joka koskee rekombinanttitekniikalla valmistettujen proteiinien, erityisesti seerumin albumiinin puhdistamista ja keksintö kohdistuu menetelmään puhdistetun rekombinanttisen seerumin albumiinin valmistamiseksi.

Ihmisseerumin albumiini ("HSA") on plasman pääproteiinikomponentti ja koostuu 585 aminohapon muodostamasta yhdestä polypeptidiketjusta, jonka molekyyllipaino on noin 66 000 daltonia. Sen 17 molekyyllinsisäistä disulfidisiltaa vaikuttavat albuminimolekyylin korkeaan stabiiliuteen.

Albumiinin ensisijaisena tehtävänä plasmassa on ylläpitää kolloidin osmoottista painetta verisuonessa. Edelleen proteiini toimii useiden ligandien, esim. bilirubiinin ja rasvahappojen kantajana. (Katso F. Rothsteinin, V.M. Rosenoerin ja W.L. Hughesin selostusta julkaisussa Albumin Struct. Funct. Uses (1977) 7-25; U. Kragh-Hansenin Pharmacol. Rev. (1981) 33:17-53; T. Peters Jr.:n Adv. Prot. Chem. (1985) 37:161-245.

Puhdistettua seerumin albumiinia indikoidaan hypovolemisen shokin estämiseen ja hoitamiseen vaikean hypoalbuminemian tapauksissa hemodialyysin ja kardiopulmonäärysten ohituskäsittelyjen apuna ja yhdessä vaihtoverensiirron kanssa neonataalisen hyperbilirubinemian hoidossa.

HSA:n puhdistamiseksi plasmasta tai plasentasta suuressa mitakaavassa käytetään usein sakkautusmenetelmiä, jotka käyttävät etanolia, polyeteeniglykolia, trikloorietikkahappoa tai ammoniumsulfaattia yhdessä Rivanol^R:n ja/tai nestekromatografiamenetelmien kanssa (Katso viimeksi mainittua: J. Saint-Blancard, J.M. Kirzin, P. Riberon, F. Petit, J. Fourcart, P. Girot ja E. Boschetti, Anal. Chem. Symp. Ser. (1982) 9:305-312; J.M. Curling Methods of Plasma Protein Fractionation (1980) 77-91; M.J. Harvey Methods of Plasma Protein Fractio-

nation (1980) 189-200; N.E. Schultze ja J.F. Heremans, Mol. Biol. Hum. Prot. (1966) 1:261-270; J. Liautau, J. Pla, A. Debrus, P. Gattel, R. Plan ja L. Peyron, 13th Int. Congr. IAES (1973) 27:107-114, Hao, Y-L, Vox Sang (1985) 49:1-8; ja U.S.-patentti No. 4,228,154.)

Laboratoriomittakaavassa affiniteettikromatografian käyttämistä seerumin albumiinin puhdistamiseen ovat selittäneet T. Peters Jr., H. Taniuchi ja C.E. Anfinsen Jr. julkaisussa J. Biol. Chem. (1973) 248(7):2447-2451; A. Wichman ja L-O. Andersson Biokin. Biophys. Acta (1974) 372:218-224; ja A. Aslam, D.J. Jones ja T.R. Brown Anal. Biochem. (1976) 75:329-335.

Koska tarvitaan suuria määriä seerumin albumiinia hoitoa varten ja seerumin albumiinin lähde (plasma) on rajallinen, on etsitty muita tekniikoita HSA:n valmistamiseksi suuria määriä. Onnistumisista on raportoitu HSA:n valmistamisessa fermentoimalla käyttäen transformoituja mikro-organismeja tai solulinjoja, jotka on tehty rekombinantti DNA -tekniikoilla. Katso esimerkiksi EP-A-0073646.

Kuitenkin yksi pääongelmista transformoituja soluja käyttäen fermentoimalla tuotetun seerumin albumiinin puhdistamisessa on kasvuväliaineesta (fermentointiliemestä) tai solulysaattista peräisin olevien kontaminoivien komponenttien läsnäolo, jotka komponentit on poistettava puhdistetun, homogeenisen seerumin albumiinin saamiseksi.

Nämä kontaminantit ovat esimerkiksi vieraita proteiineja, joiden odotettaisiin muodostavan immunologisen reaktion. Kontaminoituneen HSA:n antaminen voisi aiheuttaa shokin. Nämä kontaminantit ovat täysin erilaisia kuin ne, joita esiintyy seerumin albumiinin fraktionoinnissa plasmasta tai plasentasta. Tämä merkitsee sitä, että puhdistusmenetelmiä, jotka on kehitetty luonnollisten lähteiden HSA:lle, ei voida ekstrapo-

luida rekombinantti seerumin albumiinin puhdistamiseen. Käytännöllisiä menetelmiä ihmisseerumin albumiinin, joka on tuotettu transformoiduilla mikro-organismeilla tai solulinjoilla, puhdistamiseksi ei ole julkaistu toistaiseksi eivätkä ne ole vielä saatavilla.

Rekombinoimalla tuotettu seerumin albumiini puhdistetaan keksinnön mukaisesti alkuvaiheessa alkalisella saostuksella, mahdollisesti ioninvaihtokromatografialla happamassa pH:ssa, ja affiniteettikromatografialla käyttäen liikkumatonta faasia, jossa on lipofiilinen pinta, käyttäen lipidianionia desorbenssinä vesifaasissa. Saadaan suuria saantoja ja puh-
tauksia.

Kuvio 1: Ihmisseerumin albumiinin SDS-PAGE pelkistävässä olosuhteissa (hopeavärjäys). Rasvaton HSA: kaistat 1 (100 ng); 5 (500 ng); 9 (10 μ g). Puhdistettu HSA: kaistat 2, 3 (100 ng); 6, 7 (500 ng); 10, 11 (10 μ g). Molekyyllipainomarkkerit: kaistat 4, 8.

Kuvio 2: Ihmisseerumin albumiinin isoelektrofokusointi (CBB R-250 -värjäys). I: näytteiden levityskohta kaistoissa 1, 2, 3. II: näytteiden levityskohta kaistoissa 4, 5, 6. III: näytteiden levityskohta kaistoissa 7, 8, 9. Rasvaton HSA (10 μ g): kaistat 1, 4, 7. Puhdistettu HSA (10 μ g): loput kaistat.

Kuvio 3: Ihmisseerumin albumiinin korkean erotuskyvyn ioninvaihtokromatografia Mono Q^R:lla. Ylempi kromatogrammi: puhdistettu HSA; alempi kromatogrammi: rasvaton HSA.

Kuvio 4: Ihmisseerumin albumiinin korkean erotuskyvyn koko eksklusiokromatografia Bio-Sil TSK-250^R:llä. Proteiinin detektointi kolonnin jälkeisellä derivatisoinnilla proteiini-

reangenssilla. Ylempi kromatogrammi: rasvaton HSA; alempi kromatogrammi: puhdistettu HSA.

Kuvio 5: Alkalisella saostuksella ja affiniteettikromatografialla puhdistetun ihmisseerumin albumiinin korkean erotuskyvyn ioninvaihtokromatografia Mono Q^R:llä.

Kuvio 6: Ihmisseerumin albumiinin SDS-PAGE pelkistävässä olosuhteissa (CBB R-250 -värjäys). Rasvaton HSA: kaistat 2 (50 µg) ja 3 (100 µg). Puhdistettu rekombinantti HSA: kaistat 4 (35 µg) ja 5 (70 µg). Molekyylipainomarkkerit: kaistat 1 ja 6 (20 µg).

Kuvio 7: Ihmisseerumin albumiinin isoelektrofokusointi (Ag-värjäys). Markkerit: kaistat 1 ja 6. Rasvaton HSA: kaistat 2 (0,25 µg) ja 3 (0,50 µg). Puhdistettu rekombinanttialbumiini: kaistat 4 (0,50 µg) ja 5 (0,25 µg).

Kuvio 8: Rekombinantti-HSA:n korkean erotuskyvyn nestekromatografia. HPSEC Bio-Sil TSK-250^R:llä (A), HPIEC Mono Q^R:llä (B).

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti rekombinanttitekniikoilla valmistettu seerumin albumiini, erityisesti ihmisseerumin albumiini, puhdistetaan suurella saannolla ja erittäin puhtaaksi käytettäväksi farmakologisena tuotteena.

Keksintö koskee näin ollen menetelmää puhdistetun rekombinanttisen seerumin albumiinin valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että se käsittää:

mikro-organismien kasvattamisen väliaineessa, jotka mikro-organismit on transformoitu ekspressiorakenteella, joka kä-

sittää seerumin albumiinia koodaavan rakennegeenin, jolloin seerumin albumiini ekspressoituu;

tuoteväliaineen eristämisen selkeytettynä fermentointiliemessä tai solulysaattina;

tuoteväliaineen tekemisen alkaliseksi pH-arvoon 7,5-9,0 ja alkalisen väliaineen erottamisen sakasta;

mainitun alkalisen väliaineen pH:n muuttamisen suunnilleen fysiologiseksi pH:ksi konsentroidun seerumin albumiinin muodostamiseksi ja mainitun konsentroidun väliaineen kromatografinnin lipofiilisellä liikkumattomalla faasilla ja albumiinin eluoinnin lisäämällä desorbenssina vesiliukoista lipidianionia vesipitoiseen faasiin; ja

puhdistetun seerumin albumiinin eristämisen oleellisesti vapaana mainitusta mikro-organismista peräisin olevista kontaminanteista.

Puhdistusmenetelmää edeltää fermentointiliemen suodatus. Menetelmää voidaan soveltaa näin saadulle supernatantille tai soluihin liuotuksen jälkeen. Menetelmä käsittää kontaminanttien alkalisen saostamisen; mahdollisesti käsittelyn happamalla anioninvaihtohartsilla ja mahdollisesti dialyysin väliaineen väkevöimiseksi, mitä seuraa affiniteettikromatografia, jossa käytetään lipofiilistä liikkumatonta faasia ja lipidianionia desorbenssinä eluoinnissa. Seerumin albumiini voidaan sitten ottaa talteen suolanpoistolla ja väkevöinnillä. Jos halutaan, seerumin albumiini voidaan lyofilisoida kuivan tuotteen saamiseksi.

Kyseessä olevan keksinnön menetelmällä tuotettu seerumin albumiini on oleellisesti homogeeninen ja monomeerinen määritettynä ioninvaihtokromatografialla, kokoeksklusiokroma-

tografialla, SDS-PAGE:lla ja immunologisella testauksella sisältäen kaniinien immunisoinnin.

Menetelmälle löytyy käyttöä seerumin albumiinin, erityisesti ihmisseerumin albumiinin, joka on valmistettu mikro-organismeja käyttävällä rekombinanttitekniikalla, tuotannossa. Mikro-organismit voivat olla prokaryoottisia tai eukaryoottisia, erityisesti eukaryoottisia, ja sisältää esim. sellaisia bakteereja, kuten E. coli, B. subtilis, B. licheniformis, Streptomyces, Pseudomonas, jne. Eukaryoottien joukossa ovat hiivat, kuten esim. Saccharomyces, Schizo-saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, jne., rihmasienet, Neurospora, Aspergillus, jne.

Seerumin albumiinin ekspressio voi johtaa tuotteen erittymiseen tai pidättymiseen organismissa. Liemi voidaan poistaa panoksittain tai jatkuvasti fermentteristä. Erittymisen tapauksessa käytetään solutonta supernatanttia puhdistusprosessissa. Soluton supernatantti saadaan selkeyttämällä fermentointiliemi, sopivasti sentrifugoimalla tai suodattamalla liemi käyttäen ultrasuodatusta proteiinituotteen konsentroimiseksi. Suodattimen erotusrajana on yleensä 500-25 000 D, tavallisemmin ainakin noin 1000 D. Suositeltavasti lopputuotteen konsentraation pitäisi olla ainakin noin 0,5 mg/ml, edullisesti ainakin noin 1 mg/ml. Jos tuote pysyy solun sytoplasmassa, solut otetaan talteen. Lysaatti voidaan valmistaa minkä tahansa sopivan tekniikan mukaisesti käyttäen mekaanista tai kemiallista solujen rikkomista lysaatin valmistamiseksi. Solujäte voidaan poistaa sentrifugoimalla.

Soluttoman supernatantin tai solulysaatin pH säädetään arvoon 7,5-9, edullisemmin 8-8,5. pH:ta voidaan modifioida millä tahansa sopivalla keinolla, kuten esim. natriumhydroksidin tai muun sopivan emäksen lisäyksellä tavallisesti normaalisuusalueessa noin 0,1:stä väkevämpään. Seosta

sekoitetaan sopivasti lyhyen aikaa, yleensä 5-30 minuuttia, ja suodatetaan suodattimen läpi, joka yleensä pidättää partikkelit, jotka ovat suurempia kuin noin 25 μm , edullisesti suurempia kuin noin 20 μm , edullisemmin suurempia kuin noin 5 μm . Sakka pestään sopivasti puskuroidulla liuoksella, tavallisesti puskuroitu alle pH 8:n, yleensä laimeaksi, missä puskurikonsentraatio on noin 20:stä 100 mM:iin. Sopivasti puskurin pH on alueessa noin 6.5:stä 8:aan. Pesujen tilavuus ei ole kriittinen, ollen yleensä noin 0.1:stä 0.5:een perustuen suodoksen tilavuuteen. Puskurin johtavuus on yleensä noin 0.1:stä 100:aan mS/cm, edullisesti välillä noin 1:stä 50 mS/cm. Jälkeenpäin suodos ja pesut yhdistetään.

Seuraava oleellinen vaihe on affiniteettikromatografia, jossa käytetään lipofiilistä liikkumatonta faasia. Affiniteettikromatografiavaiheessa seerumin albumiinia sisältävä liuos saatetaan kosketuksiin kiinteän pinnan kanssa, tavallisesti kolonnissa olevien partikkelien kanssa, jotka on pinnoitettu tai funktionalisoitu noin 6-12 hiiliatomin, edullisesti noin 6-10 hiiliatomin, edullisemmin 8 hiiliatomin muodostamalla lipofiilillä ketjuilla, missä ryhmä normaalisti sisältää alkyyliryhmän, joka on sidottu funktionaalisuuteen kovalenttisen sidoksen muodostamiseksi kantajaan. Havainnollisiin yhdisteisiin sisältyvät oktanoaatit, oktyylisukkinaatit, jne, missä lipofiilinen ryhmä voidaan sitoa kantajaan eetterin, amidin tai muun stabiilin funktionaalisuuden avulla. Elueneihin sisältyy lipofiilinen yhdiste, sopivasti karboksylaatti, esteri tai vastaava, joka liukenee vesipitoiseen väliaineeseen konsentraatiossa, joka on välillä noin 50:stä 250:een, tavallisemmin 75:stä 150 mM:iin. Tekniikan edelleen selittämiseksi katso Wichman ja Andersson (1974), supra.

Affiniteettikromatografian suorittamiseksi väliaineen pitää olla suunnilleen fysiologisessa pH:ssa, normaalisti alueessa noin 6.5:stä 8:aan, tavallisemmin alueessa noin 7:stä 7.5:een. Puskurin konsentraation pitää yleensä olla alueessa

noin 50:stä 150 mM:iin.

Toivotusti panostettaessa seerumin albumiinin väliainetta affiniteettiadsorbenttiin kolonni pestään tasapainotuspuskurilla, johon on lisätty noin 0.5:stä 1.5:een M suolaa (NaCl).

Toivotusti joko ennen tai jälkeen affiniteettikromatografian käytetään myös ioninvaihtoa seerumin albumiinin puhdistamisen edelleentehostamiseksi. Edeltävässä tapauksessa sakka pestään puskuroidulla liuoksella, tavallisesti puskuroitu pH:hon, joka on alle 7, yleensä laimeaksi, jossa puskurikonsentraatio on noin 20:stä noin 100:aan mM:iin. Toivotusti puskurin pH on alueessa noin 4:stä 5.5:een. Pesujen tilavuus ei ole kriittinen ollen yleensä noin 0.1:stä 0.5:een, suodoksen tilavuuteen perustuen. Puskurin johtavuus on yleensä noin 0.1-100 mS/cm, edullisesti välillä noin 1:stä 50:een mS/cm. Suodoksen ja pesujen yhdistämisen jälkeen liuoksen pH:ta alennetaan noin 3.5:stä 6:een, edullisesti 4:stä 5.5:een. Viimemainitussa tapauksessa affiniteettikromatografian jälkeen eluaatin pH:ta alennetaan noin 3.5:stä 6:een, edullisesti 4:stä 5.5:een.

Ioninvaihtovaihe auttaa poistamaan nukleiinihappoja, kontaminoivia proteiineja ja pigmenttejä. Seerumin albumiinin väliaine voidaan yhdistää ioninvaihtohartsiin joko panoksittain tai jatkuvasti kolonnin läpi, jossa kontaktia pidetään yllä normaalisti noin 5-60 min, edullisesti 10-30 min. Anioninvaihtoadsorbenttia, kuten esimerkiksi QAE:ta tai DEAE:ta, käytetään sidottuna kaupallisesti saatavissa olevaan kantajaan. Seerumin albumiinin väliainetta käytetään happoväliaineena, jonka pH on yleensä välillä 3.5-6, tavallisemmin alueessa noin 4:stä 5.5:een, mikä voidaan helposti saavuttaa lisäämällä joukko puskurien happoja. Puskurin konsentraatio on yleensä alueessa noin 25:stä 100:aan mM:a. Ioninvaihtohartsin ja proteiinin välinen painosuhte on yleensä ainakin noin 1:1 eikä ylitä 30:1, ja on edullisesti noin 5-15:1, edullisemmin noin 10:1. Ennen käyttöä anioninvaihtohartsi

normaalisti tasapainotetaan alhaisen pH:n puskurilla, jota käytetään seerumin albumiinin väliaineen kanssa.

Seerumin albumiinin väliaine eristetään sen jälkeen millä tahansa sopivalla keinolla, esimerkiksi sentrifugoimalla 5 minuuttia, 2000 x g, mitä seuraa ioninvaihtohartsin pesu alhaisen pH:n puskurilla, missä alhaisen pH:n puskurin tilavuuden suhde ioninvaihtohartsin tilavuuteen on yleensä noin 1-20 kertainen, tavallisesti 2-10 kertainen. Voidaan käyttää yhtä tai useampaa pesua, tavallisesti kahta. Nestemäiset väliaineet yhdistetään ja pH nostetaan normaalisti suunnilleen neutraaliksi, yleensä alueeseen noin 6.5:stä 8:aan, tavallisemmin noin 7:stä 8:aan. Suunnilleen neutraali väliaine dialysoidaan sen jälkeen esimerkiksi fosfaattipuskuria vastaan, jonka pH on noin 6:sta 10:een, edullisesti noin 6:sta 8:aan, johtavuuden ollessa noin 0.5:stä 100 :aan mS/cm, edullisesti noin 0.5:stä 20:een mS/cm. Joka tapauksessa puskuriliuos on sama kuin affiniteettikolonissa käytettävä. Väliaineen konsentroidi tuottaa tavallisesti konsentraatin, joka on noin 1:stä 20:een mg proteiinia/ml, tavallisemmin noin 2:sta 15:een mg/ml.

Laajaa valikoimaa kantajia ja adsorbentteja voidaan käyttää kiinteinä kantajina. Tällaisiin kiinteisiin kantajiin sisältyvät epäorgaaniset kantajat, kuten esimerkiksi lasi ja sili-kageeli, orgaaniset, synteettiset tai luonnossa esiintyvät kantajat, kuten esimerkiksi agaroozi, selluloosa, dekstraani, polyamidi, polyakryyliamidit, bifunktionaalisten akrylaattien vinylikopolymeerit, ja erilaiset hydroksyloidut monomeerit, ja vastaavat. Kaupallisesti saatavia kantajia myydään nimillä Sephadex^R, Trisacryl^R, Ultrogel^R, Dynospheres^R, Macroorb^R, XAD-hartsit ja muut.

Olosuhteet suoritettaville toimenpiteille ovat denaturoimat-tomat olosuhteet, yleensä sopivien lämpötilojen ollessa välillä -10°C:sta +30°C:een, tavallisemmin suunnilleen ympäris-

tön lämpötila. Kromatografiset vaiheet voidaan suorittaa panoksittain tai jatkuvasti kuten halutaan. Mitä tahansa sopivaa erotusmenetelmää voidaan käyttää, kuten esim. sentrifugointia, suodattamista, dekantointia tai vastaavaa.

Keksinnön eräs edullinen suoritusmuoto käsittää:

hiivasolujen, jotka on transformoitu ekspressiorakenteella, joka käsittää seerumin albumiinia koodaavan rakennegeenin, jossa seerumin albumiini ekspressoituu, kasvattamisen elatusaineessa;

tuoteväliaineen eristämisen selkeytettynä fermentointiliemennä tai solulysaattina;

tuoteväliaineen tekemisen alkaliseksi pH:hon, joka on välillä 7,5-9, ja alkalisen väliaineen erottamisen sakasta;

mainitun alkalisen väliaineen hapottamisen pH:hon, joka on välillä 4,0-5,5, ja mainitun hapotetun väliaineen inkuboimisen anioninvaihtoadsorbentin kanssa;

mainitun hapotetun väliaineen pH:n muuttamisen suunnilleen fysiologiseksi pH:ksi konsentroidun seerumin albumiinin muodostamiseksi ja mainitun konsentroidun väliaineen kromatografinnin lipofiilisellä liikkumattomalla faasilla ja albumiinin eluoinnin lisäämällä desorbenssinä vesiliukoista lipidianionia; ja

puhdistetun seerumin albumiinin eristämisen oleellisesti vapaana mainitusta mikro-organismista peräisin olevista kontaminanteista.

Seuraavat esimerkit tarjotaan havainnollistamiseksi eikä rajoittaviksi.

Kokeet

Esimerkki 1

HSA:n puhdistaminen selkeytetystä fermentointiliemestä

Kluyveromyces lactis CBS 2360 kasvatettiin 70 tuntia 30°C:ssa väliaineessa, joka sisälsi hiivauutetta 0.5% (w/v), maissin liuoksessa syntyviä kiinteitä aineita 2% (w/v), glukoosia 0.7% (w/v) ja mineraalisuoloja. Glukoosi lisättiin fermentoinnin aikana. Fermentointiliemi sentrifugoitiin (5 min. 4000 rpm) ja supernatantti suodatettiin Seitz K 500 -suodattimen läpi. Lopullinen liuos konsentroidtiin 6 kertaa ultra-suodatuksella käyttäen suodatinta, jonka erotusraja oli 1000D. Lopullinen proteiinikonsentraatio oli 1 mg/ml.

Alkalinen saostus: Tähän selkeytettyyn konsentroituu fermentointiliemeen lisättiin rasvatonta puhdistettua HSA:ta (Cohn Fraction V) niin, että HSA-pitoisuus oli 90% (w/w) proteiini-pitoisuudesta (10 mg/ml). HSA:ta sisältävän liuoksen pH:ta lisättiin 8.1:een, sekoitettiin 15 min. ja suodatettiin 20 μ m suodattimen läpi. Suodoskaku pestiin kaksi kertaa 50 mM natriumasetaatilla pH 4.5, ja sen jälkeen yhdistettyjen suodoskakkujen pH säädettiin 4.5:een.

QAE-Sephadex-kromatografia: Edellisessä vaiheessa saatua HSA-liuosta inkuboitiin panoksittain 30 minuuttia QAE-Sephadex A-50^R:n kanssa, joka oli tasapainotettu 50 mM natriumasetaatipuskurilla pH 4.5, proteiini:adsorbenttisuhteella (w/w) (kuivapaino) 1:10. Inkuboinnin jälkeen geelisuspensio poistettiin sentrifugoimalla ja pestiin sen jälkeen kahdesti 50 mM natriumasetaatipuskurilla pH 4.5. Kerätyt supernatantit yhdistettiin ja tämän liuoksen pH säädettiin 7.4:ään ja sen jälkeen dialysoitiin ja konsentroidtiin proteiinikonsentraatioon 10 mg/ml.

Affiniteettikromatografia: Aiemmassa vaiheessa saatu HSA-liuos saatettiin kosketukseen oktyylisukkinaattianhydridin kanssa, joka oli kytketty 1,4-diamino-butaani Sepharose 4B:hen A. Wichmanin ja L-O. Anderssonin (1974) supra mukaan. Tämä affiniteettiadsorbentti tasapainotettiin 100 mM natriumfosfaattipuskurilla pH 7.4. Sen jälkeen kun HSA:ta sisältävä liuos oli pakattu affiniteettiadsorbentin päälle ja pesty tasapainotuspuskurilla, johon oli lisätty 1 M NaCl:a, HSA:n eluointi suoritettiin 100 mM natriumfosfaattipuskurilla (pH 7.4), johon oli lisätty 100 mM natriumoktanoaattia. Puhdistetusta HSA:sta poistettiin suola ja konsentroitiin proteiinipitoisuuteen 10 mg/ml.

Tässä esimerkissä selitettyä menettelyä seuraten HSA:n saanto oli 75% eikä SDS-PAGE (kuvio 1), IEF (kuvio 2), HPIEC (kuvio 3) ja HPSEC (kuvio 4) voinut esittää yhtään kontaminanttia, jotka tulokset osoittavat saadun HSA:n suurta puhtautta.

Puhdistetun seerumin albumiinin karakterisointia suoritettiin edelleen myös immunologisilla menetelmillä: kaniinit immunoitiin puhdistetulla HSA:lla ja antiseerumeista tutkittiin vasta-ainevaste rasvatonta HSA:ta tai fermentointiliemestä peräisin olevia Kluyveromyces lactis proteiineja vastaan Ö. Uchterlonyn kaksoisdifфуusiomenetelmän mukaisesti, Acta Path. Microbiol. Scand. (1948) 28:186-191. Tätä tekniikkaa käyttäen havaittiin ainoastaan kohti HSA:ta suunnattuja vasta-aineita.

Esimerkki 2

HSA:n puhdistaminen selkeytetystä fermentointiliemestä ilman ioninvaihtokromatografiaa

Esimerkki 1 toistettiin mutta ilman ioninvaihtovaihetta. Tämän prosessin HSA-saanto (90%) oli korkeampi kuin esimerkissä 1 saatu. Vaikka albumiinin ja proteiinin välinen suhde (w/w)

oli 1, puhdistetun seerumin albumiinin HPIEC-kromatogrammi (kuvio 5) paljasti pienen piikin HSA-piikin edessä. Sitä paitsi, rasvattoman HSA:n ja esimerkissä 1 saadun HSA:n vastakohtana lopullinen tuote oli heikosti kellanvärinen, mikä osoitti fermentointiliemestä peräisin olevan pigmentin läsnäoloa.

Esimerkki 3

HSA:n puhdistaminen selkeytetystä solulysaatista

Kluyveromyces lactis solupastaa (CBS 2360; viljelty esimerkissä 1 selitetyllä tavalla) laimennettiin 1:1 vedellä ja rikottiin lasihelmillä Dynamill-laitteessa. Lysoituja soluja sentrifugoitiin 20 minuuttia 15,000 kierroksella minuutissa Sorvall-sentrifugissa, SA 600 -roottori, ja supernatattia käytettiin sellaisenaan.

Alkalinen saostus: Selkeytettyyn solulysaattiin lisättiin rasvatonta, puhdistettua HSA:ta (Cohn Fraction V) niin, että HSA-pitoisuus oli 5% (w/w) kokonaisproteiinipitoisuudesta: 10 mg/ml. HSA-ta sisältävän liuoksen pH:ta lisättiin 8.1:een, sekoitettiin 15 minuuttia ja suodatettiin 20 μ m ja 5 μ m suodattimen läpi. Suodoskakku pestiin kaksi kertaa 50 mM natriumasetaatipuskurilla pH 4.5 ja sen jälkeen yhdistettyjen suodosten pH säädettiin 4.5:een.

QAE-Sephadex-kromatografia: Aiemmassa vaiheessa saatu HSA-liuos inkuboitiin panoksittain QAE-Sephadex A-50^R:n kanssa (suhde (w/w) adsorbentti:proteiini = 10:1), joka oli tasapainotettu 50 mM natriumasetaatipuskurilla pH 5.0, sisältäen 0.25 M NaCl. Inkuboinnin jälkeen geel suspensio poistettiin sentrifugoimalla ja adsorbentti pestiin kahdesti tasapainotuspuskurilla.

Kerätyt supernatantit yhdistettiin, tämän liuoksen pH säädet-

tiin 7.4:ään ja sen jälkeen HSA:ta sisältävä liuos dialysoitiin ja konsentroidtiin proteiinipitoisuuteen 10 mg/ml. HSA:ta sisältävän, epäpuhtaan liuksen edelleen käsittely suoritettiin affiniteettikromatografialla, kuten on selitetty esimerkissä 1. HSA-saanto oli 50% ja lopputuotteen puhtaus, esitettyinä mg albumiinia/mg proteiinia, oli 0.85.

Esimerkki 4

Rekombinantti HSA:n puhdistaminen selkeytetystä fermentointiliemestä

Kluyveromyces lactis CBS 2360, transformoitu plasmidin kanssa sisältäen HSA:n geenin kuten on selitetty salaisen julkaisun EP-A-88201632.2 (jätetty heinäkuun 28. 1988) esimerkissä 10, kasvatettiin 110 tuntia 30°C:ssa tämän selityksen esimerkissä 1 selitetyssä väliaineessa. Glukoosi lisättiin fermentoinnin aikana. Fermentointiliemi sentrifugoitiin (5 min. 4000 rpm) ja supernatantti konsentroidtiin 20 kertaa ultrasuodatuksella käyttäen suodatinta, jonka erotusraja oli 1000D. Lopullinen proteiinikonsentraatio oli 10 mg/ml, josta 0.45 mg/ml koostui monomeerisestä HSA:sta, joka oli tuotettu rekombinantti tekniikalla.

Rekombinantti HSA:ta sisältävän liuoksen pH:ta lisättiin 8.1:een. Liuosta sekoitettiin 15 minuuttia ja suodatettiin 20 μ m suodattimen läpi. Suoduskakku pestiin kahdesti 50 mM natriumasetaatilla pH 4.5 ja sen jälkeen yhdistettyjen suodosten pH säädettiin 4.5:een. Rekombinantti HSA:n edelleenpuhdistaminen käyttäen QAE-Sephadex -kromatografiaa ja affiniteettikromatografiaa suoritettiin kuten esimerkissä 1 on selitetty.

Tässä esimerkissä selitettyä menettelyä seuraten puhdistetun, monomeerisen rekombinantti albumiinin, joka oli heikosti kellanvärinen, saanto oli 70%. SDS-PAGE (kuvio 6), IEF (kuvio

7), HPSEC (kuvio 8A) ja HPIEC (kuvio 8B) voivat esittää vähäisiä kontaminantteja (kokonaisuudessaan < 8%).

On ilmeistä edellä olevista tuloksista, että kyseessä olevalla keksinnöllä saadaan aikaan rekombinantti tekniikoilla tehdyn seerumin albumiinin nopea ja tehokas puhdistaminen. Näin ollen saadaan aikaan nopea ja tehokas menetelmä seerumin albumiinin ja samanlaisten proteiinien puhdistamiseksi tuotteen valmistamiseksi, joka on oleellisen vapaa kontaminoivista mikro-organismeista, joita käytetään ekspressioisäntinä. Tällä tavoin voidaan saada tuotteita, jotka ovat käyttökelpoisia farmaseuttisina aineina, voidaan tuottaa tehokkaasti suurina määrinä ja saada suurisaantoisina.

Kaikki julkaisut ja patenttihakemukset, jotka on mainittu tässä selityksessä, osoittavat alan ammattimiesten, joita tämä koskee, taidon tasoa. Kaikki julkaisut ja patenttihakemukset on liitetty tähän viittauksena samassa laajuudessa kuin jos kukin yksittäinen julkaisu tai patenttihakemus olisi erityisesti ja yksilöllisesti osoitettu liitetyn viittauksena.

Vaikka edellä olevaa keksintöä on selitetty jossain määrin yksityiskohtaisesti havainnollistamalla ja esimerkkien avulla ymmärtämisen helpottamiseksi, on ilmeistä, että tiettyjä muutoksia ja modifikaatioita voidaan tehdä oheisten patenttivaatimusten piirissä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä puhdistetun rekombinanttisen seerumin albumiinin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää:

mikro-organismien kasvattamisen väliaineessa, jotka mikro-organismit on transformoitu ekspressiorakenteella, joka käsittää seerumin albumiinia koodaavan rakennegeenin, jolloin seerumin albumiini ekspressoituu;

tuoteväliaineen eristämisen selkeytettynä fermentointiliemessä tai solulysaattina;

tuoteväliaineen tekemisen alkaliseksi pH-arvoon 7,5-9,0 ja alkalisen väliaineen erottamisen sakasta;

mainitun alkalisen väliaineen pH:n muuttamisen suunnilleen fysiologiseksi pH:ksi konsentroidun seerumin albumiinin muodostamiseksi ja mainitun konsentroidun väliaineen kromatografoinnin lipofiilisellä liikkumattomalla faasilla ja albumiinin eluoinnin lisäämällä desorbenssina vesiliukoista lipidianionia vesipitoiseen faasiin; ja

puhdistetun seerumin albumiinin eristämisen oleellisesti vapaana mainitusta mikro-organismista peräisin olevista kontaminanteista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää edelleen ennen mainittua kromatografointia mainitun alkalisen väliaineen hapottamisen ja tuloksena olevan hapotetun väliaineen inkuboimisen anioninvaihtohartsin kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitun hapotetun väliaineen pH on 4,0-5,5.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se sisältää lisäksi vaiheen mainitun hapote-

tun väliaineen dialysoimiseksi mainitun inkuboimisen jälke-

5. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitussa desorbenssis-
sa on noin 6-12 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu desorbenssi on noin 6-12 hiiliatomia sisältävä karboksylaatti.

7. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se sisältää lisävaiheen mainitun puhdistetun seerumin albumiinin dialysoimiseksi.

8. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu mikro-organismi on hiiva.

9. Minkä tahansa edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu seerumin albumiini on ihmisseerumin albumiini.

Patentkravet

1. Förfarande för framställning av ett renat rekombinant-serumalbumin, **kännetecknat** av att det innefattar:

odling i ett medium av mikroorganismer transformerade med en expressionskonstruktion innefattande en struktorgen som kodar serumalbumin, varvid serumalbumin uttryckes;

isolering av ett produktmedium som ett klarnat jäsningsmedium eller cellysat;

överförande av produktmediet till ett alkaliskt pH-värde av 7,5-9,0 och separation av det alkaliska mediet från fällningen;

förändring av pH hos nämnda alkaliska medium till ungefärligen fysiologiskt pH för åstadkommande av koncentrerat serumalbumin och kromatografering av nämnda koncentrerade medium med en lipofil immobil fas och eluering av albuminet genom tillsats av en vattenlöslig lipidanjon som desorbent till den vattenhaltiga fasen; och

isolering av renat serumalbumin som är väsentligen fritt från föroreningar från nämnda mikroorganismer.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att det dessutom innefattar att före nämnda kromatografering surgöres nämnda alkaliska medium och att det erhållna surgjorda mediet inkuberas med ett anjonbytarharts.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att nämnda surgjorda medium uppvisar ett pH-värde av 4,0-5,5.

4. Förfarande enligt patentkrav 2 eller 3, **kännetecknat** av att det dessutom innefattar steget avseende dialys av nämnda surgjorda medium efter nämnda inkubation.

5. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att nämnda desorbent uppvisar en alkylgrupp med cirka 6-12 kolatomer.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, **kännetecknat** av att nämnda desorbent är ett karboxylat med cirka 6-12 kolatomer.

7. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att det innefattar det ytterligare steget avseende dialys av nämnda renade serumalbumin.

8. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kännetecknat** av att nämnda mikroorganism utgöres av en jäst.

9. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, **kän-**
netecknat av att nämnda serumalbumin utgöres av humant se-
rumalbumin.

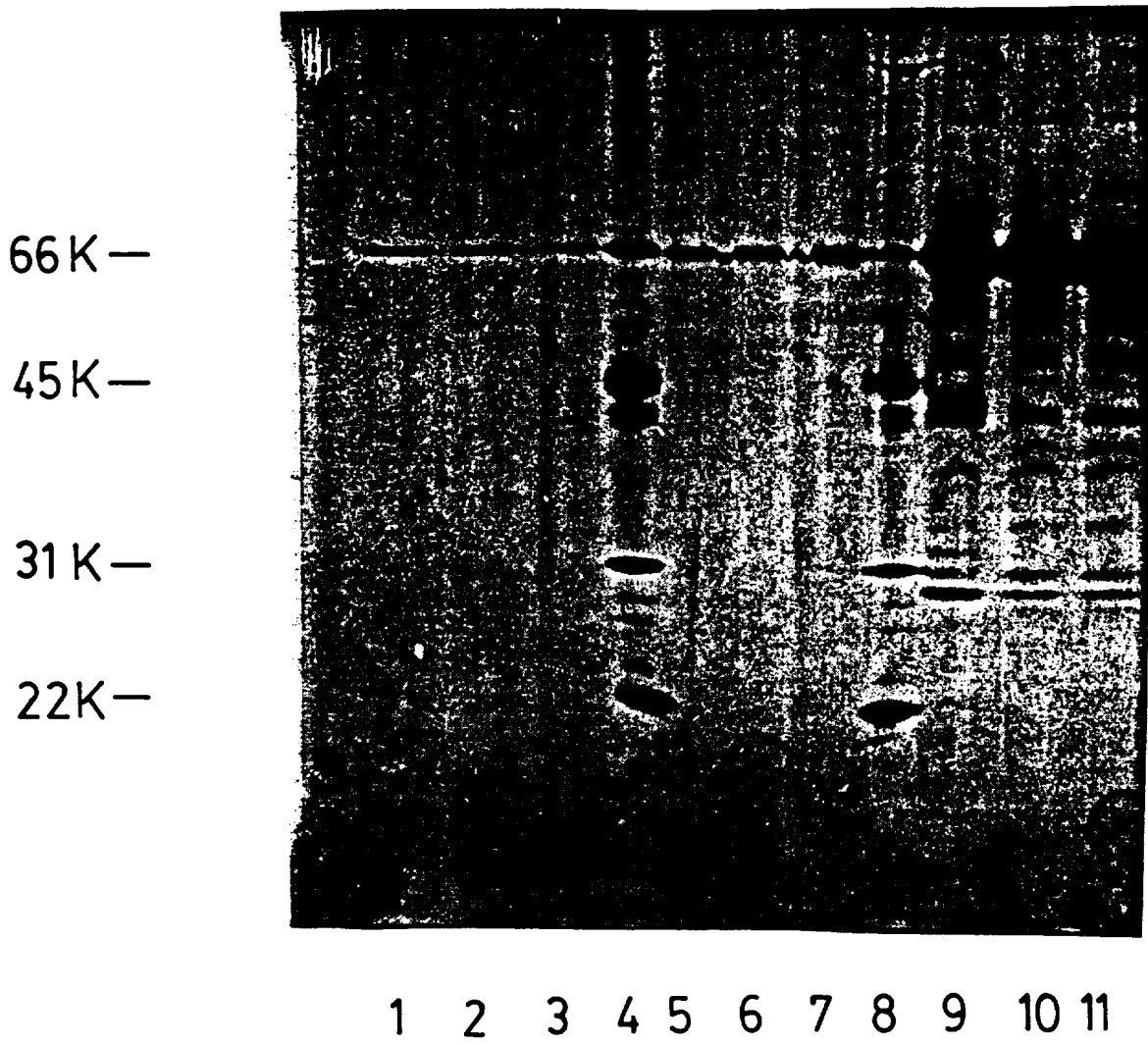


FIGURE 1

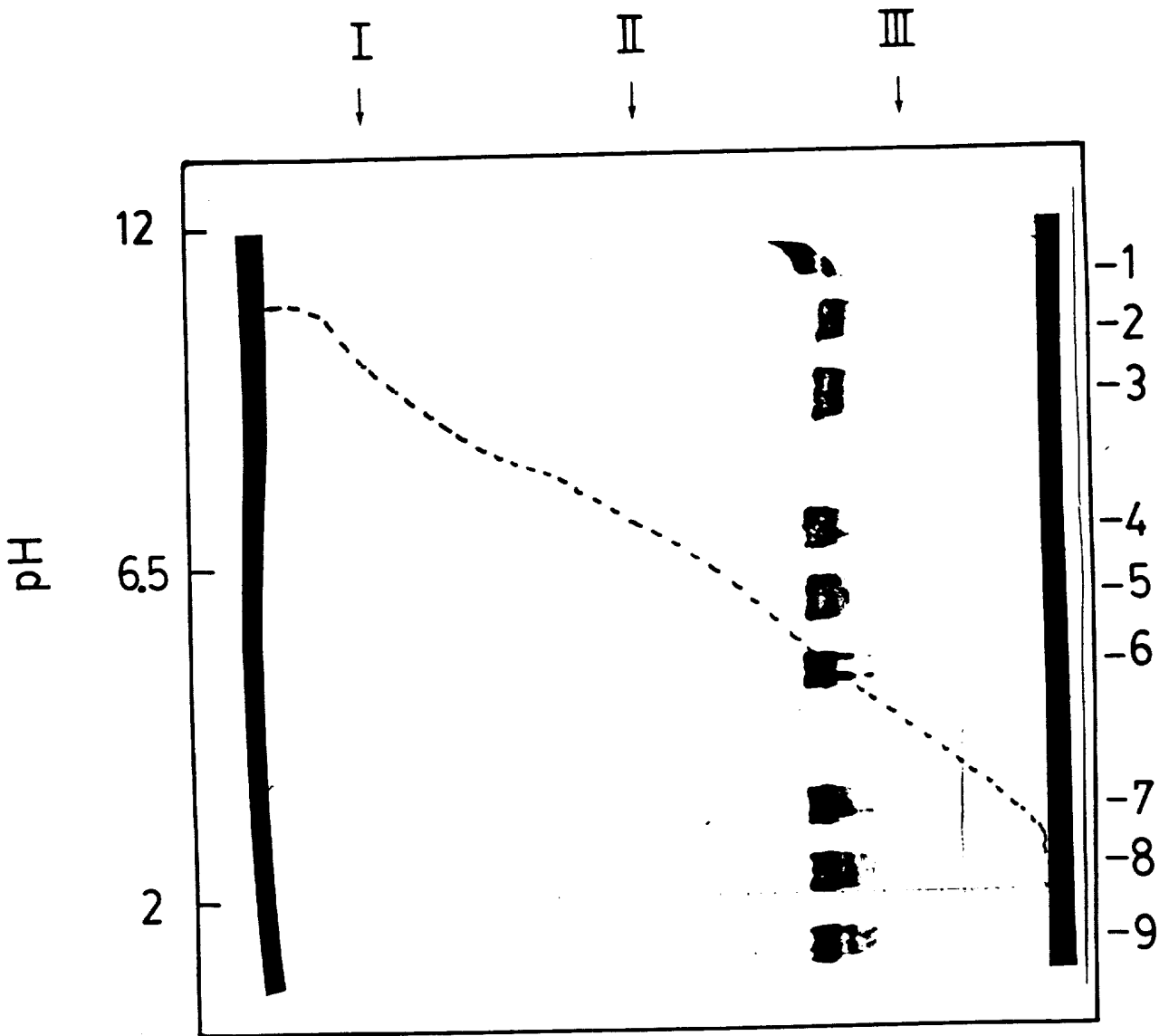


FIGURE 2

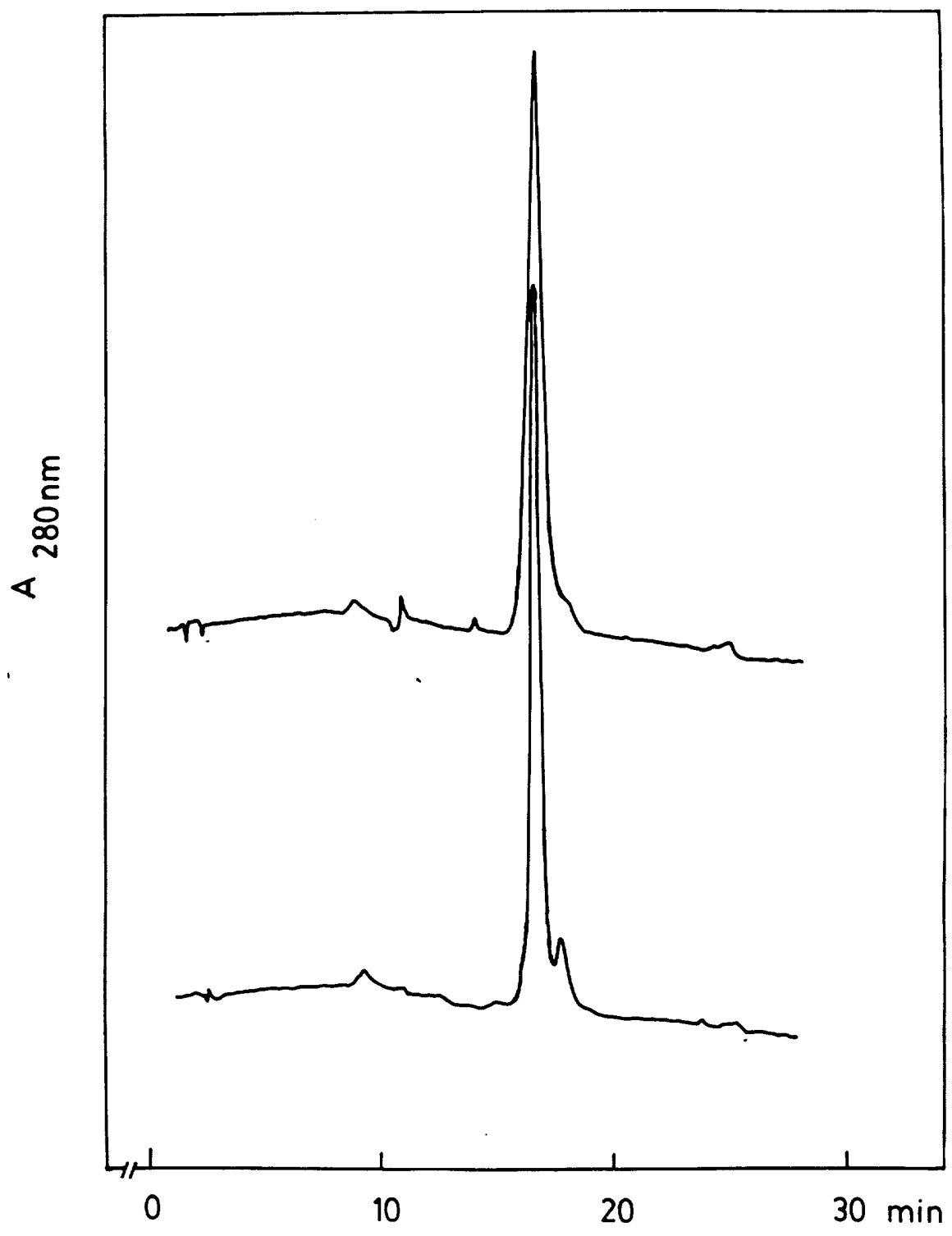


FIGURE 3

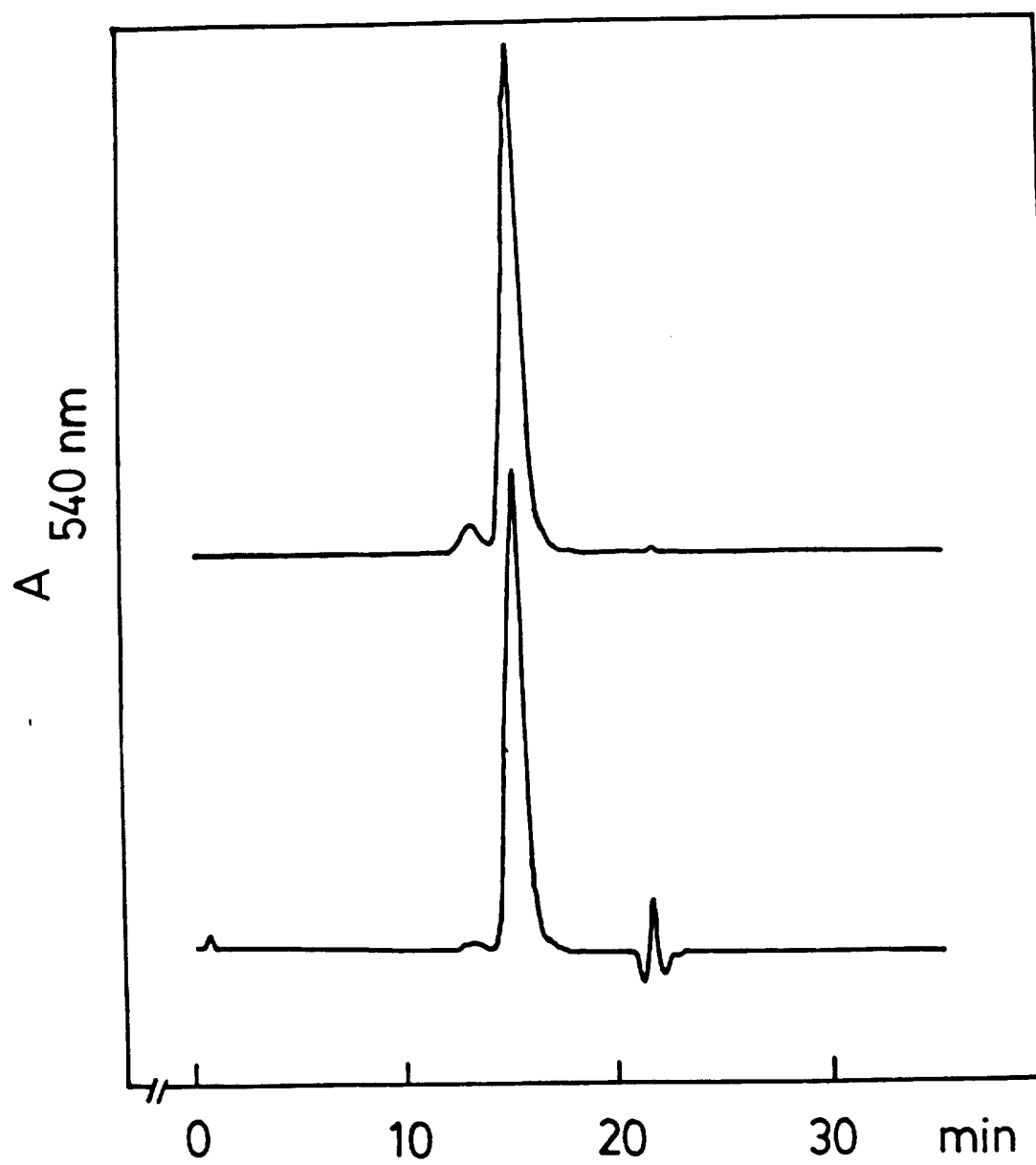


FIGURE 4

92404

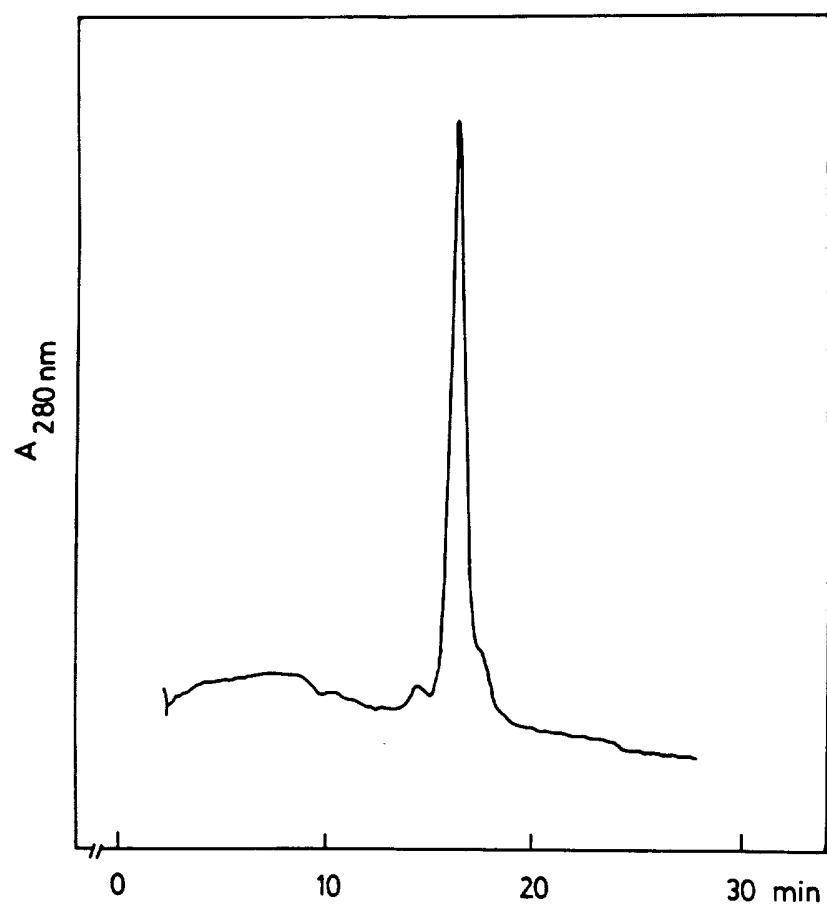


FIGURE 5

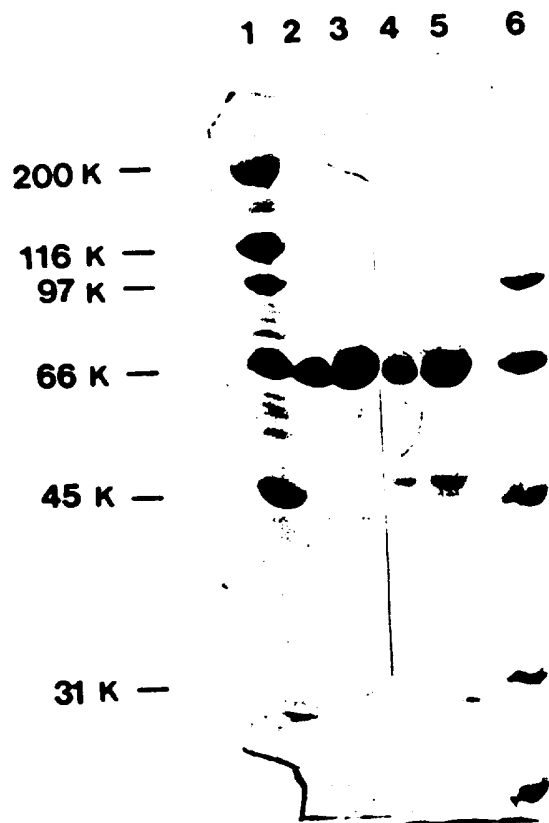


FIGURE 6



FIGURE 7

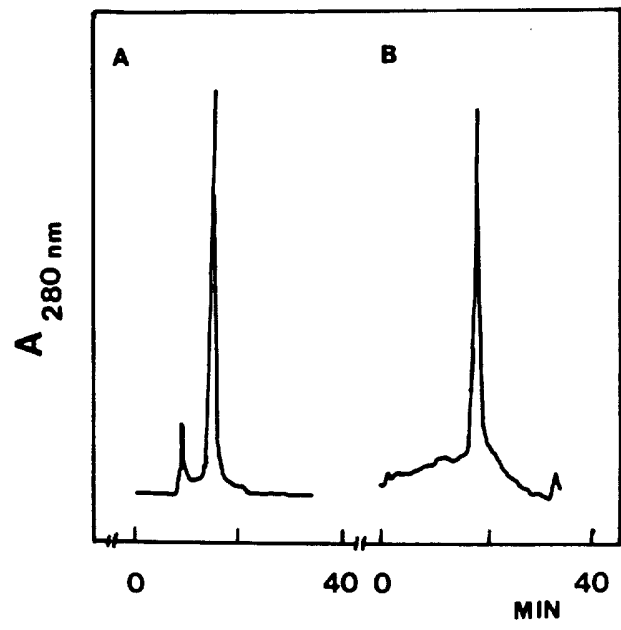


FIGURE 8